

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
U.F.R DE BIOLOGIE

THESE

pour l'obtention du grade de :

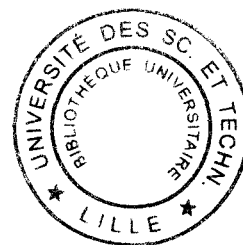
DOCTEUR
DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

présentée et soutenue publiquement

par

Christophe LEFEBVRE

le 4 juillet 2002



ETUDE DE LA REponse IMMUNITAIRE CHEZ LA SANGSUE
THEROMYZON TESSULATUM : APPROCHES DIFFERENTIELLES.

Directeurs de Thèse : Dr. C. COCQUERELLE et Pr. M. SALZET

JURY

Président	M. SALZET, Professeur à l'USTL (Lille)
Rapporteurs	B. LEMAITRE, Directeur de Recherche au CNRS (Gif-sur-Yvette) C. LOWENBERGER, Professeur à l'Université du Wisconsin-Madison
Examineurs	Y. LEMOINE, Professeur à l'institut Pasteur de Lille C. COCQUERELLE, Maître de conférences à l'USTL (Lille)

à Séverine,

à mes parents,

à ma famille,

Remerciements

Je tiens à remercier très respectueusement le Dr. Bruno Lemaitre et le Pr. Carl Lowenberger de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail de thèse.

J'aimerais adresser mes plus sincères remerciements au Pr. Yves Lemoine pour avoir examiné ce mémoire. Je lui suis également très reconnaissant de m'avoir accueilli dans son laboratoire. A l'image de David, Ludovic et Erwann, j'y ai rencontré une précieuse collaboration.

Je remercie le Pr. Jean Malecha de m'avoir accueilli dans le laboratoire d'Endocrinologie des Annélides et de m'avoir fait découvrir l'anatomie de notre modèle.

Je remercie également le Pr. Jean Claude Andriès et les Dr. José Godin, Marc Bertoux, Daniel Vinckier et Patrick Scaps de m'avoir permis d'enseigner en DEUG et en DESS dans l'UFR de Biologie.

J'envoie mille mercis à Annie pour sa participation très précieuse au travail et sa contribution à la vie quotidienne du laboratoire, à Marie Christine, Stéphanie et Nathalie pour leur contribution successive à ce travail.

Je remercie amicalement Franck d'avoir dirigé les études d'hybridation *in situ*, Pierre-Eric de m'avoir fait découvrir la biochimie et d'avoir séquencé les peptides, Christophe et Didier de leurs nombreux conseils en biologie moléculaire.

J'aimerais exprimer toute ma sympathie aux membres de l'unité ; à Françoise, Isabelle et Jacopo; aux étudiants en DEA (et bientôt thésards !!) ; aux thésards passés et présents et à tout le personnel technique.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Michel qui m'a intégré au laboratoire, m'a permis de faire un DEA et une thèse dans de bonnes conditions. J'ai découvert un directeur attentif et surtout un interlocuteur ouvert à tout échange d'idées.

Enfin, j'aimerais adresser mes plus sincères remerciements à Claude qui m'a proposé ce sujet d'étude et a su me guider sur cette longue voie. Elle fut parfois sinueuse, mais à aucun moment sans issue. Jugée impraticable pour certains, elle n'était toute au plus qu'audacieuse... J'espère, en t'adressant toute ma reconnaissance, avoir été à la hauteur de tes attentes.

SOMMAIRE

Introduction.....	1
Généralités	6
I- Les Vertébrés et l'immunité acquise	6
II- La réponse immunitaire innée chez les Vertébrés et les Invertébrés.....	8
1- Les barrières physiques	9
2- Les molécules de reconnaissance et d'amplification	9
3- L'induction de médiateurs	15
4- Les réponses de l'immunité innée	19
4.1- La réponse humorale	19
4.1.1- Les médiateurs de la réponse humorale	19
4.1.2- Les effecteurs humoraux	20
4.2- La réponse cellulaire	23
4.2.1- Les cellules tueuses des Vertébrés	23
4.2.2- La phagocytose.....	24
4.2.2.1- Les enzymes hydrolytiques et les mécanismes oxydatifs	24
4.2.2.2- Les peptides antimicrobiens des phagocytes.....	27
Matériels et Méthodes	33
I- Matériel biologique	33
1- Présentation et cycle de vie de <i>Theromyzon tessulatum</i>	33
2- Quels sont les tissus analysés?.....	37
2.1- Analyse biochimique.....	37
2.2- Analyse moléculaire	37
3- Stimulation de la réponse immunitaire innée	38

3.1- Agents pathogènes utilisés	38
3.2- Durée des stimulations	38
II- Méthodes d'analyse des peptides issus du liquide coelomique	38
1- Pré-purification des peptides	40
2- Purification des peptides.....	40
2.1- Approche différentielle par Chromatographie (CLHP)	40
2.2- Comparaison des profils chromatographiques	41
2.3- Purification des peptides différentiels	41
3- Identification des peptides modulés	42
III- Méthodes d'analyse des ARNm de l'animal.....	42
1- Préparation des ARN totaux	42
1.1- Extraction à partir des animaux entiers	42
1.2- Traitement des ARN totaux par la DNase I	43
2- Analyse comparative par <i>Differential Display</i> RT-PCR (DDRT-PCR)	43
2.1- Synthèse des ADN complémentaires	44
2.2- Amplification par PCR.....	47
2.3- Analyse différentielle par DDRT-PCR ciblée.....	48
2.4- Séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant	48
2.5- Analyse et excision des bandes différentielles	49
2.6- Réamplification des produits par PCR	51
3- Clonage moléculaire des gènes d'intérêt.....	51
3.1- Clonage partiel à l'aide d'oligonucléotides dégénérés.....	52
3.2- Amplification sur les banques d'ADNc de sangsues	54
3.3- Clonage des extrémités 5' et/ou 3' par RACE-PCR	56
4- Clonage et séquençage des Produits d'intérêt	58
5- Distinction des clones issus de chaque candidat différentiel	59
6- Contrôle par Northern Blot.....	61
6.1- Elaboration des membranes	61
6.2- Synthèse des sondes radioactives.....	61
6.3- Hybridation et rinçage des membranes	62
7- Contrôle par Biopuces à ADN.....	62

7.1- Préparation des candidats déposés sur les lames.....	63
7.2- Construction des lames.....	64
7.3- Synthèse des sondes	64
7.4- Hybridation et rinçage des lames	67
7.5- Analyse statistique des spots	68
8- Localisation de l'expression par Hybridation <i>in situ</i>	68
8.1- Préparation des tissus analysés.....	68
8.2- Préparation des sondes	70
8.3- Hybridation.....	71
8.4- Exposition et quantification	71
8.5- Double hybridation <i>in situ</i>	72
Résultats.....	74
I- L'analyse des peptides du liquide coelomique	74
1- La fraction de prépurification 10-50% d'acétonitrile (ACN).....	75
2- La fraction de prépurification 50-80% d'acétonitrile.....	78
2.1- Le peptide du pic P7	80
2.2- Le peptide du pic P9.....	83
II- Analyse transcriptomique par DDRT-PCR	87
1- L'approche par <i>DDRT-PCR</i> classique.....	88
1.1- Sélection des bandes différentielles	88
1.2- Séquençage des produits clonés	92
1.3- Stratégie d'analyses des candidats	93
2- L'analyse par <i>DDRT-PCR</i> ciblée sur les récepteurs à sept domaines transmembranaires	95
3- Contrôle par Biopuces à ADN.....	98
III- Etude de la cystatine B et de la cathepsine L de <i>T. tessulatum</i>..	108
1- Le candidat n°3 est homologue à la cystatine B humaine.....	108
1.1- Clonage de l'ADNc complet de <i>Tt-cysB</i>	108
1.2- Contrôle de l'induction du gène <i>Tt-cysB</i> après infection bactérienne.....	112

1.3- Localisation tissulaire de l'expression du gène <i>Tt-cysB</i>	114
2- Etude des gènes codant les cathepsines de <i>T. tessulatum</i>	118
2.1- Clonage de l'ADNc complet de <i>Tt-cpl</i>	118
2.2- Localisation tissulaire de l'expression du gène <i>Tt-cpl</i>	121
2.3- Clonage moléculaire des cathepsines B et Z (<i>Tt-cpb</i> et <i>Tt-cpz</i>).....	123
Discussion	126
I- Choix des tissus étudiés, des stades de développement et des stimulations expérimentales pour les approches différentielles	126
II- Les approches différentielles	131
III- Les peptides P7 et P9	136
IV- Les gènes dont l'expression est modulée après une infection expérimentale	138
1- Le gène de la thréonine désaminase	138
2- Le clone 24.1	139
3- Les gènes de l'actine et de l' α -tubuline	139
4- Le gène de la malate déshydrogénase	140
5- Le gène de la cystatine B	141
6- Le gène de la protéine de liaison au polyadénylate 1 (PABP 1).....	141
7- Le gène de la protéine ribosomale 60S L4	142
8- Les clones 67.1 et 74.1	143
V- La cystatine B et la cathepsine L de <i>T. tessulatum</i>	145
1- Les cystatines	146
2- Les cathepsines	148
3- Les cystatines et les cathepsines de <i>T. tessulatum</i>	150

Conclusion	156
Bibliographie	158
Présentations scientifiques.....	181
Annexe 1	182
Annexe 2.....	183

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.

<u>Figure 1</u> : Arbre phylogénétique simplifié basé sur les séquences d'ARN ribosomiques	3
<u>Figure 2</u> : Caractéristiques cellulaires de la réponse immunitaire spécifique	7
<u>Figure 3</u> : Signalisation intracellulaire menant à l'induction de la réponse immunitaire innée chez les Vertébrés.....	11
<u>Figure 4</u> : Parallèle entre les voies de signalisation chez la Drosophile et les Mammifères.	18
<u>Figure 5</u> : Phénomène de phagocytose menant à la dégradation du pathogène chez les Vertébrés. ...	25
<u>Figure 6</u> : Mécanismes développés par la drosophile à la suite de la reconnaissance d'un élément pathogène	30
<u>Figure 7</u> : Cycle de vie de <i>Theromyzon tessulatum</i>	35
<u>Figure 8</u> : Les différents stades de développement de <i>Theromyzon tessulatum</i>	36
<u>Figure 9</u> : Les différentes étapes de l'analyse biochimique.....	39
<u>Figure 10</u> : Principales étapes de l'analyse par DDRT-PCR.....	45
<u>Figure 11</u> : Exemple de profil d'amplification obtenu par DDRT-PCR.	50
<u>Figure 12</u> : Elaboration et traitements des Biopuces à ADN.....	65
<u>Figure 13</u> : Principe de l'analyse par Biopuces à ADN.....	69
<u>Figure 14</u> : Différentes étapes de l'analyse transcriptomique de <i>T. tessulatum</i>	73
<u>Figure 15</u> : Superposition des chromatogrammes des fractions de prépurification 10-50% d'ACN. .	76
<u>Figure 16</u> : Agrandissement de la superposition des pics A, B et C.....	77
<u>Figure 17</u> : Superposition des chromatogrammes des fractions de prépurification 50-80% d'ACN. .	79
<u>Figure 18</u> : Agrandissement de la superposition des pics P7 et P9.	81
<u>Figure 19</u> : Approche générale du clonage partiel de l'ADNc codant le peptide P7.	82
<u>Figure 20</u> : Approche utilisée pour le clonage partiel de l'ADNc codant le peptide P9.	84
<u>Figure 21</u> : ADNc complet codant le peptide P9 obtenu après PCR dans la banque d'ADNc témoin de <i>T. tessulatum</i>	85
<u>Figure 22</u> : Exemples de profils électrophorétiques obtenus par DDRT-PCR.....	89
<u>Figure 23</u> : Distinction des clones de chaque candidat différentiel.	94
<u>Figure 24</u> : Exemple de profils électrophorétiques obtenus par DDRT-PCR ciblée.....	96
<u>Figure 25</u> : Recherche des meilleures conditions de synthèse pour les sondes de Biopuces à ADN. .	99
<u>Figure 26</u> : Exemples de résultats obtenus par Biopuces à ADN.....	101
<u>Figure 27</u> : Clonage complet de l'ADNc codant une actine chez <i>T. tessulatum</i>	104
<u>Figure 28</u> : Différentes étapes du clonage moléculaire complet de l'ADNc de <i>Tt-cysB</i>	110

<u>Figure 29</u> : Comparaison de <i>Tt-CYSB</i> avec certaines cystatines B déjà connues.....	111
<u>Figure 30</u> : Contrôle par Northern Blot de la modulation transcriptionnelle de <i>Tt-cysB</i>	115
<u>Figure 31</u> : Localisation tissulaire par Hybridation <i>in situ</i> des transcrits de <i>Tt-cysB</i>	117
<u>Figure 32</u> : Choix des amorces oligonucléotidiques pour le clonage moléculaire de <i>Tt-cpl</i>	119
<u>Figure 33</u> : Caractérisation complète de <i>Tt-cpl</i>	120
<u>Figure 34</u> : Localisation tissulaire par Hybridation <i>in situ</i> des transcrits de <i>Tt-cpl</i> et double hybridation <i>in situ</i> de <i>Tt-cysB</i> et de <i>Tt-cpl</i>	122
<u>Figure 35</u> : Clonage moléculaire partiel des cathepsines B et Z de <i>T. tessulatum</i>	124
<u>Tableau 1</u> : Oligonucléotides de synthèse pour l'approche DDRT-PCR (5'-3').	46
<u>Tableau 2</u> : Pool d'oligonucléotides pour la DDRT-PCR ciblée.	48
<u>Tableau 3</u> : Oligonucléotides de synthèse utilisés dans les différents clonages moléculaires (5'-3'). ..	53
<u>Tableau 4</u> : Oligonucléotides de synthèse pour la distinction des clones de DDRT-PCR.	60
<u>Tableau 5</u> : Oligonucléotides de synthèse utilisés pour l'élaboration des Puces à ADN.....	63
<u>Tableau 6</u> : Liste des candidats de DDRT-PCR.	90
<u>Tableau 7</u> : Liste des candidats de DDRT-PCR ciblée.....	97
<u>Tableau 8</u> : Analyse statistique des candidats contrôlés par Biopuces à ADN.	102
<u>Tableau 9</u> : Liste des candidats sélectionnés dans l'approche par Biopuces à ADN.	107
<u>Tableau 10</u> : Exemples de données et hypothèses fonctionnelles concernant chaque gène identifié induit après l'infection bactérienne.....	144

Introduction

Le zoologiste russe Elie Metchnikoff observa en 1882 chez la larve de l'étoile de mer la capacité de déplacement de certaines cellules vers un site infectieux causé par une piqûre d'épine de rose [Tauber & Chernyak, 1989]. Cette découverte l'amena l'année suivante à décrire la faculté de certains leucocytes de grenouille d'englober des agents infectieux de type bactérien. Le terme de phagocytose fut alors défini ainsi que les bases fondamentales de l'immunité innée. L'observation microscopique des processus de défense fut complétée au fil des décennies par des approches moléculaires puis génétiques dont les résultats révélèrent la conservation très importante de l'immunité innée [Janeway, 1989]. Toutefois, ce début de XX^{ème} siècle fut également marqué dans le domaine de l'immunologie par les travaux de Paul Ehrlich et Emil Von Behring portant entre autre sur la caractérisation des cellules sanguines et la découverte de composés antitoxiques sériques chez les mammifères. Ces molécules capables de neutraliser les toxines spécifiques des bacilles de la diphtérie et du tétanos ont apporté un intérêt incontestable dans l'étude de l'immunité acquise, au dépend de celle de l'immunité innée.

L'étude de l'immunité innée fondée sur les principes de rapidité, d'efficacité et d'absence de mémoire connaît un renouveau depuis quelques années grâce aux études réalisées chez des modèles expérimentaux invertébrés. En effet, il est aujourd'hui bien établi que l'immunité innée représente l'origine évolutive de l'immunité acquise propre aux vertébrés supérieurs [Medzhitov & Janeway, 1997]. Quant aux espèces invertébrées, leur survie fait appel à des processus immunitaires innés. Or, toutes ces espèces constituent environ 98% des métazoaires actuels. Leur résistance aux parasites, bactéries et virus depuis plus de 500 millions d'années ont apporté la preuve que l'immunité innée n'est pas fondée sur des mécanismes simples mais qu'elle repose sur une grande diversité de stratégies de défense. A ce titre, ces espèces invertébrées représentent des modèles de choix dans l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les réponses immunitaires innées, à l'image notamment de *Drosophila melanogaster* [Hoffmann *et al.*, 1996] et de *Caenorhabditis elegans* [Aballay & Ausubel, 2002; Ewbank, 2002]. En outre, ce dernier représente un modèle de choix dans l'étude des relations hôte-pathogène de bactéries pathogènes pour l'homme [Aballay & Ausubel, 2002].

Parmi les différents embranchements invertébrés étudiés (entre autres: spongiaires, cnidaires, plathelminthes, némathelminthes, annélides, mollusques, arthropodes et échinodermes), de nombreux modèles montrent des modes de défense communs dont notamment des cellules douées de phagocytose ou encore la présence vitale de molécules à

activité antimicrobienne qui possèdent un large spectre d'action. Par ailleurs, chaque espèce semble avoir développé à différents degrés au cours de l'évolution, une immunité innée composée de mécanismes cellulaires et humoraux les plus adaptés pour lutter contre les pathogènes qu'elle peut rencontrer dans son biotope. De plus, il est probable que les modes de reproduction et les cycles de vie propres à chaque espèce animale impliquent l'existence d'un ensemble de mécanismes immunitaires qui puisse garantir au mieux l'homéostasie de l'organisme. La compréhension de l'immunité innée passe par conséquent par l'étude du plus grand nombre d'espèces invertébrées, mettant en évidence la diversité des mécanismes cellulaires et des molécules effectrices. Ces dernières représentent un arsenal potentiel de nouvelles molécules thérapeutiques dans la médecine vétérinaire et humaine.

Cette réflexion doit concerner tous les embranchements invertébrés. Or, jusqu'alors, la majorité des études réalisées chez les invertébrés portait sur les ecdysozoaires arthropodes (insectes et crustacés) et sur quelques vers nématodes (figure 1 page 3). En ce qui concerne les lophotrochozoaires, des études intéressantes mais isolées chez certains mollusques ont contribué à définir quelques processus immunitaires en vue d'améliorer leur élevage dans un intérêt commercial [Lacoste *et al.*, 2002; Mitta *et al.*, 2000]. Les annélides ont également fait l'objet d'études portant essentiellement sur des données descriptives en microscopie et en immunocytochimie, utilisant au passage des anticorps d'origine mammalienne [Cooper *et al.*, 2002; de Eguileor *et al.*, 2001]. L'essentiel de nos connaissances sur les mécanismes immunitaires invertébrés au niveau moléculaire est donc issu de travaux réalisés chez les ecdysozoaires.

D'après ce constat, le Professeur M. Salzet a orienté l'un des axes de recherche de notre équipe vers l'étude de l'immunité innée chez les hirudinées, modèles historiques du laboratoire. Les hirudinées, utilisées en médecine depuis des siècles (*Hirudo medicinalis*), représentent une classe d'invertébrés parmi les plus étudiés au XX^{ième} siècle [Shankland & Seaver, 2000], et à ce titre apparaissent comme un modèle invertébré incontournable en immunologie comparée. Une première approche du laboratoire a été de rechercher des peptides à activité antimicrobienne. Ce travail entrepris par A. Tasiemski au cours de sa thèse a mené à la caractérisation de deux peptides antimicrobiens originaux et de leur site de synthèse dans l'un des modèles hirudinés de notre laboratoire, *Theromyzon tessulatum* [Tasiemski *et al.*, 2002].

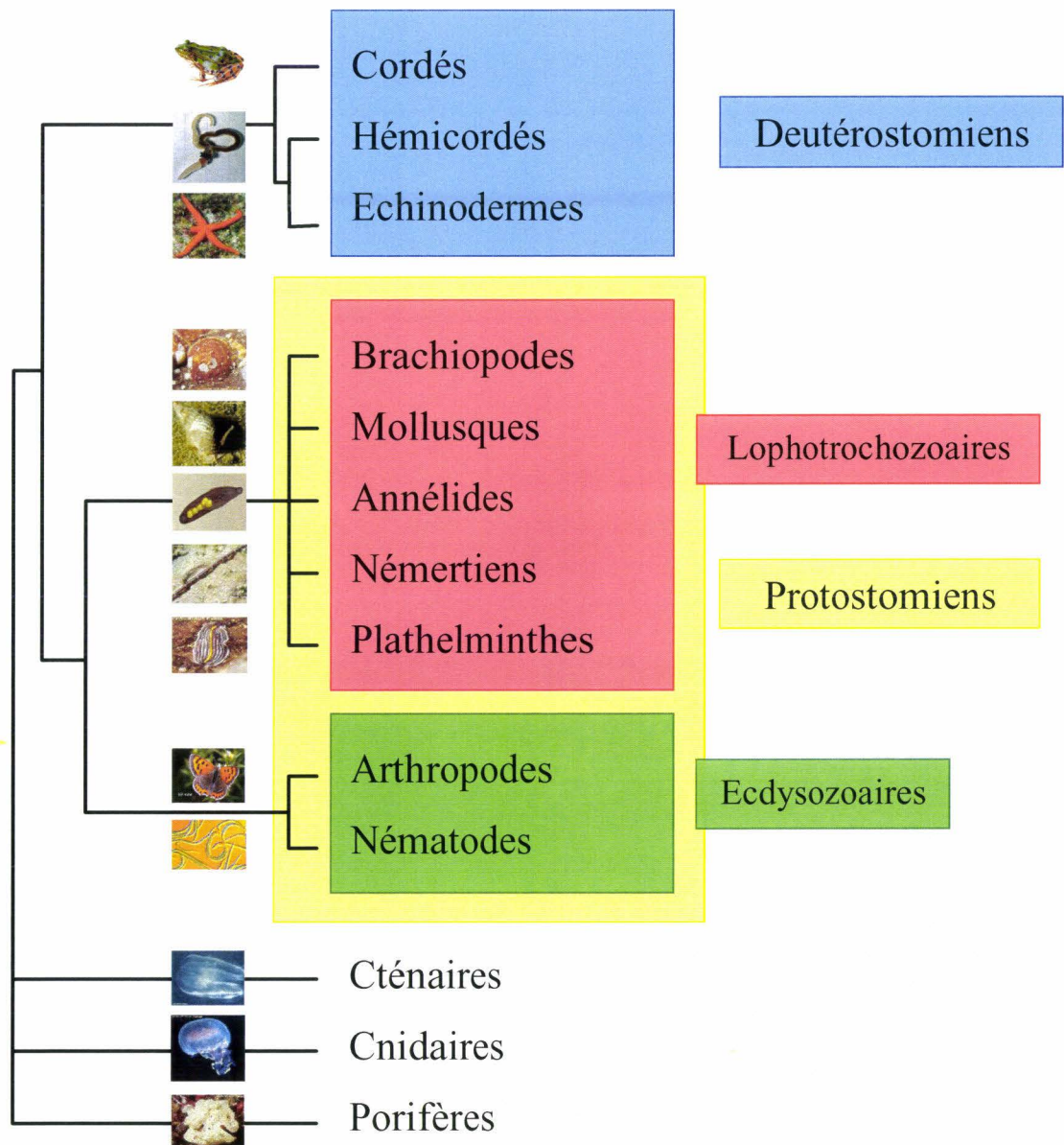


Figure 1: Arbre phylogénétique simplifié basé sur les séquences d'ARN ribosomiques et sur la famille de gènes *Hox* (modifié d'après Adoutte *et al.*, 2000)

Les nombreuses expériences réalisées chez la drosophile ont révélé que les peptides antimicrobiens ne sont pas les seuls peptides produits au cours de la réponse immunitaire. Des études comparatives ont permis d'isoler des molécules induites dans l'immunité, les DIMs, qui regroupent entre autre des peptides antimicrobiens, des enzymes, des inhibiteurs de protéases et des molécules informatives, analogues fonctionnelles des cytokines permettant l'induction de la réponse [Uttenweiler-Joseph *et al.*, 1998].

Dans le but d'appréhender de telles molécules, une première partie de notre travail fut de réaliser une approche différentielle biochimique chez *T. tessulatum*, focalisée « par défaut » sur les fractions sans activité antimicrobienne afin de caractériser les peptides libérés dans le liquide coelomique après une infection expérimentale.

Par ailleurs, outre la libération de molécules, cette stimulation expérimentale mène à l'activation transcriptionnelle de bon nombre des acteurs des voies de transduction menant à la synthèse *de novo* de molécules effectrices et à l'activation des cellules immunitaires. Les approches transcriptomiques différentielles peuvent ainsi aboutir à l'identification de nombreux gènes spécifiques de la réponse immunitaire qui constitueront autant de marqueurs dans des études morphofonctionnelles ultérieures. De telles approches déjà entreprises avec succès chez d'autres modèles invertébrés ont permis la mise en évidence de modulations d'expression de gènes codant notamment des peptides antimicrobiens, des facteurs de transcription, des enzymes protéolytiques, des inhibiteurs de protéases ou encore des protéines du cytosquelette [De Gregorio *et al.*, 2001; Irving *et al.*, 2001].

La seconde partie de notre travail a consisté à entreprendre une telle approche transcriptomique différentielle chez la sangsue. Les limites de *T. tessulatum*, telles que leur faible disponibilité au sein de l'élevage et l'absence de banques d'EST, nous ont conduit tout logiquement à mettre en oeuvre la technique comparative de *Differential Display* RT-PCR (DDRT-PCR) au sein du laboratoire.

Avant d'exposer l'ensemble des résultats que nous avons obtenus au cours de ces deux approches différentielles, nous rappellerons dans un premier chapitre les différents acteurs moléculaires et cellulaires et les différents mécanismes qui participent à l'immunité innée des Invertébrés aux Vertébrés. Nous mettrons tout particulièrement en relief les homologies mais également les singularités qui existent entre ces derniers.

Enfin nous discuterons nos résultats, leurs importance et originalité au regard des connaissances acquises à ce jour chez d'autres modèles Invertébrés, mais également de manière plus large dans le cadre des mécanismes de défense des Métazoaires. Par ailleurs nous proposerons des améliorations expérimentales pouvant être apportées à d'autres approches différentielles en perspective sur notre modèle.

Généralités

I- Les Vertébrés et l'immunité acquise.

Tout métazoaire réagit initialement à l'agression d'agents pathogènes par une réponse immunitaire que l'on nomme innée ou naturelle. Cette réponse est présente dans tout le règne animal, des invertébrés les plus simples jusqu'à l'Homme, mais aussi dans le règne végétal. Parmi les animaux, l'évolution a doté les vertébrés d'un second type de réponse immunitaire que l'on appelle acquise.

Cette réponse nécessite des cellules spécifiques aux vertébrés, les lymphocytes, et présente quatre caractéristiques qui lui sont propres (figure 2 page 7). Tout d'abord, il existe une *spécificité* de reconnaissance de milliards de structures différentes présentes au niveau d'antigènes étrangers. Cette spécificité de reconnaissance est possible grâce à la *diversité* des anticorps, des récepteurs des lymphocytes B et des récepteurs des lymphocytes T, créée par des mécanismes de recombinaisons géniques lors du développement de ces cellules. Lorsque le système immunitaire a reconnu un antigène, au cours de la réponse acquise va se développer une *mémoire* immunitaire de cet antigène. Cette mémoire se traduira, lors d'une rencontre ultérieure avec le même antigène, par une réponse immune acquise plus rapide et plus intense. La première rencontre avec un pathogène, si elle n'est pas fatale, va conférer de cette manière une immunité protectrice spécifique qui pourra subsister toute la vie. Depuis les premiers essais de Jenner, cette *mémoire* immunitaire a permis les succès de la vaccination. Enfin le système immunitaire est capable de distinguer les antigènes du *Soi* et du *non Soi*, et d'élever une réponse contre uniquement ces derniers. Le dysfonctionnement de ce dernier caractère sera à l'origine de maladies dites autoimmunes.

L'immunité naturelle et l'immunité acquise ne sont pas indépendantes l'une de l'autre. L'activation de la réponse immunitaire innée mène à la production de signaux qui stimulent et dirigent la réponse immunitaire acquise subséquente. Ces dernières années, de nombreux travaux ont mis en évidence que les cellules présentatrices d'antigènes et plus particulièrement les cellules dendritiques caractérisées chez les Mammifères, étaient à l'origine de cette communication entre les deux types de réponses immunitaires [Allison & Fearon, 2000; Pulendran *et al.*, 2001]. Les mêmes voies de signalisation cellulaire ont été mises en évidence pour cette communication inné/acquis chez les Mammifères et la réponse immunitaire innée chez la Drosophile [Hoffmann *et al.*, 1999; Lemaitre *et al.*, 1996]. Cette découverte majeure est à l'origine de ce nouvel essor dans l'étude comparative de l'immunité innée.

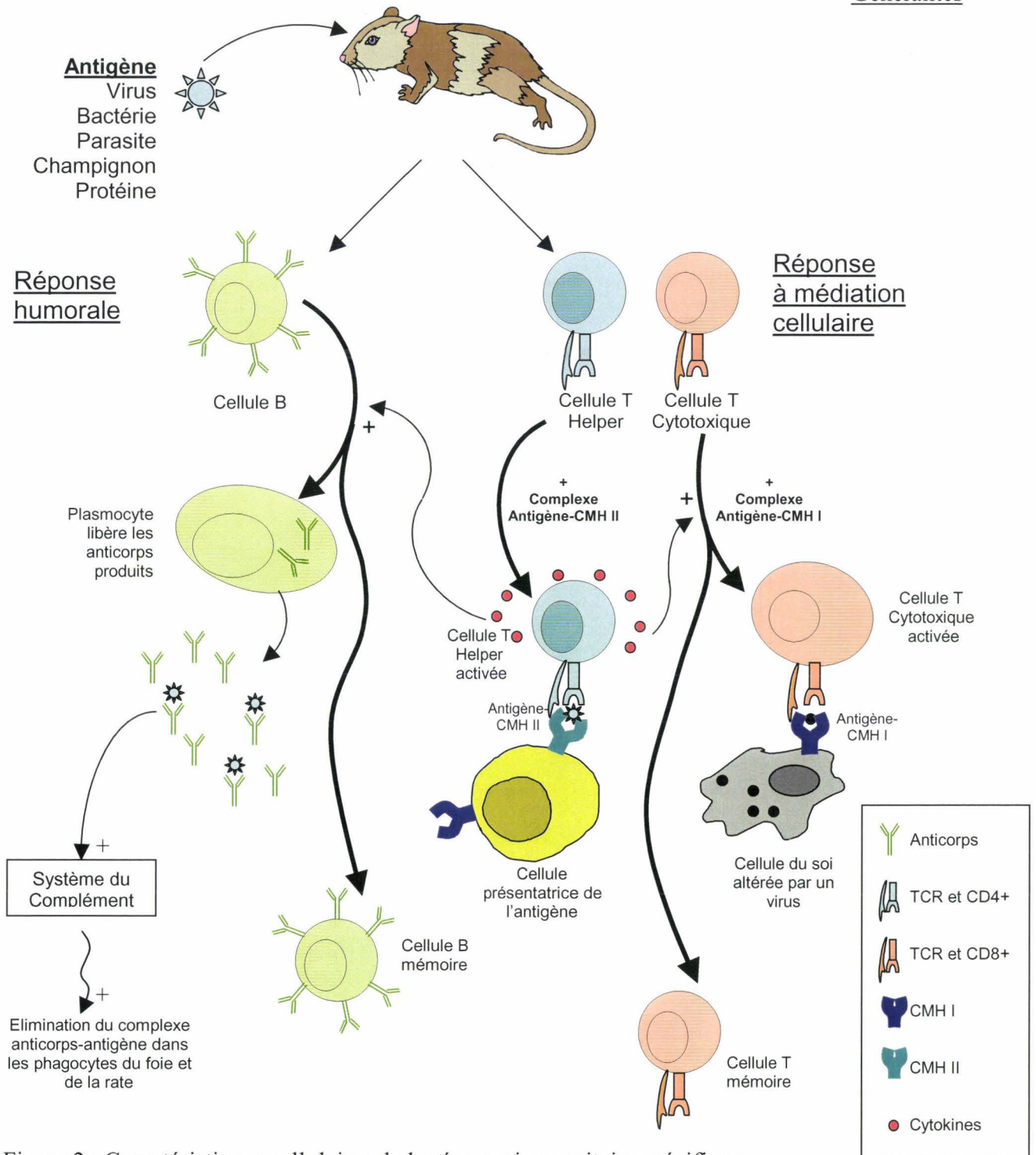


Figure 2 : Caractéristiques cellulaires de la réponse immunitaire spécifique.

Dans la réponse humorale, au contact de l'antigène et de cytokines inductrices, la cellule B spécifique se différencie en plasmocyte et sécrète l'anticorps en quantité pour éliminer l'antigène.

Dans la réponse à médiation cellulaire, les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) reconnaissent l'antigène présenté par une molécule de CMH de classe I. Les antigènes présentés sont d'origine endogène (cellule altérée par un virus ou cellule cancéreuse).

Les lymphocytes T helpers (CD4+) reconnaissent l'antigène présenté par une molécule de CMH de classe II. Ces antigènes sont d'origine exogène et sont portés par des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Ces lymphocytes T helpers vont activer d'autres cellules. Les Th1 orientent la réponse vers une immunité à médiation cellulaire (lymphocytes T cytotoxiques) alors que les Th2 l'orientent vers une immunité humorale (production d'anticorps par la différenciation des lymphocytes B). Cette orientation est principalement fonction des types de cytokines sécrétées spécifiquement par chaque lymphocyte T helper.

II- La réponse immunitaire innée chez les Vertébrés et les Invertébrés.

L'environnement extérieur n'est pas avare de micro-organismes en tout genre : bactéries Gram+, bactéries Gram-, champignons, virus, protéines étrangères et autres parasites sont autant de menaces pour un organisme qui doit alors se munir de modes de défense efficaces et rapides. Ces caractéristiques illustrent parfaitement la réponse immunitaire innée dite « naturelle ». Celle-ci, longtemps considérée comme primitive, s'est avérée, chez les Vertébrés, très complémentaire de la réponse immunitaire adaptative.

L'efficacité de ce système n'est plus à prouver car sa présence dès les premiers métazoaires et sa conservation au cours de l'évolution parlent d'elle-même. Les espèces invertébrées présentes aujourd'hui sur la planète représentent plus de 90 % des espèces animales et ce succès rencontré au cours de l'évolution dépend en grande partie des stratégies de défense adoptées par les Invertébrés.

La mise en lumière de certaines similitudes entre Vertébrés et Invertébrés apporte des indices sur les mécanismes qui ont été conservés au cours de l'évolution. Notons que, dans le domaine, les études sont loin d'être abouties et que certains points communs se révèlent au fil du temps. Ce chapitre n'a pas pour objectif de dresser une comparaison exhaustive mais de souligner les grands processus qui ont certainement fondé l'immunité chez les Vertébrés. La réponse immunitaire innée des Vertébrés apparaît comme une mosaïque de réponses immunitaires d'Invertébrés [Salzet, 2001].

L'immunité innée de certains embranchements a fait l'objet d'une étude plus avancée que d'autres. Le plus représenté dans le domaine est sans conteste celui des Arthropodes et plus particulièrement la classe des Insectes. La raison principale est l'intérêt de modèles scientifiques comme *Drosophila melanogaster* possédant de nombreux outils tant sur les plans génétique, cellulaire et moléculaire. La seconde raison tient au fait que certains insectes sont des vecteurs de maladies parasitaires humaines très importantes tel que *Anopheles gambiae*. La classe des Crustacés et l'embranchement des Mollusques ont quant à eux été étudiés principalement dans le souci de résoudre les problèmes de mortalité au sein de leur élevage, à des fins économiques.

Dans ce chapitre nous aborderons quelques exemples illustrant les similitudes entre Vertébrés et Invertébrés, des processus de reconnaissance des pathogènes jusqu'aux réponses délivrées par l'organisme hôte.

1- Les barrières physiques

Chez les Vertébrés, la peau et la surface des muqueuses ont pour fonction première de limiter l'entrée des agents pathogènes dans l'organisme. Une blessure ou une piqûre d'insecte constituent par exemple une entrée privilégiée pour tout type de pathogènes. C'est pourquoi, ces barrières physiques sont formées de couches successives de cellules épithéliales étroites. Les muqueuses, plus fragiles, sont tapissées de cils qui assurent un balayage permanent et limitent ainsi l'implantation de micro-organismes. En outre, la peau et les muqueuses génèrent des sécrétions telles que le mucus, le sébum, la salive ou encore les larmes. Ces solutions contiennent des molécules à activité antimicrobienne et des enzymes protéolytiques qui accélèrent l'élimination des pathogènes. Elles favorisent également un maintien du pH entre 3 et 5 et limitent donc la croissance des micro-organismes.

Chez les Invertébrés, les barrières physiques sont très importantes. Elles représentent leur première résistance par rapport à l'environnement. Les Insectes et les Crustacés par exemple sont recouverts d'une cuticule qui constitue déjà une barrière difficile à franchir. Les Mollusques et les Annélides entre autre ont un tégument très épais et souvent tapissé d'un mucus qui les rend moins exposés aux micro-organismes extérieurs. En plus d'une protection passive, les organismes possèdent au niveau de ces barrières des défenses actives telles que les peptides antimicrobiens ou des inhibiteurs de protéases.

2- Les molécules de reconnaissance et d'amplification

La réponse immunitaire peut agir dans l'élimination de cellules mortes et ne doit pas être considérée dans ce cas comme un danger pour l'organisme. Autrement dit, chez tous les métazoaires, le processus ne doit pas être exacerbé par une réaction inflammatoire ou par le système du complément. L'immunité innée doit être capable de distinguer le soi non infectieux (cellules du soi mortes à éliminer) du non soi infectieux (organisme étranger à éliminer rapidement) et ainsi rester en équilibre entre l'activation et l'inhibition de la réponse immune. Selon Janeway, chez les Vertébrés, la reconnaissance du non soi est fondée sur la présence de motifs caractéristiques invariants présents à la surface des parois des micro-organismes. Ces motifs appelés PAMPs (Pathogens Associated Molecular Patterns) sont

reconnus par des récepteurs appelés PRRs (Pattern Recognition Receptors) qui sont apparentés à des lectines [Janeway, 1989].

Les PAMPs sont différents en fonction de la nature du micro-organisme pathogène. Ils sont constitués entre autre par les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram-, les acides lipotéichoïques des bactéries Gram+, les glycolipides des mycobactéries, les mannanes des levures et les ARN double brins des virus.

Les récepteurs PRR de mammifères notamment sont représentés par les TLRs (Toll Like Receptor). Ces récepteurs sont les homologues de la molécule Toll de drosophile [Medzhitov *et al.*, 1997]. Les TLRs sont aujourd'hui considérés comme des PRRs car ils reconnaissent directement les motifs invariants des différents organismes pathogènes [Ozinsky *et al.*, 2000]. En revanche, nous verrons plus loin que les récepteurs Toll de drosophile ne possèdent pas la capacité de reconnaître directement ces motifs.

Les TLRs de mammifères sont en effet orientés pour chacun vers des motifs particuliers de pathogènes (figure 3 page 11). Il existe 9 types de récepteurs Toll chez l'homme, ayant tous des propriétés de reconnaissance spécifiques. TLR2 est activé par les peptidoglycanes (PGN) et les lipoprotéines bactériennes [Schwandner *et al.*, 1999]. TLR3 reconnaît spécifiquement les ARN double brin d'origine virale [Alexopoulou *et al.*, 2001]. TLR4 est principalement activé par les lipopolysaccharides (LPS) et l'acide lipotéichoïque [Poltorak *et al.*, 1998]. TLR5 reconnaît la flagelline [Hayashi *et al.*, 2001]. Quant à TLR9, il reconnaît spécifiquement les séquences CpG non méthylées de l'ADN bactérien [Hemmi *et al.*, 2000]. Ces récepteurs sont présents à la surface de nombreuses cellules. On les trouve au niveau de cellules immunitaires telles que les macrophages et les neutrophiles [Muzio *et al.*, 2000]. Ils sont présents également au niveau des cellules épithéliales intestinales et pulmonaires et au niveau des cellules endothéliales du derme. Les TLRs sont donc des éléments clés de l'immunité innée chez les Vertébrés et sont distribués à des emplacements stratégiques de l'organisme hôte. Il est intéressant de constater que des formes différentes de TLRs peuvent se dimériser pour former de nouveaux récepteurs [Ozinsky *et al.*, 2000]. Ces hétérodimères seraient formés pour augmenter la capacité et la spécificité de reconnaissance des différents types de pathogènes [Underhill & Ozinsky, 2002]. Il existe chez les Vertébrés d'autres molécules de reconnaissance pour tous les micro-organismes. Les collectines par exemple formées de domaines lectine et collagène ont un large spectre de reconnaissance et peuvent se fixer à des bactéries et même des virus [Malhotra & Sim, 1995; Thiel, 1992].

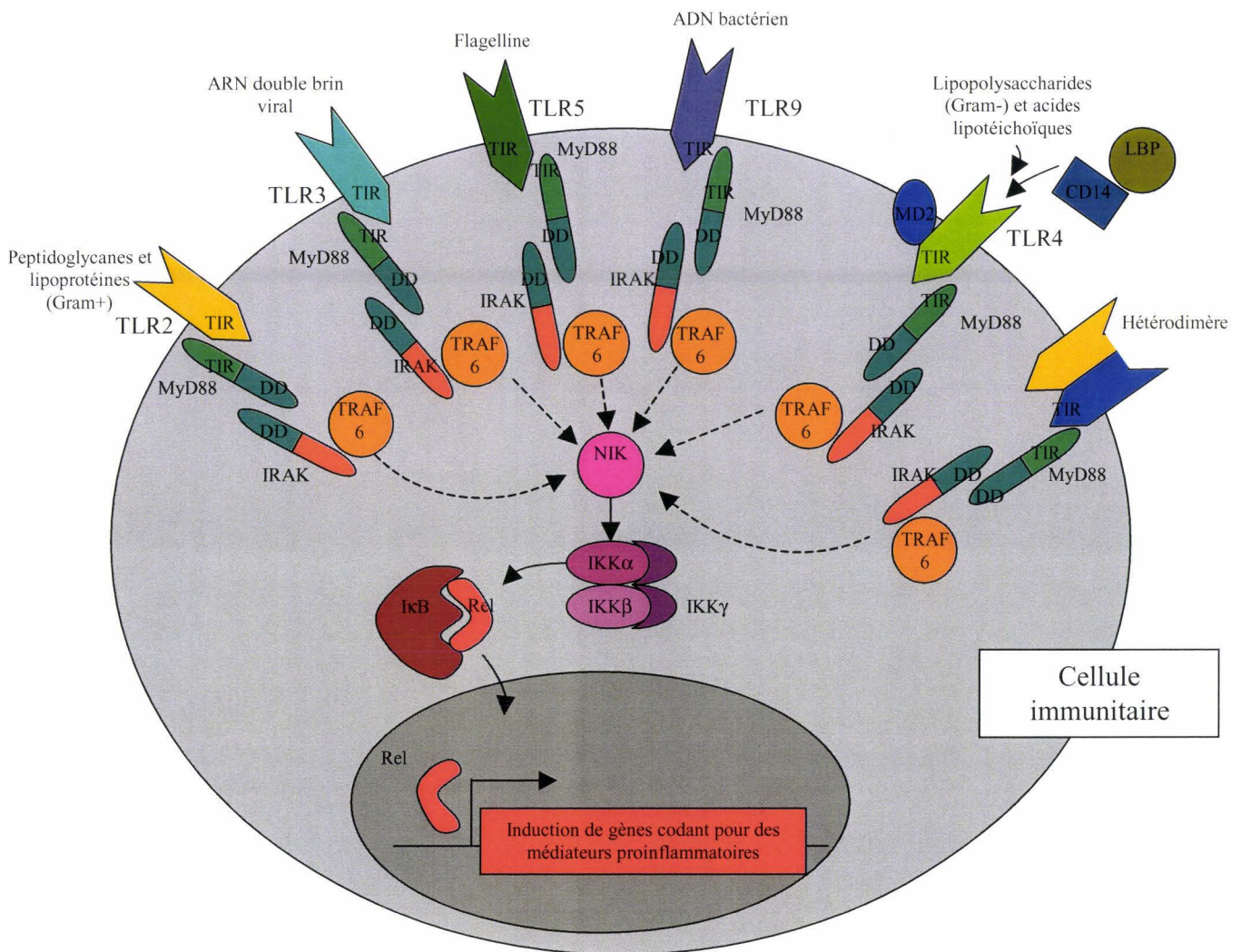


Figure 3 : Signalisation intracellulaire menant à l'induction de la réponse immunitaire innée chez les Vertébrés.

Les différents TLRs (Toll Like Receptor) de mammifères sont capables de reconnaître des motifs pathogènes particuliers. Ils peuvent également se dimériser pour augmenter leur spectre de reconnaissance.

Ils mettent en jeu des voies de transduction intracellulaire impliquant la famille des facteurs de transcription Rel.

Chez les Invertébrés, de nombreux travaux montrent l'existence de plusieurs molécules capables de reconnaître des PAMPs et de déclencher des réponses immunitaires innées.

Chez la limule *Tachypleus tridentatus*, on trouve les facteurs B et C, analogues fonctionnels des LBP (LPS Binding Protein) qui peuvent reconnaître les LPS et on trouve le facteur G ou BGBP (β -1,3 -Glucans Binding Protein) qui reconnaît les motifs β -1,3 -glucanes présents à la surface des champignons. Cette reconnaissance déclenche des cascades protéolytiques menant à la coagulation des micro-organismes par la formation d'un gel de coaguline. Ceci a pour but de limiter le déplacement du pathogène dans l'organisme hôte et de faciliter sa destruction [Muta & Iwanaga, 1996].

Les BGBP sont également connus chez l'écrevisse *Pacifastacus leniusculus* et initient les processus de mélanisation par le système prophenoloxydase [Soderhall & Cerenius, 1998]. Dans le même sens, la famille des tachylectines (TL-1 à TL-5) possédant des domaines de type lectine chez la limule permet de reconnaître les carbohydrates à la surface des pathogènes [Inamori *et al.*, 1999; Iwanaga *et al.*, 1998]. Elles agissent comme des agglutinines et participent à la coagulation et l'opsonisation des pathogènes. Ces molécules sont produites directement par les hémocytes circulants [Kawabata & Iwanaga, 1999]. Il en est de même pour l' α 2-macroglobuline et la CRP (C Reactive Protein) qui jouent toutes deux le rôle d'agglutinines. Elles participent à l'opsonisation en recrutant les hémocytes circulants [Iwaki *et al.*, 1999].

D'autres facteurs de reconnaissance et d'opsonisation ont été isolés. Chez la lymnée *Lymnea stagnalis*, il existe l'hémoline [Hoek *et al.*, 1996]. Chez le papillon *Bombyx mori*, il existe la GGBP (GRAM Negative bacteria Binding Protein) qui est dirigée vers la détection des bactéries Gram-. Elle présente des homologies de séquence avec le CD14 de Vertébrés [Lee *et al.*, 1996]. En outre, des études portant sur les modulations transcriptionnelles induites dans l'immunité innée des insectes montrent que des gènes codant pour les GGBP sont induits lors d'une infection microbienne expérimentale [Dimopoulos *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996]. Chez la drosophile également, de nouvelles molécules apparentées aux GGBP présentent une induction après piqûre septique [De Gregorio *et al.*, 2001].

Les protéines de reconnaissance des peptidoglycanes (PGRP) jouent également un rôle dans la détection des micro-organismes [Yoshida *et al.*, 1996]. Leur grande conservation jusqu'aux mammifères leur confère une place importante dans les processus de reconnaissance de l'immunité innée [Kang *et al.*, 1998]. De récents travaux semblent leur donner une importance encore plus grande dans la reconnaissance des bactéries et l'activation

des voies Toll et Imd chez la drosophile (figure 4 page 18) [Gottar *et al.*, 2002; Michel *et al.*, 2001; Ramet *et al.*, 2002].

Enfin, des travaux réalisés chez un annélide, le ver de terre *Eisenia fetida fetida* ont montré l'existence d'un analogue fonctionnel du TNF de mammifère appelé CCF-1 (*Cœlomic Cytolytic Factor-1*). Il est capable de déclencher l'effet lytique menant à la destruction du parasite *Trypanosoma cruzi* et serait présent dans le liquide coelomique du ver de terre. Il active le système prophenoloxydase à la suite de la reconnaissance de motifs présents sur le parasite [Olivares Fontt *et al.*, 2002].

A la suite de la reconnaissance d'éléments étrangers, des processus moléculaires et cellulaires sont déclenchés afin d'amplifier la réponse immunitaire.

Les Vertébrés possèdent un arsenal moléculaire qui initie la réaction inflammatoire. En effet, l'invasion d'un corps étranger déclenche aussitôt la synthèse de bradykinine [Benton *et al.*, 1989]. Celle-ci augmente la perméabilité vasculaire et favorise le recrutement de cellules sanguines et notamment des phagocytes.

La lésion de l'endothélium vasculaire complète ce processus car elle induit l'adhésion des plaquettes qui libèrent des substances vaso-actives (histamine). Les anaphylatoxines du complément générées par la voie alterne (au contact des parois bactériennes) vont provoquer la dégranulation des mastocytes présents sur le site d'infection et renforcent la libération de substances vaso-actives. Les mastocytes sont les principales cellules impliquées dans l'initiation et l'amplification de la réaction inflammatoire. Elles libèrent des médiateurs d'origine granulaire (histamine) et d'origine membranaire (prostaglandines et leucotriènes). Ces médiateurs entretiennent la réaction mais vont également déclencher une régulation spécifique. En effet, certains leucotriènes sont des facteurs chimiotactiques qui attirent les polynucléaires éosinophiles sur le site infectieux afin de contrôler l'intensité de la réaction inflammatoire (manque de ce contrôle dans le cas d'allergies) [Gryglewski, 1981]. Tout est mis en œuvre pour permettre le renfort d'autres cellules effectrices de l'immunité innée et pour amplifier le processus naturel principal qu'est la phagocytose.

Le système du complément tient également une place très importante dans l'initiation de la réaction inflammatoire et de la phagocytose. La voie alterne est activée par la reconnaissance non spécifique des parois de bactéries, de parasites ou des cellules infectées par un virus. L'apparition d'une C3 convertase clive le fragment C3 en C3a et C3b. Alors que

C3a informe et attire les phagocytes, C3b adhère à la particule cible et favorise la fixation des phagocytes grâce à la présence, à leur surface, du récepteur de C3b. Ceci renforce la phagocytose et participe à l'opsonisation [Wrigley & Saluk, 1981]. La C3 convertase poursuit son action en clivant le fragment C5 en C5a puissant facteur chimiotactique qui se fixe aux phagocytes et en C5b qui adhère à la cible. Cela entraîne la formation des autres facteurs du complément (C6, C7, C8 et C9) qui induisent la lyse de la cellule étrangère.

Il existe une voie d'activation dépendante des lectines qui repose sur les MBP (Mannose Binding Protein). Cette reconnaissance des motifs pathogènes par les MBP déclenche l'activation de protéases appelées MASP (*MBP Associated Proteases*) qui activent à leur tour la C3 convertase. Cette dernière réalise alors la maturation du complément [Matsushita & Fujita, 1992].

Ce système du complément est donc très important dans le dispositif d'activation de la réponse innée. Il participe à de nombreux processus tels que la reconnaissance des pathogènes, le recrutement des phagocytes sur le site infectieux, l'opsonisation et la destruction des micro-organismes étrangers. Toutefois, il est nécessaire de contrôler ces réactions afin de ne pas engendrer de réponse exacerbée contre des tissus du soi. Les cascades d'activation du complément nécessitant de nombreuses sérine-protéases, ce contrôle fait donc appel à des inhibiteurs tels que les serpinés (inhibiteurs de sérine protéases) [Potempa *et al.*, 1994].

Chez les Invertébrés, des travaux récents obtenus chez la drosophile [Lagueux *et al.*, 2000] montrent l'existence de quatre molécules contenant des domaines thiolester appelées dTEP 1 à 4 (*drosophila Thiolester containing Proteins*) apparentées à la superfamille des molécules C3/ α 2-macroglobuline. Leurs gènes présentent une augmentation d'expression après une infection bactérienne. Des mutants de drosophile présentant une perte de fonction du gène codant pour Toll ne sont plus capables d'induire l'expression du gène codant pour dTEP1. De même, la mutation gain de fonction du gène codant pour Toll restaure de manière constitutive l'expression de dTEP1.

D'autres études ont complété ces données en apportant l'évidence de l'existence de molécules apparentées au complément chez le moustique *Anopheles gambiae* [Levashina *et al.*, 2001]. Ce facteur appelé aTEP-1 présente aussi des similitudes structurales et fonctionnelles avec le facteur C3 du complément des mammifères.

Par conséquent chez les protostomiens, toutes les molécules isolées sont déjà orientées vers la détection de pathogènes précis. Elles déclenchent ensuite des processus de recrutement

des phagocytes et d'opsonisation. Certaines d'entre elles pourraient représenter des formes ancestrales des mécanismes de reconnaissance et de système apparenté au complément existant chez les Vertébrés.

Chez les Deutérostomiens, des facteurs d'agglutination ont été isolés chez les Echinodermes. Les hémolysines par exemple ont été trouvées chez l'étoile de mer *Asteria forbesis* [Leonard *et al.*, 1990] et le concombre de mer *Holothuria polii* [Gross *et al.*, 1999]. Un facteur apparenté au facteur C3 du complément de Vertébrés a été isolé chez l'étoile de mer *Strongylocentrotus purpuratus* [Gross *et al.*, 1999]. Ces données semblent démontrer l'existence d'un système du complément ancestral [Nonaka, 2001].

3- L'induction de médiateurs

Chez les Vertébrés, les TLRs déclenchent des voies de transduction intracellulaires qui aboutissent à l'induction de gènes codant pour certains médiateurs proinflammatoires.

Le cas des bactéries Gram- notamment est assez largement étudié pour le choc septique que ces bactéries peuvent provoquer. Le motif invariant reconnu est constitué par les LPS (ou endotoxine). Des protéines du plasma se lient spécifiquement aux LPS et sont appelées les LBP (LPS Binding Protein) [Tobias *et al.*, 1986]. La formation de ce complexe LPS-LBP est très rapide et provoque la reconnaissance d'une autre molécule : le CD14 qui se fixe sur la molécule de LPS [Ulevitch & Tobias, 1999]. Le CD14 assure alors le lien avec le phagocyte et déclenche un mécanisme d'activation intracellulaire médié via un récepteur apparenté à Toll (TLR). La formation de ce complexe serait stabilisée par la protéine accessoire MD2 [Sato *et al.*, 2000]. La reconnaissance du motif LPS induit une voie de transduction par le TLR4. Comme toute la famille des TLR, ce récepteur possède un domaine cytoplasmique de type TIR (*Toll IL-1 Receptor*) qui communique avec un adaptateur MyD88 [Hultmark, 1994]. Le domaine DD (*Death Domain*) de MyD88 interagit avec celui de la protéine kinase (IRAK) [Muzio *et al.*, 1997]. Celle-ci déclenche une cascade de phosphorylation faisant intervenir successivement TRAF-6 (*TNF Receptor Associated Factor-6*), NIK (*NF- κ B Inducing Kinase*) et plusieurs sous unités de IKK (I κ B Kinase). IKK va phosphoryler I κ B et permettre la libération de NF- κ B. I κ B est dégradé et NF- κ B subit une translocation nucléaire afin d'induire l'expression de certains gènes [Rock *et al.*, 1998]. Cette cascade de transduction intracellulaire est reprise par tous les TLRs (figure 3 page 11). Elle met en jeu des facteurs de transcription de la famille Rel et mène à l'induction de la

phagocytose et à la libération de médiateurs proinflammatoires [Underhill *et al.*, 1999]. Ces médiateurs sont divers et regroupent notamment le TNF α , les interférons (IFNs) et des enzymes telles que la NADPH oxydase impliquée dans les mécanismes oxydatifs de la phagocytose. Il semble que ces inductions impliquent aussi les gènes codant des peptides antimicrobiens de type β -défensine [Diamond *et al.*, 1996]. Récemment, il a été démontré que dans les macrophages murins, l'activation de TLR2 par *Mycobacterium tuberculosis* menait à la destruction du pathogène intracellulaire via le mono oxyde d'azote [Thoma-Uszynski *et al.*, 2001].

Il faut remarquer que la reconnaissance des LPS n'implique pas toujours les mêmes molécules. Dans les lymphocytes B, MD2 serait remplacée par deux autres protéines accessoires qui sont MD1 et RP105 [Miyake *et al.*, 1995].

Comme nous l'avons déjà décrit auparavant, les différents TLRs ne reconnaissent pas les mêmes motifs pathogènes (figure 3 page 11). En revanche, les voies intracellulaires semblent être très bien conservées. La famille Rel à laquelle appartient NF- κ B permet de déclencher la production de nombreuses molécules défensives. Nous traiterons de ces molécules dans le paragraphe consacré aux effecteurs de l'immunité innée.

Les similitudes les plus caractéristiques observées entre les Vertébrés et les Invertébrés concernent ces voies de transduction menant à l'induction de certains médiateurs de l'immunité innée.

Il est depuis quelques années possible d'établir un parallèle moléculaire entre les voies d'induction de peptides antimicrobiens chez la Drosophile et celles qui aboutissent à l'expression de médiateurs proinflammatoires chez les Vertébrés [Hoffmann *et al.*, 1996; Lemaitre *et al.*, 1996]. En effet, Petersen et coll. ont découvert que les gènes codant les peptides antimicrobiens isolés chez la mouche *Drosophila melanogaster* ont des promoteurs qui sont régulés par des facteurs de transcription de la famille Rel à laquelle appartient NF- κ B [Petersen *et al.*, 1995].

Dans l'étude des nombreux peptides antimicrobiens isolés (drosomycine, cécropine, diptéricine, drosocine, attacine, défensine et metchnikovine) chez la drosophile, deux voies de régulation de l'expression de ces peptides ont été mises en évidence [Hoffmann & Reichhart, 2002]. Ces voies sont les voies Toll et Imd. Elles contrôlent toutes deux l'expression des gènes codant la cécropine, l'attacine, la metchnikovine et la défensine. En revanche, Toll

contrôle spécifiquement l'expression du gène codant la drosomycine et Imd contrôle celle de la drosocine et de la diptéricine (figure 4 page 18).

Toll est activé par les bactéries Gram+ et les champignons. Cette voie induit l'expression spécifique de la drosomycine [Fehlbaum *et al.*, 1994]. Cette voie requiert deux adaptateurs que sont TUBE et MyD88 et qui vont activer une protéine kinase qui est PELLE [Belvin & Anderson, 1996]. Il subsiste des inconnues dans cette voie mais cela mène à la dégradation de Cactus (analogue de IκB) et à la libération de Dif membre de la famille NF-κB qui induit spécifiquement le gène codant la drosomycine (figure 4 page 18) [Meng *et al.*, 1999].

La présence du récepteur Toll a été démontrée chez d'autres Invertébrés comme la Limule *Limulus polyphemus* mais son rôle reste obscur [Iwanaga, 2002]. Le ver nématode *Caenorhabditis elegans* a fait l'objet d'études similaires. Il a été montré qu'un analogue de Toll de Drosophile appelé tol-1 possède un rôle fondamental pour le développement du ver et pour la reconnaissance des pathogènes [Pujol *et al.*, 2001]. Cet analogue tol-1 serait primordial dans la reconnaissance des bactéries et favoriserait un comportement d'évitement de l'animal en présence de certains types de bactéries. Ce processus suggère une stratégie de « fuite » du ver face aux pathogènes plutôt qu'une stratégie de défense développée chez d'autres organismes.

Par ailleurs, dans la voie Toll de drosophile, des sérines protéases et des inhibiteurs de sérine protéases sont impliqués dans l'activation de la protéine Spaetzle qui elle-même active Toll [Levashina *et al.*, 1999]. Ces inhibiteurs de sérine protéases possèdent de nombreuses actions dans les mécanismes défensifs des Vertébrés et des Invertébrés. La reconnaissance des bactéries Gram+ par la voie Toll requiert des protéines de type PGRP-SA (soluble) et semble en effet reposer sur l'action de protéases qui réalisent la maturation de Spaetzle [Michel *et al.*, 2001].

La voie Imd est déclenchée par les bactéries Gram-. Elle fait intervenir une protéine kinase TAK1 (TGFβ-activated kinase), un complexe IKK, une caspase Dredd et enfin un membre de la famille NF-κB qui est Relish [Khush *et al.*, 2001]. Cette voie est responsable de l'induction spécifique de la diptéricine et de la drosocine [Lemaitre *et al.*, 1995]. De récents travaux ont fait état de l'importance des protéines de reconnaissance de peptidoglycanes membranaires (PGRP-LC) dans la détection des bactéries Gram- et le déclenchement de la voie Imd [Gottar *et al.*, 2002; Ramet *et al.*, 2002].

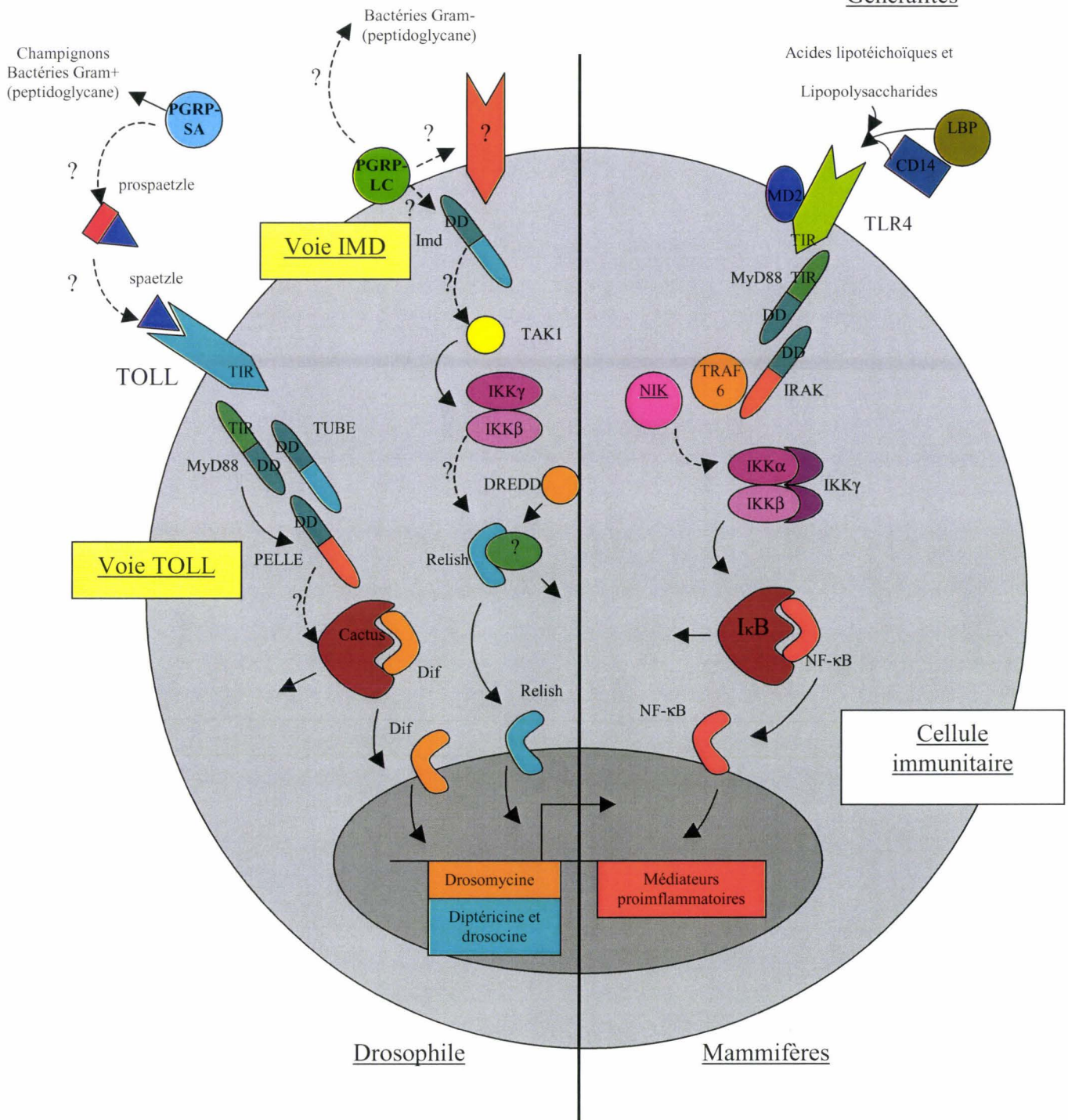


Figure 4 : Parallèle entre les voies de signalisation chez la Drosophile et les Mammifères.

Chez la Drosophile, Toll est activé par les bactéries Gram+ et les champignons. Cette voie induit l'expression spécifique de la drosomycine. La voie Imd est déclenchée par les bactéries Gram- via un récepteur encore inconnu. Elle est responsable de l'induction spécifique de la diptéricine et de la drosocine. Les deux voies sont impliquées dans l'induction des gènes de défense, attacine, metchnikovine et cécropine. Les PGRP (Peptidoglycan Recognition Protein) semblent impliquées dans la reconnaissance des bactéries au sein des deux voies même s'il ne s'agit pas des mêmes molécules (PGRP-SA est soluble alors que PGRP-LC est membranaire).

Les molécules impliquées dans ces voies sont à mettre en parallèle avec la voie NF-κB des cellules immunitaires de mammifères menant à l'induction des gènes codant pour des médiateurs proinflammatoires. L'exemple de TLR4 est repris ici. Ces molécules sont entre autre des cytokines, des enzymes et aussi des peptides antimicrobiens.

Par conséquent, les mécanismes d'induction intracellulaire des différents effecteurs de l'immunité innée semblent très bien conservés et permettent d'établir un parallèle très intéressant entre l'immunité innée des Vertébrés et celle des Invertébrés.

4- Les réponses de l'immunité innée

4.1- La réponse humorale

La réponse humorale regroupe l'ensemble des molécules défensives qui ont une action extracellulaire. Parmi elles, il y a des molécules qui vont amplifier et orienter la réponse immunitaire innée et il y en a d'autres qui auront une activité biologique afin de participer à la destruction des éléments pathogènes.

4.1.1- Les médiateurs de la réponse humorale

Chez les Vertébrés, les voies de transduction déclenchées après reconnaissance de motifs pathogènes mènent à la production de médiateurs tels que des cytokines proinflammatoires.

Les cellules immunitaires activées sécrètent l'interleukine 1 (IL-1) qui possède une activité pléiotrope. Elle agit tout d'abord au niveau nerveux dans l'hypothalamus pour élever la température corporelle. L'effet pyrogène inhibe la croissance des micro-organismes, augmente la mobilité des granulocytes et induit la production d'interférons [Hori *et al.*, 1989]. L'IL-1 active ensuite les cellules hépatiques qui produisent la protéine C et d'autres protéines de l'inflammation. La protéine C se fixe entre autre sur les parois bactériennes et facilite la phagocytose. L'IL-1 active enfin les cellules NK (Natural Killer) que nous verrons ensuite dans la réponse cellulaire [Conti *et al.*, 1991].

Les phagocytes sécrètent également le TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*) qui induit également les cellules de l'immunité spécifique, une augmentation de la température corporelle, une synthèse hépatique des protéines de l'inflammation et il renforce enfin l'activité phagocytaire des polynucléaires.

Enfin, les interférons (IFNs) sont un ensemble de glycoprotéines qui assurent une réponse anti-virale préventive. Sécrétés par des cellules infectées par un virus, les IFNs se fixent aux cellules saines voisines par un récepteur spécifique. Ils alertent des systèmes

enzymatiques qui empêcheront l'expression du matériel génétique du virus en cas d'invasion [Kato & Minagawa, 1981; Weck *et al.*, 1981]. Les IFNs sont aussi des pyrogènes et renforcent la cytotoxicité des macrophages et des cellules NK (impliquées dans l'élimination des cellules infectées par un virus et des cellules cancéreuses).

Ces médiateurs représentent une deuxième phase de la réponse en contribuant à entretenir la réaction inflammatoire, à recruter les cellules immunitaires spécifiques et à orienter la réponse immunitaire spécifique.

4.1.2- Les effecteurs humoraux

Parmi les effecteurs humoraux, les peptides antimicrobiens tiennent une place importante. Ils sont présents au niveau des barrières physiques. Ceux-ci sont les premiers à jouer un rôle dans l'immunité innée car ils sont les premiers à rencontrer l'organisme étranger.

Chez les Vertébrés, on y trouve les α -défensines des cellules de Paneth appelées également les cryptdines. Ces cellules sont des granulocytes de l'épithélium intestinal qui relarguent plusieurs molécules dans la lumière. De nombreux gènes codant pour les cryptdines ont été isolés chez l'homme [Jones & Bevins, 1993] et la souris [Ouellette *et al.*, 1994]. Ces cryptdines sont stockées dans des granules et sont libérées dans la lumière intestinale. Elles vont y assurer une fonction antimicrobienne. Elles auraient en plus d'une action microbicide la faculté de réguler les flux ioniques [Lencer *et al.*, 1997].

Il existe également des défensines de type β dans les épithélia et les muqueuses appelées HBD chez l'homme [Lehrer & Ganz, 2002]. A l'inverse des cryptdines, les β -défensines ne sont pas stockées dans des granules cytoplasmiques. Leur variation dépendra donc exclusivement de l'induction d'expression de leur gène. Les gènes des β -défensines seraient induits par le TNF- α et par les LPS des bactéries GRAM négatif [Diamond *et al.*, 1996]. La voie de transduction menant à cette induction serait déclenchée par le CD14.

Les β -défensines sont présentes dans beaucoup d'épithélia tels que l'épiderme, les poumons, la trachée et les intestins. Leur action est cruciale dans ces barrières physiques et notamment dans les sécrétions à la surface des muqueuses [Tarver *et al.*, 1998; Valore *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 1996].

La mucoviscidose l'illustre parfaitement. Elle est caractérisée par une très forte concentration de chlore dans le mucus à la surface des épithélia trachéal et bronchique causée

par des mutations sur le gène codant un canal chlore. Cette concentration anormale affecte les activités des β -défensines dans les voies aériennes ce qui explique les infections chroniques des patients atteints par cette maladie [Bals *et al.*, 1998; Goldman *et al.*, 1997].

D'autres peptides antimicrobiens tels que les cathélicidines et les HNP (Human Neutrophil Protein) peuvent être également relargués dans le milieu extracellulaire. Elles perdraient alors leur activité antimicrobienne pour avoir d'autres fonctions, notamment chimio-attractantes [Chertov *et al.*, 1996; Territo *et al.*, 1989]. La forme non mature de Bac7 aurait une faculté de chimiotactisme sur les monocytes et la forme non mature de Bac5 serait un inhibiteur de la Cathepsine L qui est une cystéine protéase agissant dans la réaction inflammatoire [Verbanac *et al.*, 1993].

Chez les Vertébrés, des peptides de la famille des protégrines participeraient à la maturation et la libération d'IL-1 β par les monocytes [Perregaux *et al.*, 2002]. Enfin, les β -défensines seraient capables de se fixer à des récepteurs de chémokines comme CCR6 [Yang *et al.*, 1999]. Cela suppose alors que les peptides antimicrobiens ont des fonctions immunitaires bien plus diverses que leur activité dirigée contre les micro-organismes. Des fonctions supplémentaires des peptides antimicrobiens restent donc à élucider et semblent avoir une importance dans l'entretien de la réponse.

Chez les Invertébrés, les peptides antimicrobiens représentent une part importante des molécules défensives. Ces peptides ont été isolés dans un très grand nombre d'espèces.

Chez les Arthropodes insectes, la Drosophile contient toute une série de molécules abordées dans le paragraphe précédent [Hoffmann & Reichhart, 2002]. Ces molécules défensives sont produites dans un organe spécialisé qui est le corps gras et dans les épithélia. Il a été montré que ces peptides sont ensuite libérés puis distribués dans la majorité des tissus de l'insecte [Tzou *et al.*, 2000]. La production de cécropines et de défensines est également mise en évidence chez le moustique *Aedes aegypti* [Lowenberger, 2001]. Le moustique *Anopheles gambiae* contient également des peptides antimicrobiens tels que la gambicine [Vizioli *et al.*, 2001] et la défensine [Dimopoulos *et al.*, 1997]. Ces travaux présentent un intérêt d'autant plus important qu'ils sont liés de manière directe à des maladies humaines puisque les moustiques sont vecteurs de parasites.

Chez les Arthropodes chelicérates, la limule *Tachypleus tridentatus* possède des molécules propres comme les tachyplelines, les tachystatines, les polyphemusines, la Big défensine ou encore la tachycitine [Iwanaga, 2002].

Chez les Mollusques, la moule *Mytilus galloprovincialis* possède également plusieurs peptides antimicrobiens tels que les défensines, les myticines et les mytilines [Mitta *et al.*, 1999; Mitta *et al.*, 2000a; Mitta *et al.*, 2000b].

Enfin chez les Annélides, au sein du laboratoire, des travaux ont permis d'isoler chez la sangsue *Theromyzon tessulatum* un peptide antibactérien nommé la Théromacine [Tasiemski *et al.*, 2002]. Ce peptide ne présente aucune homologie de séquence avec les autres molécules isolées précédemment. L'expression de son gène est localisée dans un tissu spécifique contenant des cellules très riches en globules lipidiques. Ce tissu pourrait être apparenté au corps gras de la drosophile. En outre, ce gène est inductible très rapidement par une infection bactérienne Gram+ et Gram-. Le peptide est rapidement libéré dans le liquide coelomique afin de mener une réponse humorale active contre les pathogènes injectés.

Plutôt qu'une liste exhaustive des molécules connues à ce jour, les peptides choisis ici permettent d'illustrer la conservation de certains peptides entre les embranchements et de montrer qu'au contraire, certaines espèces ont pu développer des molécules propres, conséquence probable d'autres facteurs comme l'environnement proche et le cycle de vie de chaque individu. Les actions peuvent varier selon les peptides antimicrobiens. Ils peuvent soit former des pores dans les parois, ce qui aboutit à la destruction du micro-organisme soit stopper leur division. Ils sont présents dans de nombreux compartiments de l'organisme, notamment toutes les barrières physiques telles que les cellules épithéliales de la peau et des muqueuses ainsi que les sécrétions (salive, mucus etc.) [Lehrer & Ganz, 1999]. Ces peptides possèdent des activités dirigées contre les micro-organismes dans le but d'empêcher leur développement au sein de l'organisme hôte. Nous verrons dans la réponse cellulaire que certains d'entre eux agissent au sein du phagocyte et participent, aux côtés des enzymes lysosomales et des mécanismes oxydatifs, à la dégradation du pathogène internalisé.

Parmi les facteurs humoraux de la réponse immunitaire innée, on trouve également les inhibiteurs de protéases. Ces inhibiteurs interviennent à plusieurs niveaux dans la réponse immunitaire innée.

Chez les Invertébrés, ils peuvent avoir une action directe sur les protéases de pathogènes. Dans l'immunité des Arthropodes, les inhibiteurs de protéases appelés FPI (Fungal Proteinases Inhibitor) de *Bombyx mori* sont actifs sur les protéases des champignons [Eguchi, 1993]. Des inhibiteurs de sérine protéases, les serpinines, inhibent directement ce type d'enzymes présents chez les pathogènes.

Les serpines ont des actions diverses. Présentes dans les granules des hémocytes chez les Arthropodes par exemple, elles ont un rôle régulateur dans la formation du gel de coaguline chez la limule [Miura *et al.*, 1994]. Elles régulent tout comme l' α -macroglobuline le système Prophenoloxydase chez de nombreux insectes en inhibant les enzymes qui participent à sa maturation en mélanine. Ceci assure une réponse adaptée en fonction de l'abondance des pathogènes présents.

En outre, il est bien établi aujourd'hui que la voie Toll menant à l'induction de gènes codant pour des peptides antimicrobiens chez la drosophile requiert la maturation d'un précurseur prospätzle en spätzle [Levashina *et al.*, 1999]. Les processus aboutissant au déclenchement de cette voie restent encore à découvrir. En revanche, on sait qu'elle fait appel à des sérine-protéases et à leurs inhibiteurs spécifiques [Levashina *et al.*, 1999].

La balance entre les protéases et leurs inhibiteurs spécifiques semble donc jouer un rôle important dans l'initiation et la régulation des mécanismes immunitaires [Kanost, 1999].

4.2- La réponse cellulaire

La réponse cellulaire met en jeu une immunité fondée sur l'action de cellules spécialisées. Ces cellules ont pour fonction de détruire les éléments pathogènes.

4.2.1- Les cellules tueuses des Vertébrés

Chez les Vertébrés, la particularité des cellules Killer (K) est de posséder des récepteurs aux parties Fc des Immunoglobulines G (IgG) de sorte que lorsqu'une cellule K rencontre un complexe anticorps-antigène, elle élimine aussitôt de manière non spécifique l'antigène. Cette reconnaissance n'est pas spécifique dans le sens où elle ne tient pas compte de la nature de l'antigène mais de sa fixation avec l'anticorps. Cette réponse s'appelle l'ADCC (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) c'est à dire la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps [Zigheboim *et al.*, 1973; Zigheboim *et al.*, 1974].

D'autres cellules possèdent des fonctions de cellules tueuses. Les cellules Natural Killer (NK) sont des lymphocytes ni B ni T qui n'adhèrent pas et ne phagocytent pas [Kiessling *et al.*, 1975a; Kiessling *et al.*, 1975b]. En revanche, elles possèdent des récepteurs pour les interférons (IFNs) et pour les interleukines 1 et 2 (IL-1 et IL-2). Ces cytokines permettent l'activité des cellules NK. Celles-ci détruisent des cibles de manière non spécifique comme les cellules K [Flad *et al.*, 1974; Nabholz *et al.*, 1974]. Les cibles sont des

cellules altérées du soi (cellules cancéreuses ou des cellules infectés par un virus). Les mécanismes d'élimination reposent sur quelques molécules clés comme les perforines qui font des trous dans la membrane de la cellule cible. Ensuite des sérines protéases comme les granzymes pénètrent dans la cellule malade et induisent son apoptose.

4.2.2- La phagocytose

L'essentiel de la réponse immunitaire innée cellulaire repose sur le phénomène de phagocytose.

Chez les Vertébrés, plusieurs types cellulaires sont capables de phagocyter. Les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) en font partie avec une prédominance pour les neutrophiles dont l'activité phagocytaire est déterminante.

La phagocytose est en grande partie assurée par les macrophages tissulaires. Ce sont des monocytes circulants qui, en s'établissant dans un tissu particulier, ont adopté des caractéristiques morphologiques spécifiques.

Le phénomène de phagocytose est rarement direct. Les cellules spécialisées sont attirées sur le site infectieux par le pouvoir chimiotactique de certaines molécules déjà présentes. Ce recrutement est souvent déclenché par des opsonines issues de la réponse humorale spécifique (anticorps), de la réaction inflammatoire et du complément qui se fixent à l'antigène. Le phagocyte qui possède des récepteurs aux opsonines peut alors reconnaître plus rapidement la cible et s'y fixer. Cela représente le phénomène d'opsonisation. Le processus de phagocytose peut alors commencer.

La phagocytose est principalement assurée par les monocytes circulants, les polynucléaires neutrophiles et les macrophages des tissus [Greenberg & Grinstein, 2002]. L'antigène adhère alors à la membrane plasmique du phagocyte. Cela déclenche la formation de pseudopodes (figure 5 page 25) qui entourent puis englobent l'antigène.

4.2.2.1- Les enzymes hydrolytiques et les mécanismes oxydatifs

La fusion des pseudopodes forme le phagosome. En se déplaçant vers l'intérieur, il fusionne avec un lysosome pour former le phagolysosome.

Chez les Vertébrés et les Invertébrés, les enzymes lysosomales entrent en contact avec le pathogène et favorisent tout comme le pH acide sa dégradation rapide. Ces enzymes

- ☀ Elément pathogène
- Fragment de pathogène
- Y Molécule de CMH de classe II
- ⚙ Enzymes lysosomales

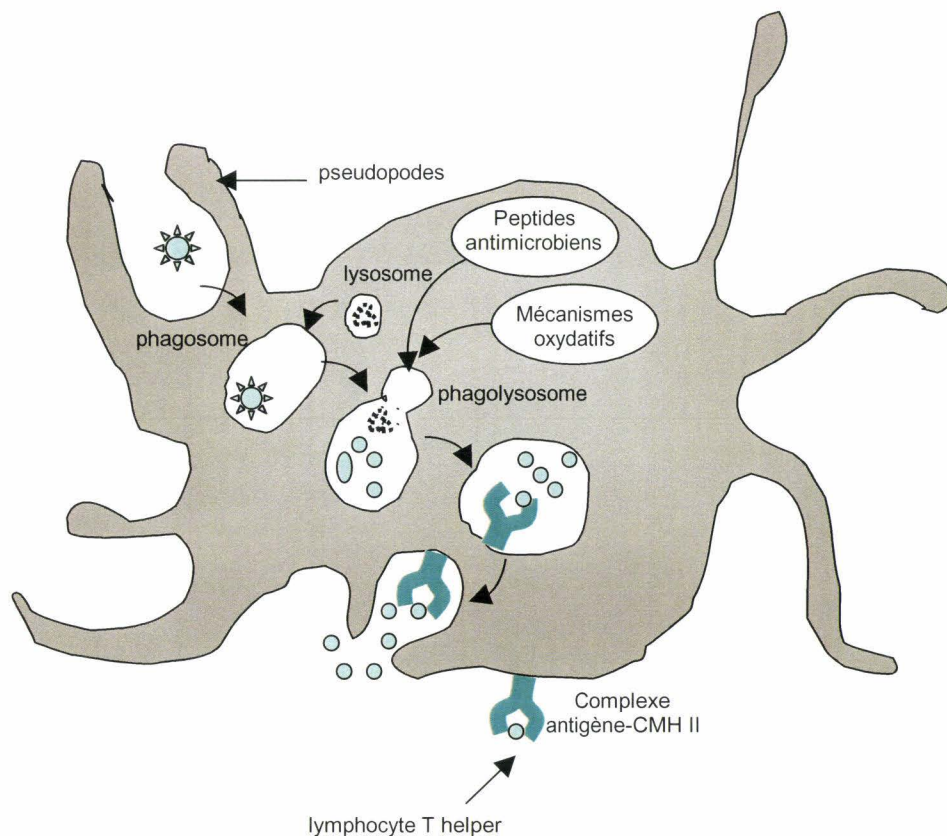


Figure 5 : Phénomène de phagocytose menant à la dégradation du pathogène chez les Vertébrés.

Dans ce processus interviennent différentes enzymes hydrolytiques, des intermédiaires liés à l'oxygène et à l'azote et des peptides antimicrobiens. Ces effecteurs intracellulaires existent dans les phagocytes des Invertébrés.

En revanche, chez les Vertébrés, les pathogènes partiellement dégradés sont présentés à la surface par les molécules du CMH de classe II. La prise en charge de ces antigènes par les lymphocytes T helper révèle l'importance du dialogue avec l'immunité acquise.

hydrolytiques sont composées entre autre du lysozyme de la phosphatase acide et de la β glucuronidase. Le lysozyme est une muramidase c'est-à-dire une enzyme qui décompose la paroi bactérienne. Des processus visent en parallèle à empêcher la croissance du pathogène en captant par exemple le fer disponible (ce que fait la lactoferrine) ou à empêcher la respiration du pathogène [Ellison & Giehl, 1991].

Chez les Vertébrés, des mécanismes oxydatifs importants se déclenchent dans le phagocyte. Dans la minute qui suit l'internalisation, le phagocyte subit un choc respiratoire caractérisé par une augmentation très importante de la consommation d'oxygène. Celui-ci est réduit par la NADPH oxydase en ions superoxyde (O_2^-). Le gène codant pour cette enzyme est d'ailleurs induit par les voies de transduction intracellulaire déclenchées par les TLRs à la suite de la reconnaissance des pathogènes. Dans le phagosome, les ions superoxyde sont convertis en eau oxygénée (H_2O_2). La myéloperoxydase (MPO) en milieu acide catalyse l'oxydation des ions halogénures par l'eau oxygénée ce qui aboutit à la formation d'hypochlorite : agent bactéricide connu puisqu'il s'agit de l'eau de Javel. L'hypochlorite décompose les membranes des micro-organismes en oxydant les groupements SH et en décarboxylant les acides aminés en aldéhydes. Notons que l'ion superoxyde exerce une toxicité directe sur les micro-organismes. Ce système très destructeur nécessite une adaptation efficace du phagocyte afin de ne pas se dégrader lui-même. Il est protégé de l'eau oxygénée par trois enzymes : la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion-péroxydase et la catalase. Après dégradation de l'agent pathogène, les déchets sont rejetés dans le milieu extra-cellulaire par exocytose ce qui peut entretenir la réaction inflammatoire.

Il faut remarquer que la phagocytose est secondée par d'autres mécanismes. En parallèle des mécanismes oxydatifs et enzymatiques qui ont lieu dans les phagocytes, la formation de NO (monoxyde d'azote) joue un rôle microbicide important dans les cellules non phagocytaires [Malawista *et al.*, 1992]. Cette formation est réalisée par une NO synthase inductible (iNOS) et le NO produit agit sur les micro-organismes notamment au niveau des mécanismes liés au transport de métaux.

Chez les Invertébrés, les mécanismes oxydatifs représentent également une part importante dans l'action cytotoxique des phagocytes vis-à-vis des micro-organismes ingérés. Plusieurs équipes de recherche ont montré l'existence d'intermédiaires dépendants de l'oxygène et de l'azote.

Chez les Mollusques, la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a été détectée dans les amoebocytes de la coquille Saint Jacques *Patinopecten yessoensis* en réponse à une

injection de bactéries [Nakamura *et al.*, 1985] révélant l'importance probable des intermédiaires liés à l'oxygène dans la fonction des phagocytes des Mollusques. La mise en évidence d'un tel mécanisme oxydatif a été montré chez la crevette *Penaeus monodon* dans les hémocytes et serait sensible à un traitement par les β -glucanes [Song & Hsieh, 1994].

Ce mécanisme semble être fondamental puisqu'il existe également chez les plantes [Levine *et al.*, 1994]. Enfin, la production chez la drosophile d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène participe grandement au processus d'encapsulation de certains parasites [Nappi & Vass, 1998].

La production de NO (monoxyde d'azote) dans les hémocytes joue aussi un rôle microbicide important. Cette synthèse est réalisée par la NO synthase (NOS). Des études immunocytochimiques ont montré la présence de cette enzyme dans les hémocytes d'un Mollusque : la moule *Mytilus edulis* [Franchini *et al.*, 1995]. Elles furent complétées ensuite avec des travaux chez les Insectes sur une larve de Lépidoptère *Estigmene acraea* qui ont mis en évidence la capacité de la NOS à être induite dans les hémocytes circulants à la suite d'un traitement bactérien [Weiske & Wiesner, 1999]. Enfin, cette production de NO semble être augmentée durant l'encapsulation de pathogènes par les hémocytes de Drosophile. Le NO possède également la capacité d'activer l'expression du gène codant pour la Diptéricine [Nappi *et al.*, 2000].

Tous ces éléments apportent l'évidence de l'importance des mécanismes liés à l'oxygène et au monoxyde d'azote dans la réponse immunitaire innée chez les Invertébrés. Les intermédiaires générés par ces mécanismes participent à la cytotoxicité exercée par les hémocytes sur les pathogènes (figure 5 page 25).

4.2.2.2- Les peptides antimicrobiens des phagocytes.

L'immunité innée a développée tout un arsenal de mécanismes visant à éliminer le plus vite possible tout organisme étranger au premier contact. Ces peptides antimicrobiens participent à une première ligne de défense très importante que représentent les barrières physiques. Néanmoins, ces pathogènes réussissent souvent à pénétrer au sein de l'organisme. Nous allons donc retrouver des peptides antimicrobiens à l'intérieur des phagocytes. Ils interviennent aux côtés des enzymes hydrolytiques et des intermédiaires oxygénés pour dégrader le pathogène ingéré.

Chez les Vertébrés, les polynucléaires Neutrophiles qui sont les principaux phagocytes du système sanguin contiennent les α -défensines. Ces molécules sont localisées

dans les granules azurophiles qui fusionnent avec le phagosome en vue de dégrader le pathogène phagocyté.

Chez l'homme, ces peptides sont appelés les HNP (Human Neutrophil Peptides). Ils présentent 4 isoformes (HNP 1 à 4). Ils sont de petite taille (3 à 4 kDa) et sont cationiques. Ils ont une action dirigée contre les bactéries, les champignons et les virus. Les HNP sont donc sous forme mature dans les granules. Néanmoins, il ne semble pas y avoir dans ces neutrophiles d'expression du gène codant ces HNP. Cette expression interviendrait dans les précurseurs des neutrophiles au sein de la moelle osseuse. La synthèse des peptides HNP serait alors très importante puis ils seraient stockés dans les granules sous forme de molécules précurseurs inactifs au cours de la différenciation des polynucléaires [Valore *et al.*, 1996].

Après fusion du phagosome et des granules azurophiles, les HNP sont donc au contact de l'élément étranger. Elles vont alors exercer leur fonction microbicide. Tel que nous l'avons déjà abordé précédemment, une fraction de ces HNP serait relarguée dans le milieu extracellulaire. Alors inactivée par les concentrations ioniques de ce milieu, elles pourraient avoir des fonctions tout à fait différentes comme des facultés de chimiotactisme sur les monocytes [Territo *et al.*, 1989] et sur les lymphocytes T [Chertov *et al.*, 1996].

Dans les neutrophiles, une autre famille de peptides à activité antimicrobienne est bien connue. Il s'agit des cathélicidines. Cette famille regroupe un très grand nombre de peptides portant des noms différents chez les quelques espèces mammaliennes étudiées. On y trouve Bac5 et Bac 7 de bœuf ; PMAP23, PMAP36, PMAP37, les protégrines, la prophénine de porc ; CAP18 humain et bien d'autres encore. Leur expression est comparable à celle des HNP. Leurs gènes sont exprimés très tôt dans la lignée myéloïde et l'on ne détecte plus cette expression dans les neutrophiles matures [Sorensen *et al.*, 1997]. Les cathélicidines sont stockées sous forme de précurseurs dans des granules différents des granules azurophiles contenant les HNP. Les cathélicidines sont activées lorsqu'elles sont déversées dans le phagosome. Elles se retrouvent au contact d'éléments provenant des granules azurophiles qui finissent la maturation des cathélicidines [Panyutich *et al.*, 1997]. Traité plus en amont déjà dans ce chapitre, il est intéressant de remarquer que les précurseurs non matures ont des fonctions différentes dans la réponse humorale.

Chez les Invertébrés, la fonction des peptides antimicrobiens peut être également intracellulaire au sein des phagolysosomes des phagocytes. A l'image de la drosophile, plusieurs insectes présentent des cellules à granules évoquant les neutrophiles de Vertébrés.

Ces cellules stockent dans leurs granules des peptides antimicrobiens afin de participer à la phagocytose. Chez la moule *Mytilus galloprovincialis* par exemple, les mytilines participent activement à la destruction du pathogène phagocyté au sein des hémocytes avant d'être sécrétées dans l'environnement proche du site d'infection [Mitta *et al.*, 2000a].

Par conséquent, chez les vertébrés, l'immunité innée dite naturelle repose sur des mécanismes délivrant des systèmes de défense très rapides et très efficaces. Son organisation se fait dans l'espace et dans le temps puisque beaucoup de processus de défense sont concentrés dans les zones proches de l'environnement extérieur de l'organisme. Les barrières physiques sont fondamentales et sont appuyées par la réaction inflammatoire et le système du complément qui initient des réponses cellulaires très puissantes. Le phénomène de phagocytose en est un exemple flagrant. Les mécanismes moléculaires sont également sophistiqués. Ils détruisent les micro-organismes étrangers et régulent leur propre réponse. Cette première ligne de défense est relayée par une réponse plus spécifique chez les vertébrés supérieurs. L'immunité innée fournit très rapidement son évaluation de l'importance du danger afin de pouvoir initier une réponse spécifique plus adaptée. Cette coopération entre les deux types d'immunité met en évidence le rôle primordial que joue l'immunité innée.

Il est aujourd'hui saugrenu de concevoir l'immunité innée comme primitive. La résistance au cours de l'évolution des organismes végétaux et invertébrés animaux illustre parfaitement l'efficacité de ce type de réponse par rapport aux dangers extérieurs.

L'étude de l'immunité innée chez divers modèles invertébrés met en lumière la complexité de la réponse délivrée face à l'intrusion de pathogènes dans l'organisme. L'utilisation de la drosophile comme modèle de référence a permis d'établir une vue d'ensemble (figure 6 page 30) des différents mécanismes agissant en synergie lors de la réponse immunitaire innée [Tzou *et al.*, 2002]. Il est aujourd'hui impossible d'affirmer que ces processus sont présents dans tous les embranchements invertébrés où qu'ils n'en existent pas d'autres. Les études entreprises chez les Invertébrés permettront de porter un regard plus global (aujourd'hui encore fragmentaire) sur les mécanismes de défense conservés entre différents embranchements, ou propres.

Il est aujourd'hui de plus en plus clair que cette réponse utilise des mécanismes fondamentaux qui ont été conservés au cours de l'évolution. La découverte chez l'homme de la voie Toll de drosophile en atteste [Medzhitov & Janeway, 1997; Medzhitov *et al.*, 1997]. Dans toutes les

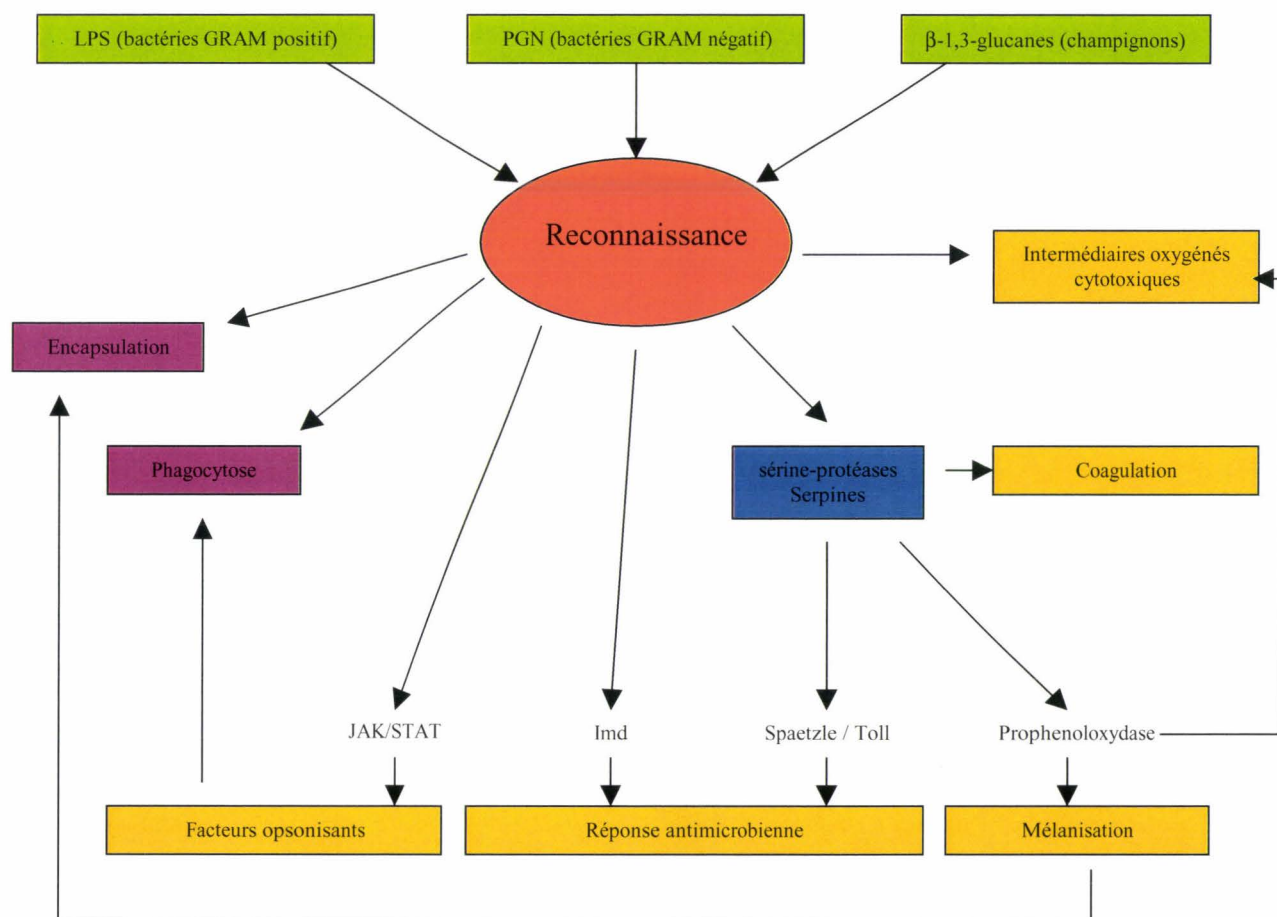


Figure 6 : Mécanismes développés par la drosophile à la suite de la reconnaissance d'un élément pathogène (modifié d'après Tzou *et al.*, 2002).

Cette vue reprend les réponses humores en jaune et les réponses cellulaires en violet. Notons que les peptides antimicrobiens et les intermédiaires oxygénés peuvent également jouer un rôle important dans les processus de phagocytose.

L'immunité innée est activée par plusieurs motifs invariants de micro-organismes (PAMPs). Les différentes réponses agissent de manière synergique.

étapes importantes de l'immunité : reconnaissance, amplification, recrutement des phagocytes, initiation de la phagocytose, effecteurs intracellulaires et extracellulaires, l'immunité des Invertébrés semble représenter la base évolutive de l'immunité innée des Vertébrés.

En outre, il est fondamental de multiplier les modèles d'étude invertébrés car il n'existe pas une réponse mais des réponses dans l'immunité innée. Or, il semblerait qu'en fonction de l'environnement, de la durée de vie et du cycle de vie (parasites ou non), les espèces invertébrées aient chacune privilégié des stratégies de défense plutôt que d'autres. C'est donc à travers la diversité de la faune invertébrée que l'immunité au sens large peut être mieux comprise.

Les fondements de notre relation avec l'environnement extérieur reposent donc majoritairement sur les stratégies développées par les Invertébrés pour reconnaître le soi non infectieux du non soi infectieux [Janeway, 1992]. La recherche de nouveaux acteurs de l'immunité innée semble être la seule issue pour élucider complètement et comprendre les processus impliqués.

Dans ce sens, les analyses différentielles au niveau génétique ont fait l'objet de recherches importantes chez les insectes par l'utilisation massive des Biopuces à ADN sur lesquelles sont placés les gènes de *Drosophila melanogaster* [De Gregorio *et al.*, 2001; Irving *et al.*, 2001]. D'autres analyses ont été notamment développées chez le moustique *Anopheles gambiae* afin de répertorier les gènes dont l'expression est bouleversée lors de la réponse immunitaire [Dimopoulos *et al.*, 2000; Oduol *et al.*, 2000].

Les résultats très intéressants déjà obtenus soulignent la pertinence de ces approches. Les études réalisées par exemple au moyen des Biopuces à ADN permettent d'observer des variations transcriptionnelles au sein de nombreuses familles de gènes. Ainsi, la réponse immunitaire peut être analysée à plusieurs niveaux : reconnaissance, phagocytose, réponse antimicrobienne, signalisation ou encore observation des protéases et de leurs inhibiteurs. Ces analyses massives permettent également de révéler la modulation de molécules connues et surtout de découvrir des molécules inédites.

Concernant les modulations traductionnelles et post-traductionnelles, la recherche des molécules impliquées dans les évènements intracellulaires et extracellulaires de l'immunité peut se réaliser avec des techniques combinant analyse comparative et purification des

molécules différentielles. Cette approche comparative biochimique a porté ses fruits entre autre dans la caractérisation des DIMs (Drosophila Immune-induced Molecules) chez la drosophile [Uttenweiler-Joseph *et al.*, 1998] et de molécules impliquées dans l'immunité du moustique *Anopheles gambiae* [Han *et al.*, 1999]. La recherche de molécules dont la concentration varie dans l'hémolymphe après une infection expérimentale a permis de mettre en évidence plusieurs dizaines de peptides. Ces derniers sont constitués entre autre de peptides antimicrobiens mais aussi d'inhibiteurs de protéases.

Il semble donc que les études des modulations transcriptionnelles, traductionnelles et post-traductionnelles induites dans le cadre d'infections microbiennes soient très informatives quant aux mécanismes mis en jeu dans l'espace et dans le temps au sein de la réponse immunitaire innée. C'est pourquoi, nous avons entrepris une telle approche chez la sangsue *Theromyzon tessulatum*, où la réponse immunitaire n'a pas encore été étudiée.

Matériels et Méthodes

I- Matériel biologique

1- Présentation et cycle de vie de *Theromyzon tessulatum*

Les sangsues sont des Invertébrés qui appartiennent à l'embranchement des Annélides. Ces vers annelés de la classe des Achètes sont pourvus de deux ventouses dont une à chaque extrémité du corps. Les Achètes sont le plus souvent des ectoparasites temporaires. Notre modèle *Theromyzon tessulatum* appartient à l'ordre des Rhynchobdelliformes qui est caractérisé par la présence d'une trompe dévaginable au niveau de la ventouse antérieure. A l'inverse des sangsues Gnathobdelliformes armées de mâchoires telles que *Hirudo medicinalis*, *T. tessulatum* devra déchirer les muqueuses de ses hôtes pour se nourrir [Sawyer, 1986].

T. tessulatum est un ectoparasite temporaire d'oiseaux aquatiques. Sa localisation géographique est corrélée aux zones de migration des canards sauvages. C'est pourquoi, il est possible de la récolter sur les rives des points d'eau douce colonisés par ces derniers. Le terme de parasitisme temporaire signifie simplement que l'animal ne restera fixé au canard que lors de son repas de sang. Sa trompe lui permet de déchirer une couche très fine de tégument. C'est pourquoi, elle parasite le canard au niveau de sa muqueuse nasale, sous laquelle se trouve un réseau très dense de capillaires sanguins. L'absorption d'un grand volume de sang est permise grâce à un tube digestif organisé en plusieurs coeca digestifs dilatables. Il est maintenu sous forme liquide, condition inévitable qui autorise le repas, grâce à tout un arsenal de molécules à propriétés anticoagulantes produites par les glandes salivaires [Chopin *et al.*, 2000; Salzet, 2001].

Aussitôt le repas terminé, la sangsue se détache et retrouve son milieu naturel qu'est l'eau douce d'un étang ou d'une mare. Elle peut se trouver à différents points selon la période de sa vie. Les repas ainsi que le climat déterminent leur position. Durant la recherche d'un hôte avant chaque repas, la sangsue se situe plutôt en surface sur la végétation aquatique ou sur les pierres qui bordent la mare ou l'étang. Les animaux en période post-prandiale vivent plus généralement sous les pierres. En période clémente, les sangsues restent dans l'eau alors que la baisse de la température à la fin de l'automne déclenche leur enfouissement dans le sol [Sawyer, 1986].

La compréhension de leur cycle naturel de vie permet de planifier leur prélèvement dans l'environnement naturel mais aussi de mieux expliquer leur comportement au sein de l'élevage.

Le cycle de vie de *T. tessulatum* fut défini précisément par Malecha et coll. [Malecha, 1979, 1983] après avoir déterminé les différents stades de développement de l'animal (figure 7 page 35). Les quatre stades sont marqués par des changements de poids et de volume corporel (figure 8 page 36). Le premier stade est le stade 0 qui correspond aux sangsues néonates qui restent fixées sur la face ventrale de la mère. Ces individus de stade 0 vont se détacher et prendre leur premier repas de sang pour former de nouveaux animaux de stade 1. Sur le plan physiologique, aucune information précise n'est connue sur les différences entre les stades 0, 1 et 2 exceptée la croissance de l'animal induite par le deuxième repas. En revanche, de nombreux bouleversements physiologiques induits par le troisième repas de sang sont bien connus. La croissance spectaculaire de l'animal montre bien une augmentation importante du volume corporel dont entre autre le volume de la cavité coelomique. Ceci illustre parfaitement les changements dans l'osmorégulation et la balance hydrique de l'animal. Le troisième et dernier repas de sang initie également la dégénérescence des glandes salivaires et la maturation sexuelle. La sangsue est hermaphrodite protandre, ce qui signifie que l'ovogenèse débutera avant la spermatogenèse, et que la reproduction impliquera une fécondation croisée. Les ovocytes mûres sont déposés et fécondés peu après de manière externe. Ils sont ensuite couvés par la mère puis l'éclosion permet la naissance de nouvelles sangsues néonates de stade 0.

Ce cycle de vie s'étale sur une période approximative d'une année. Les individus se reproduisent lors du printemps. Il est possible de trouver dans la nature des stades 0 et 1 durant l'été. La récolte des animaux de stade 2 est généralement réalisée entre août et novembre. Ensuite, le troisième repas de sang provoque la maturation des animaux en stade 3 que l'on peut récolter jusqu'au printemps.

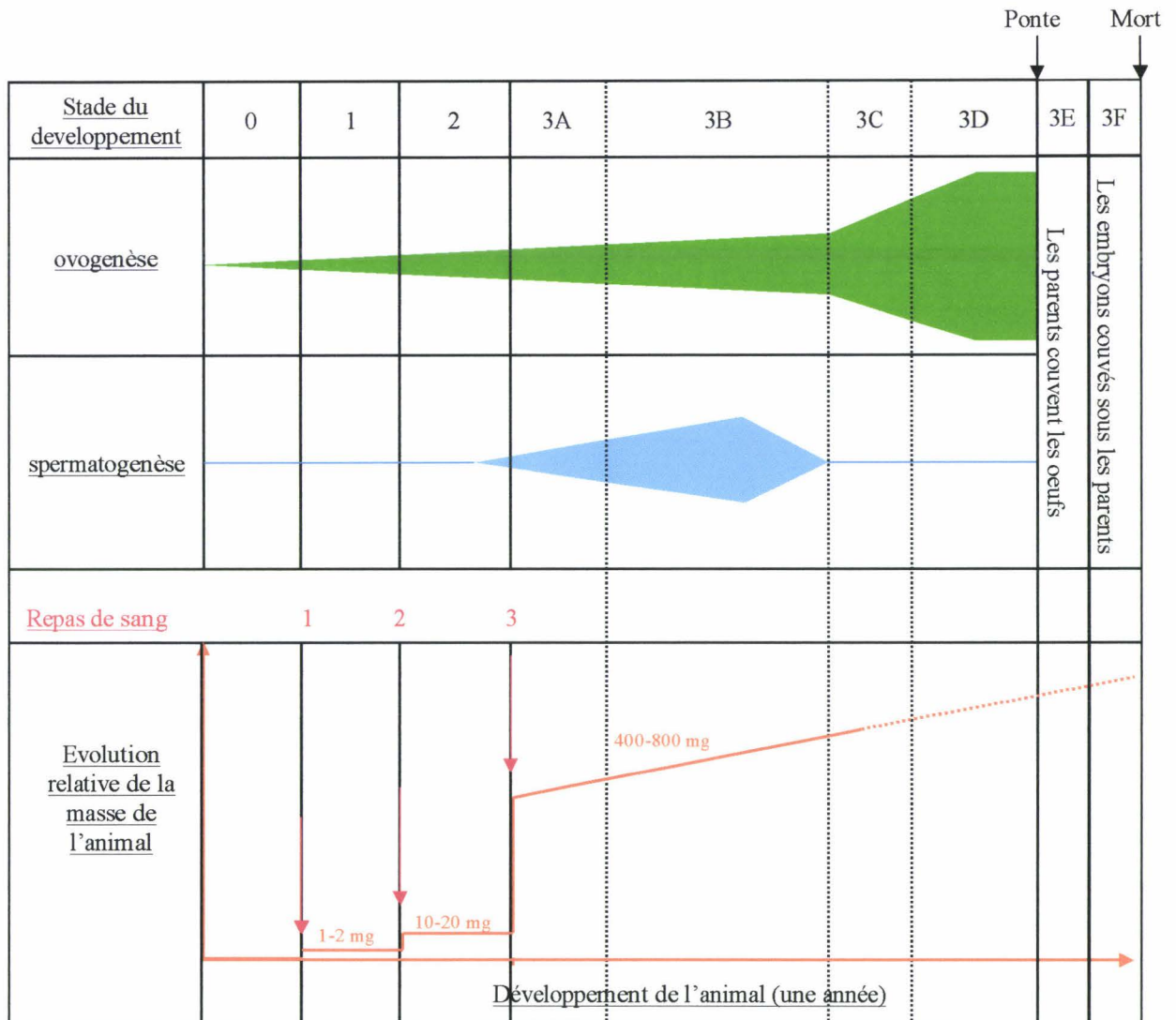


Figure 7 : Cycle de vie de *Theromyzon tessulatum* (modifié d'après Malecha *et al.*, 1983).

T. tessulatum entre en gaméto-genèse après le troisième repas de sang. Après la reproduction, les parents « couvent » leur descendance puis meurent. Le stade 3 est le siège de nombreux bouleversements physiologiques. L'augmentation de la masse de l'animal observée après le troisième repas est notamment expliquée par une forte absorption d'eau au sein de la cavité coelomique (les masses présentées sont des valeurs moyennes). La vie de l'animal dure approximativement une année.

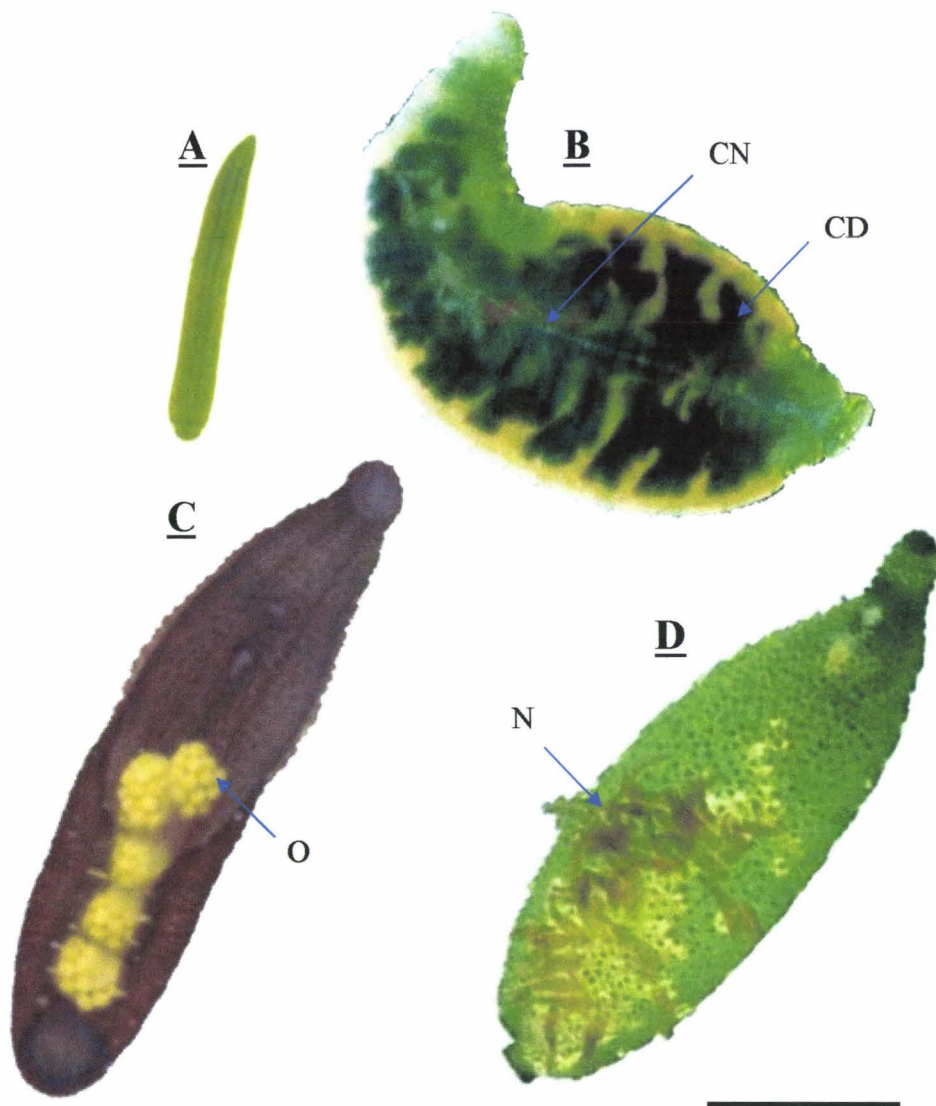


Figure 8: Les différents stades de développement de *Theromyzon tessulatum*.

A: Vue dorsale d'un animal de stade 2 à jeun.

B: Vue ventrale d'un animal de stade 3A-B (CD: Cœca Digestifs remplis de sang observables par transparence; CN: Chaîne nerveuse observable par transparence).

C: Vue ventrale d'un animal de stade 3E (O: œufs).

D: Vue ventrale d'un animal de stade 3F (N: Néonates de stade 0).

(La barre d'échelle correspond en taille réelle à 1 cm).

2- Quels sont les tissus analysés?

2.1- Analyse biochimique

La recherche biochimique de peptides à fonction immunitaire a été réalisée sur le liquide coelomique de sangsues de stade 3 dans lesquelles le volume coelomique est particulièrement important.

Après les différentes injections, le liquide coelomique est prélevé par des incisions longitudinales du tégument sur les flancs de l'animal. Il est aussitôt ponctionné par pipetage et récolté dans un tube 1.5 ml stérile. Le liquide est stocké à -80°C jusqu'à son utilisation.

Afin de réaliser une comparaison rigoureuse, les lots d'animaux sont tous composés de 25 sangsues de stade 3b. Ayant toutes atteint le même stade de développement, le volume de liquide coelomique prélevé est toujours le même à quelques microlitres près.

2.2- Analyse moléculaire

La recherche de gènes dont l'expression est modulée dans le cadre d'une réponse immunitaire doit être réalisée sur des tissus susceptibles d'être impliqués dans cette réponse. Puisque les types cellulaires qui participent à la réponse immune chez *T. tessulatum* ne sont pas identifiés ou difficilement accessibles comme les cellules graisseuses [Tasiemski *et al.*, 2002], nous avons entrepris une approche globale à partir d'ARN totaux d'animaux entiers.

Les animaux utilisés sont des sangsues de stade 2. Ces dernières sont en effet très appropriées à cette analyse car ils peuvent subir une digestion prolongée de leur deuxième repas de sang. Cela n'est pas réalisable avec les stades 3 qui, après le troisième repas, entrent en reproduction. Les individus de stade 2 en question ne contiennent plus de sang de canard. Les problèmes de contamination par le matériel génétique de l'oiseau sont alors abrogés.

Après une injection expérimentale, les sangsues de stade 2 tardif de chaque lot (40 animaux par lot) sont laissées au repos libres dans un récipient d'eau. Après la durée de stimulation, elles sont essuyées une à une dans un papier propre puis recueillies dans un tube de 50 ml stérile. Le tube de chaque lot est ensuite plongé dans un bain d'azote liquide afin de sacrifier instantanément les individus. Ils sont alors maintenus à -80°C jusqu'à leur utilisation.

3- Stimulation de la réponse immunitaire innée

3.1- Agents pathogènes utilisés

Pour l'analyse biochimique, les animaux sont infectés par une solution de LPS (lipopolysaccharides) 10 μ M. Les LPS sont dissous dans du liquide physiologique de Ringer puis la solution est traitée aux ultra sons en bain marie afin d'être homogénéisée. Dix μ l de LPS sont injectés dans les stades 3 infectés et 10 μ l de liquide physiologique sont injectés dans les animaux témoins.

Pour l'analyse moléculaire, les animaux ont été infectés expérimentalement par un mélange (50:50) de bactéries Gram+ (*Micrococcus luteus*) et de bactéries Gram- (*Escherichia coli*).

Les bactéries sont mélangées dans une solution de PBS 0,1 M puis sont dosées au spectrophotomètre à 600 nm. La solution est ramenée ensuite à 10^9 bactéries /ml. Les animaux sont infectés par une injection de 2 μ l ($2 \cdot 10^6$ bactéries) sous le tégument. Les bactéries entrent directement au contact de la cavité coelomique.

Les lots expérimentaux sont comparés ensuite avec des lots d'animaux contrôle n'ayant reçu qu'une injection d'une solution de PBS (même volume).

3.2- Durée des stimulations

L'analyse du contenu peptidique du liquide coelomique recueilli est réalisée selon deux durées de traitement bactérien : 30 minutes et 1 heure. Les lots infectés sont comparés à un lot contrôle de 30 minutes ayant reçu l'injection de liquide physiologique.

L'analyse moléculaire des modulations d'expression génique au sein de l'animal entier est effectuée après 24 heures de traitement par les bactéries. Un lot contrôle (PBS 24h) est comparé à un lot d'animaux infectés (Bactéries 24h).

II- Méthodes d'analyse des peptides issus du liquide coelomique

Les étapes de cette approche expérimentale biochimique sont regroupées sur la figure 9 de la page 39.

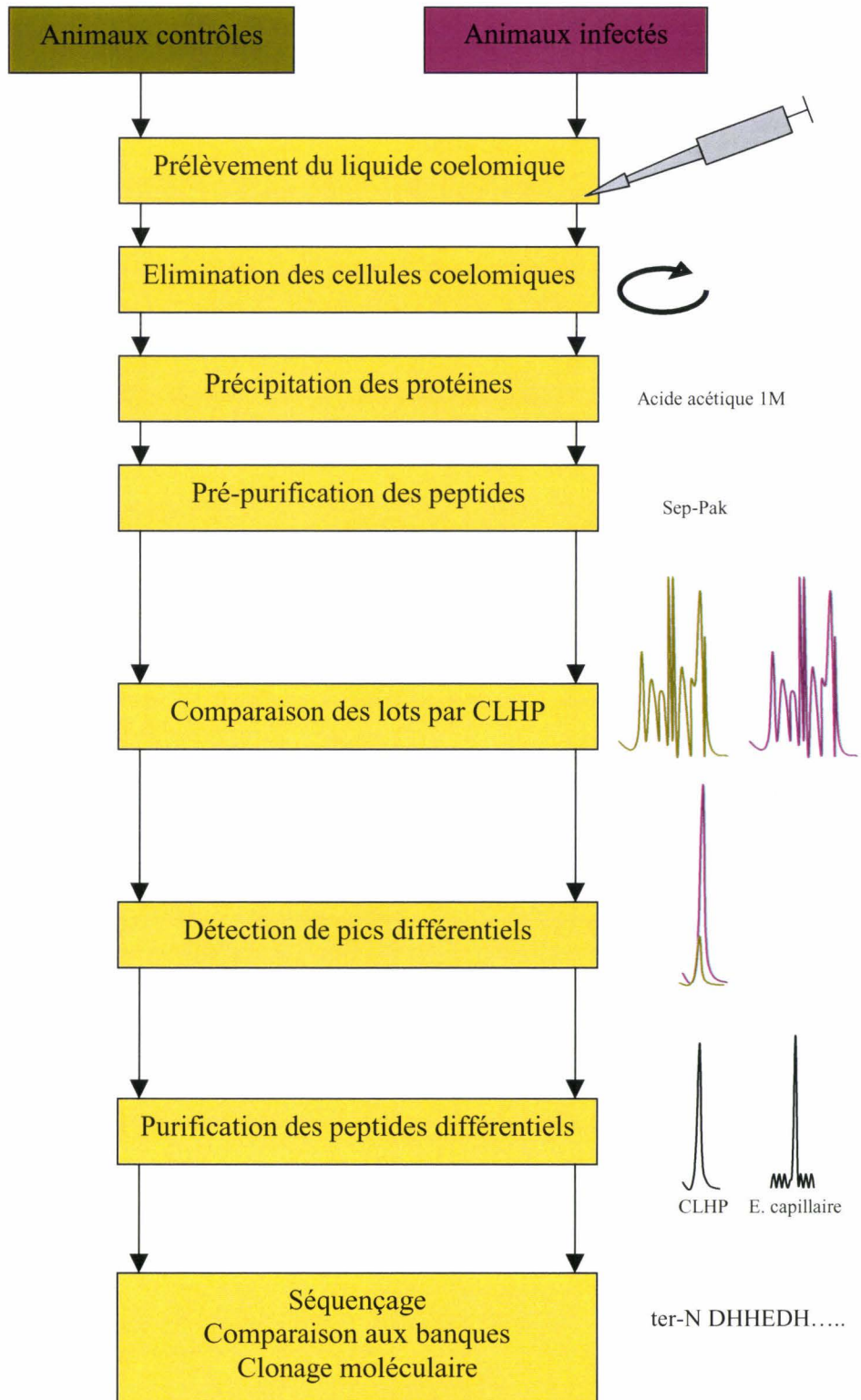


Figure 9 : Les différentes étapes de l'analyse biochimique (recherche des peptides modulés dans le liquide coelomique).

1- Pré-purification des peptides

Pour chaque lot, le liquide coelomique récolté est d'abord centrifugé à 800g, 15 minutes à 4°C afin d'éliminer les cellules coelomiques. Le surnageant est repris dans un tube stérile (Beckman coulter) puis dilué dans 1 volume d'eau stérile contenant de l'acide trifluoroacétique (TFA) 0,1%.

Les protéines contenues dans l'échantillon sont précipitées en abaissant le pH à environ 4 par addition d'acide acétique 1M final pendant 30 minutes sur la glace. L'échantillon est centrifugé à 10000g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est alors pré-purifié sur colonne Sep-Pak C18 (Waters). L'échantillon passe au travers de la phase stationnaire en appliquant un vide constant en sortie de colonne. Les peptides sont donc séparés une première fois en fonction de leur degré d'hydrophobicité par rapport à un agent éluant qui est l'acétonitrile (ACN). La colonne a été préalablement hydratée et équilibrée avec de l'eau stérile TFA 0,05%. L'échantillon est alors chargé sur la colonne puis un premier passage d'ACN 10% permet d'obtenir une fraction 0-10% de peptides peu hydrophobes. Un deuxième passage d'ACN 50% sur la colonne donnera après élution une fraction 10-50% de molécules moyennement hydrophobes. Enfin un dernier passage d'ACN 80% permet de recueillir un éluât 50-80% de peptides très hydrophobes.

Les fractions 10-50% et 50-80% seront ensuite utilisées.

Chaque fraction pré-purifiée est séchée par évaporation à froid et sous vide au Speed-Vac (Savant) pendant plusieurs heures. L'échantillon est repris avec 500 µl d'eau stérile.

2- Purification des peptides

2.1- Approche différentielle par Chromatographie (CLHP)

La comparaison des populations de peptides contenus dans le liquide coelomique est faite par chromatographie liquide haute pression (Beckman Coulter, système Gold nouveau) sur colonne de phase inverse C18 Séphasyl (250 x 4 mm, Vydac). Après injection sur la colonne, chaque échantillon est séparé à 46°C par passage d'une solution d'ACN / eau TFA 0,05%. Cette solution passe selon un gradient d'ACN croissant de 2 à 52% en 90 minutes. Le débit de la phase mobile sur la colonne est de 1 ml/minute. La chromatographie est dotée en sortie de colonne d'un détecteur photodiode 168 qui permet de lire l'absorbance en UV à

225nm. Cette dernière est retransmise sur une table traçante. Cela permet de détecter et de récolter toutes les fractions d'élution contenant un ou plusieurs peptides. Les fractions sont récoltées dans des tubes stériles low binding puis séchées par Speed-Vac et reprises dans un volume constant d'eau stérile.

2.2- Comparaison des profils chromatographiques

Pour chaque temps de traitement, le lot infecté est comparé au lot contrôle. Pour cela, le système d'analyse Gold nouveau (Beckman Coulter) de la chromatographie liquide permet de superposer les profils des deux lots. Réalisées rigoureusement dans les mêmes conditions, les séparations de peptides sont alors comparées afin de déterminer des pics différentiels correspondant à des peptides modulés par l'infection.

La détection de pics différentiels est analysée et les fractions correspondant aux pics d'intérêt sont alors repurifiées en chromatographie.

2.3- Purification des peptides différentiels

Chaque fraction intéressante est repassée sur une colonne C18 Séphasy1 (250 x 2 mm, Vydac) afin de purifier le peptide d'intérêt. La purification est réalisée de la même manière que la première excepté que le gradient d'ACN est ajusté au degré d'hydrophobicité relatif observé pour l'élution de la première chromatographie. Connaissant ce degré d'hydrophobicité, un premier gradient d'ACN est effectué rapidement (3% par minute) pour atteindre un deuxième gradient plus lent 5 % avant le degré supposé spécifique de la fraction. Ce gradient lent augmente de 0,5% par minute jusqu'à ce qu'il soit 5% au dessus du degré supposé. Enfin un ultime gradient identique au tout premier permet de terminer la chromatographie. Cette variation du gradient d'ACN est utilisée pour purifier le mieux possible les peptides dans la zone précise de leur hydrophobicité propre.

La purification peut être poursuivie jusqu'à l'obtention de pics uniques et sans épaulements. Les fractions différentielles présumées sont analysées en électrophorèse capillaire (PACE 2000, Beckman Coulter) afin de contrôler leur pureté grâce à une méthode de séparation basée sur la charge propre de chaque molécule. Le tampon de migration utilisé est un tampon phosphate 50 mM, pH 2,5 qui ne génère aucun flux d'électro-endosmose. En fonction des peptides analysés, le voltage et la durée de l'électrophorèse sont variables mais s'approchent de 20 kV, 20 minutes à température ambiante.

Les produits différentiels purifiés sont ensuite analysés en spectrométrie de masse MALDI-TOF afin de déterminer leur masse.

3- Identification des peptides modulés

Les peptides intéressants ont été identifiés par dégradation d'Edman de l'extrémité aminotermine sur un séquenceur automatique (LF 3000, Beckman Coulter) utilisant une base de chromatographie liquide Gold (Beckman Coulter). Cette plateforme de séquençage est supervisée par le Dr. Pierre-éric Sautière, maître de conférence (UMR 8017).

Les séquences obtenues sont ensuite entrées dans des banques de données de séquences primaires BLAST P 2.2.2 [Altschul *et al.*, 1997] ou Bic 2 (Annexe 2 page 183). Le seuil de signification statistique est fixé à $E=1000$ pour favoriser l'alignement des séquences obtenues avec les banques [Karlin & Altschul, 1990].

III- Méthodes d'analyse des ARNm de l'animal

1- Préparation des ARN totaux

1.1- Extraction à partir des animaux entiers

Les animaux de stade 2 sont sacrifiés 24 heures après la stimulation. L'extraction des ARN totaux est réalisée par addition d'un tampon de thiocyanate de guanidium (thiocyanate de guanidium 6,3 M ; Citrate de sodium 0,75 M pH7 ; Sarcosyl 10%). Ce tampon est mis en présence des sangsues dès leur sacrifice afin d'éviter toute dégradation des ARN.

La préparation est broyée mécaniquement sur la glace par une sonde (Polytron) qui génère une solution homogène. Cette homogénat est conservé à -80°C en attendant de poursuivre le protocole.

La suite de l'extraction consiste à ajouter pour chaque millilitre d'homogénat 0,1 ml d'acétate de sodium 2M pH4, 1 ml de Biophénol saturé en eau et 0,2 ml de chloroforme:alcool isoamylique (49:1). L'addition de chacune des solutions est suivie d'une inversion ménagée de l'échantillon. Il est nécessaire après le mélange chloroforme:alcool isoamylique de secouer vigoureusement pendant 10 secondes et de laisser reposer l'échantillon 15 minutes sur la glace. L'étape suivante consiste à séparer la phase organique de la phase aqueuse contenant

les ARN totaux. Pour cela, l'échantillon est centrifugé 20 minutes à 10000g à 4°C. La phase aqueuse est récupérée dans un nouveau tube stérile, et toute trace de résidus organiques est extraite par addition d'1 volume de chloroforme suivie d'une nouvelle centrifugation. La phase aqueuse est mise au contact de 2,5 volumes d'éthanol absolu dans un nouveau tube afin de précipiter les ARN. Le tube peut être stocké à -80°C pour une durée illimitée ou centrifugé aussitôt 20 minutes à 10000g à 4°C. Le culot d'ARN obtenu est lavé par 1 ml d'éthanol 70% puis centrifugé à nouveau et laissé sécher.

Les ARN totaux sont enfin repris dans 100 µl d'eau stérile puis une fraction est dosée au spectrophotomètre à 260 nm. Cette même fraction peut être déposée sur gel d'agarose 1% (avec bromure d'éthidium) afin d'évaluer l'intégrité des ARN totaux extraits.

1.2- Traitement des ARN totaux par la DNase I

Comme les extractions, ce traitement est réalisé extemporanément. Il consiste à traiter 25 µg d'ARN totaux par 4 unités de DNase I dans un tampon de réaction final de 50 µl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 ; MgCl₂ 2mM ; KCl 50 mM) pendant 30 minutes à 37°C. Les ARN traités sont de nouveau purifiés par addition de 200 µl de phénol:chloroforme (49:1). Après agitation 10 secondes au vortex, les échantillons sont centrifugés 30 minutes à 10000g à 4°C. La phase organique contenant les protéines est éliminée et la phase aqueuse contenant les ARN est lavée par 1 volume de chloroforme puis re-centrifugée. La phase aqueuse est récupérée dans un tube stérile puis les ARN totaux sont précipités avec du chlorure de lithium (LiCl 0,6 M final) et 200 µl d'éthanol absolu. Le précipité est récupéré par centrifugation 30 minutes 10000g à 4°C alors que le surnageant contenant les ADN et les polysaccharides solubles est éliminé. Le culot est alors séché et repris dans 20 µl d'eau stérile. 1 µl des ARN totaux traités est ensuite dosé à 260 nm au spectrophotomètre puis déposé sur un gel d'agarose 1%.

2- Analyse comparative par *Differential Display* RT-PCR (DDRT-PCR)

La technique de DDRT-PCR permet d'étudier le transcriptome d'un organisme et de rechercher les modulations d'expression génique induites par un ou plusieurs traitements expérimentaux [Liang & Pardee, 1992]. Elle consiste à amplifier de manière non spécifique la population d'ARN messagers de plusieurs échantillons par RT-PCR. Les profils d'amplification sont ensuite comparés afin de détecter les signaux différentiels. Les étapes

principales de cette approche sont représentées sur la figure 10 page 45. Pour plus de rigueur, les expériences sont toutes réalisées en double et les réplicats sont déposés côte à côte sur gel de polyacrylamide. Le fait de doubler les expériences permet d'écarter dans un premier temps certains faux positifs.

Cette analyse utilise le kit *RNAimage (mRNA Differential Display* system)* de Genhunter Corporation. Deux types de DDRT-PCR ont été abordés : une analyse aléatoire utilisant les oligonucléotides Genhunter et une analyse ciblée sur les récepteurs à 7 domaines transmembranaires utilisant des oligonucléotides synthétisés à façon dans ce but [Lopez-Nieto & Nigam, 1996]. Ces amorces sont détaillées dans le tableau 1 page 46.

2.1- Synthèse des ADN complémentaires

L'étape de synthèse d'ADNc est réalisée dans trois tubes distincts à l'aide de 3 amorces oligo-(dT) différentes possédant une base surnuméraire (A, G ou C) à leur extrémité 3' (amorces HT11M, figure 10 page 45). Cela a pour but de subdiviser en trois sous-populations d'ADNc distinctes et représentatives la population totale d'ARNm [Liang *et al.*, 1994]. Il est ainsi possible d'obtenir, après migration des produits d'amplification sur gel d'acrylamide, des profils exploitables d'une centaine de bandes par couple d'amorce. Cette synthèse est réalisée en double pour chaque échantillon. Il y a donc pour chaque analyse douze synthèses distinctes d'ADNc :

Témoin (T) HT11A-1; T-HT11A-2; T-HT11G-1; T-HT11G-2; T-HT11C-1; T-HT11C-2.
Bactéries (B) HT11A-1; B-HT11A-2; B-HT11G-1; B-HT11G-2; B-HT11C-1 et B-HT11C-2.

Le protocole de synthèse est le suivant :

	(μ l)
H ₂ O	9,4
Tampon de synthèse 5x Genhunter	4
dNTPs (250 μ M)	1,6
ARN totaux traités (dilués à 0,1 μ g/ μ l)	2
<u>oligo HT11M (2μM)</u>	<u>2</u>
Total	19

Tampon 5x Genhunter Corporation (Tris HCl 125 mM pH8.3, KCl 188 mM, MgCl₂ 7,5 mM et DTT 25 mM)

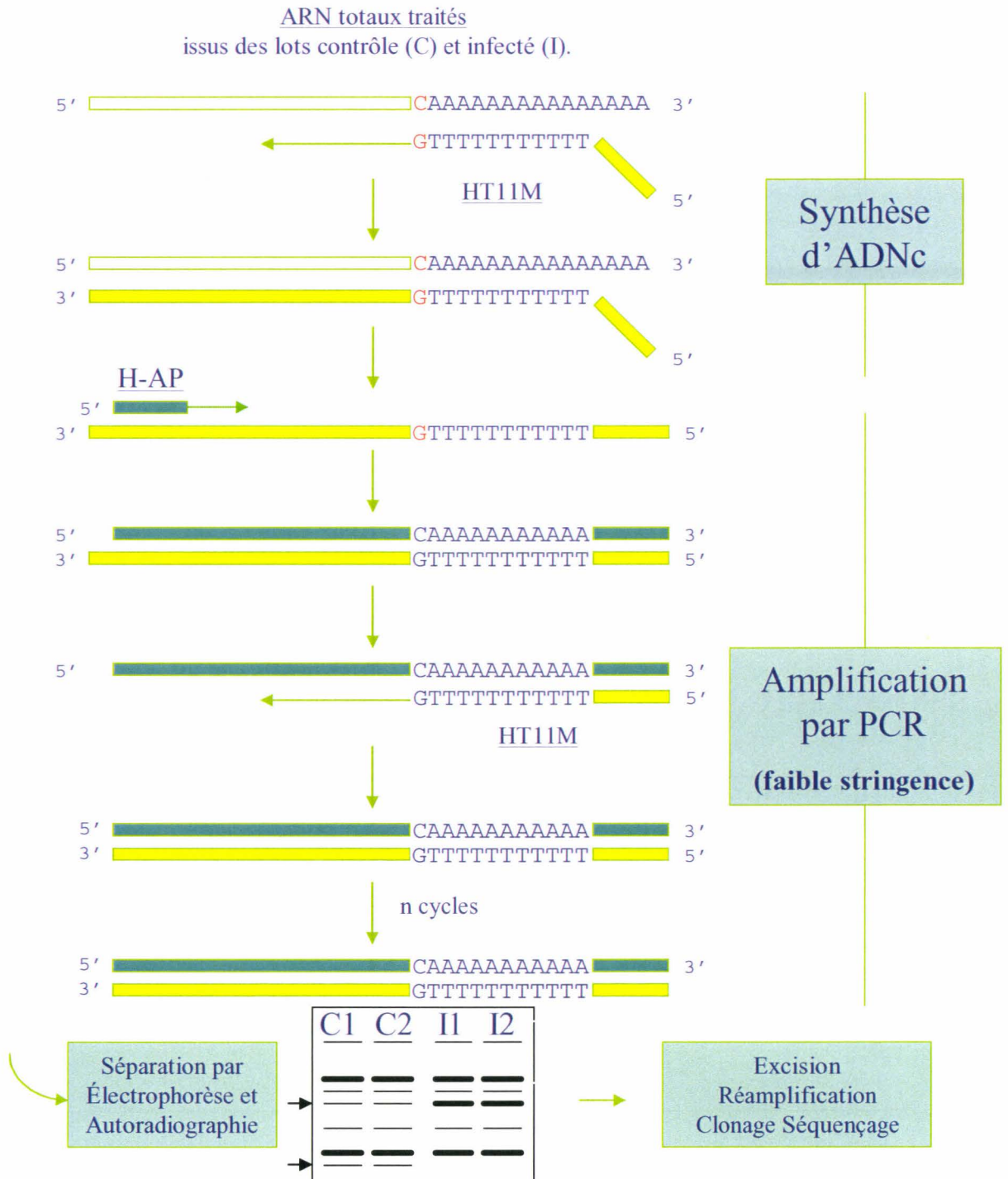


Figure 10: Principales étapes de l'analyse par DDRT-PCR.

La base dégénérée à l'extrémité 3' de l'amorce HT11M permet de former trois sous-populations d'ADNc. Celles-ci sont amplifiées par la même amorce HT11M et par chaque amorce arbitraire H-AP. Les profils d'amplification obtenus mettent en évidence des signaux différentiels (fléchés).

Tableau 1: Oligonucléotides de synthèse pour l'approche DDRT-PCR (5' - 3')

3' HT11A	AAGCTTTTTTTTTTTTA
3' HT11G	AAGCTTTTTTTTTTTTG
3' HT11C	AAGCTTTTTTTTTTTTC
5' H-AP1	AAGCTTGATTGCC
5' H-AP2	AAGCTTCGACTGT
5' H-AP3	AAGCTTTGGTCAG
5' H-AP4	AAGCTTCTCAACG
5' H-AP5	AAGCTTAGTAGGC
5' H-AP6	AAGCTTGCACCAT
5' H-AP7	AAGCTTAACGAGG
5' H-AP8	AAGCTTTTACCGC
5' H-AP9	AAGCTTCATTCCG
5' H-AP10	AAGCTTCCACGTA
5' H-AP11	AAGCTTCGGGTAA
5' H-AP12	AAGCTTGAGTGCT
5' H-AP13	AAGCTTCGGCATA
5' H-AP14	AAGCTTGGAGCTT
5' H-AP15	AAGCTTACGCAAC
5' H-AP16	AAGCTTTAGAGCG
5' H-AP17	AAGCTTACCAGGT
5' H-AP18	AAGCTTAGAGGCA
5' H-AP19	AAGCTTATCGCTC
5' H-AP20	AAGCTTGTTGTGC
5' H-AP21	AAGCTTTCTCTGG
5' H-AP22	AAGCTTTTGATCC
5' H-AP23	AAGCTTGGCTATG
5' H-AP24	AAGCTTCACTAGC
5' R-AP1	ATACAACCCCATC
5' R-AP2	ATACATCCTGGTG
5' R-AP3	AGTCATCTCCATC
5' R-AP4	ATACCTGGCCATC
5' R-AP5	AGACCTTCATCCT
5' R-AP6	ATACTTCCTGCTG
5' R-AP7	ACTGACAGGTACA
5' R-AP8	ATAGCCTGGCCTG
5' R-AP9	TACGCTATGCCAA
5' R-AP10	ATAGCTGCTGCTG
5' R-AP11	ATAGCTGGCTGCC
5' R-AP12	ATAGCTGGGCTAC
5' R-AP13	ATAGGACCGCTAC
5' R-AP14	ATAGGCCTTCATC
5' R-AP15	ATATCCTGGTGGC
5' R-AP16	ATATCTGCTGGCT
5' R-AP17	ATATCTGGGTGGC
5' R-AP18	GACTGCTCATCAT
5' R-AP19	ACATGCTGCTCAT
5' R-AP20	ATATGGTGGCTGT

Les réactions sont réalisées en thermocycler (MasterGradient, Eppendorf) avec comme étapes :

65°C 5 minutes, 37°C 10 minutes, 1 µl (200 unités /µl) de MMLV Reverse transcriptase (Life Technologies) est ajouté dans chaque tube (exceptés les tubes témoins de RT négative) puis 50 minutes à 37°C et 5 minutes à 75°C.

2.2- Amplification par PCR

Cette étape utilise une amorce 5'H-AP arbitraire. Les kits Genhunter proposent 80 H-AP différentes dont la combinaison avec les 3 HT11 permet de réaliser 240 amplifications différentes qui couvrent 96 % du transcriptome de cellules Hela, sur lesquelles le système a été mis au point [Liang & Pardee, 1992]. 72 combinaisons ont été utilisées dans notre approche (tableau 1 page 46). Les produits d'amplification ne sont donc pas ciblés puisque les oligonucléotides H-AP sont aléatoires. Cette PCR est réalisée dans des conditions de faible stringence en utilisant une température d'hybridation de 40°C. Il est bien entendu nécessaire de réutiliser le même oligonucléotide 3'HT11 que celui utilisé pour la synthèse des ADNc.

	(µl)
H ₂ O	10
Tampon de PCR 10x (avec MgCl ₂) Genhunter	2
dNTP (25 µM)	1,6
5' H-AP (2µM)	2
3' HT11M (2µM)	2
Mix RT (ADNc)	2
α ³³ P dATP (10 µCi/µl) (ICN)	0,2 (2 µCi /réaction)
<u>Ampli Taq Gold (Applied Biosystem)</u>	<u>0,2 (1 unité /réaction)</u>
Total	20

Tampon de PCR 10x Genhunter Corporation (Tris HCl 100 mM pH8.4, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM et gélatine 0.01%).

Les conditions d'amplification par PCR sont les suivantes :

94°C 10 minutes (activation de la Taq polymérase Ampli taq Gold)

94°C 30 secondes

40°C 2 minutes

72°C 1 minute 30 secondes

72°C 7 minutes

stockage à 4°C

} 40 cycles

2.3- Analyse différentielle par DDRT-PCR ciblée

Une approche parallèle dans cette analyse différentielle a consisté à utiliser des amorces présentant une spécificité pour la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires. Nous avons utilisé des oligonucléotides dessinés par informatique et prévus pour s'hybrider dans les régions les plus conservées de cette famille de récepteurs, à savoir les sept domaines transmembranaires [Lopez-Nieto & Nigam, 1996].

Le protocole utilisé dans cette deuxième approche différentielle est identique pour la synthèse des ADNc. Les trois HT11M permettent de subdiviser la population totale d'ADNc.

En revanche, la PCR possède une étape d'hybridation avec des températures sensiblement plus importantes pour favoriser la spécificité. Le mélange réactionnel est fondé sur les mêmes éléments exceptés les oligonucléotides. La PCR ne requiert plus l'amorce 3'HT11M. La PCR utilise en effet des amorces internes arbitraires (tableau 1 page 46) baptisées R-AP (Receptor Arbitrary Primer). Après synthèse dans le commerce (MWG-Biotech AG, Annexe 2 page 183), elles sont utilisées sous forme de plusieurs sets (pools) dans l'analyse (tableau 2).

Tableau 2: Sets d'oligonucléotides pour la DDRT-PCR ciblée

	R-AP utilisés
Set 1	1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 16
Set 2	2, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 17
Set 3	2, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 18
Set 4	1, 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16
Set 5	1, 6, 11, 16, 17, 18, 19, 20
Set 6	1, 2, 3, 4, 5, 7, 12, 17
Set 7	2, 7, 11, 12, 13, 14, 15, 17
Set 8	2, 7, 12, 16, 17, 18, 19, 20
Set 9	1, 2, 3, 4, 5, 8, 13, 18

2.4- Séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant

La séparation des produits de PCR est réalisée sur un gel de polyacrylamide 4,5% dénaturant (HR 1000 4,5%, Beckman Coulter). Le système utilisé (Genomyx LR, Beckman Coulter) permet de réaliser des gels de grande taille (61 X 33 cm). Ils permettent de séparer

les produits de PCR avec une résolution suffisante pour analyser des amplifiats de 200 à 1500 paires de base. L'appareil effectue une séparation à puissance constante (100 W), à température constante (50°C) à 2700V pendant 3h30.

Les échantillons sont déposés de manière à pouvoir comparer les différents lots très facilement. Les répliquats contrôle sont déposés à côté des répliquats des lots infectés.

Le gel ainsi obtenu est démonté. Toujours fixé à l'une des plaques, il est séché dans l'appareil selon un programme de ventilation chauffée à 50°C. L'urée cristallise à la surface du gel. Trois séquences de séchage séparées par un rinçage à l'eau permettent d'obtenir un gel de polyacrylamide sec et dépourvu de toute trace d'urée. Ce dernier toujours sur l'une des plaques est placé en cassette étanche avec un film autoradiographique (Kodak Biomax 61 X 33 cm).

Le gel est laissé en exposition le plus souvent entre 40 et 45 heures puis le film est révélé (révélateur et fixateur GBX Kodak). Les autoradiogrammes sont enfin analysés.

2.5- Analyse et excision des bandes différentielles

Les profils d'amplification attendus dans chaque combinaison d'amorces doivent être similaires pour les deux répliquats de chaque lot d'animaux. Les pistes contrôles doivent présenter entre elles une très grande majorité d'amplifiats similaires ainsi que les deux pistes expérimentales. L'analyse consiste ensuite à comparer les répliquats contrôles avec les répliquats expérimentaux. Un exemple d'analyse est représenté sur la figure 11 page 50.

La détection des bandes différentielles est matérialisée par l'apparition ou la disparition de signaux dans les lots expérimentaux par rapport aux lots témoins ou par des signaux présentant des intensités différentes entre les deux lots d'animaux. Une taille minimum des produits excisés est fixée à 300 paires de base. En effet, les produits de PCR contiennent l'extrémité 3' non traduite de l'ADNc. Cette région ne permet pas d'identifier ultérieurement le candidat séquencé par manque d'homologie. Même si l'identification n'est pas nécessaire dans un premier temps, il est préférable de limiter l'excision des candidats différentiels à ceux présentant potentiellement dans leur séquence une partie du cadre de lecture. C'est pourquoi, seules les bandes différentielles supérieures ou égales à 300 pb sont étudiées.

Les bandes d'intérêt sont ensuite repérées directement sur le gel après superposition parfaite avec l'autoradiogramme. Les bandes sont alors marquées puis excisées avec un

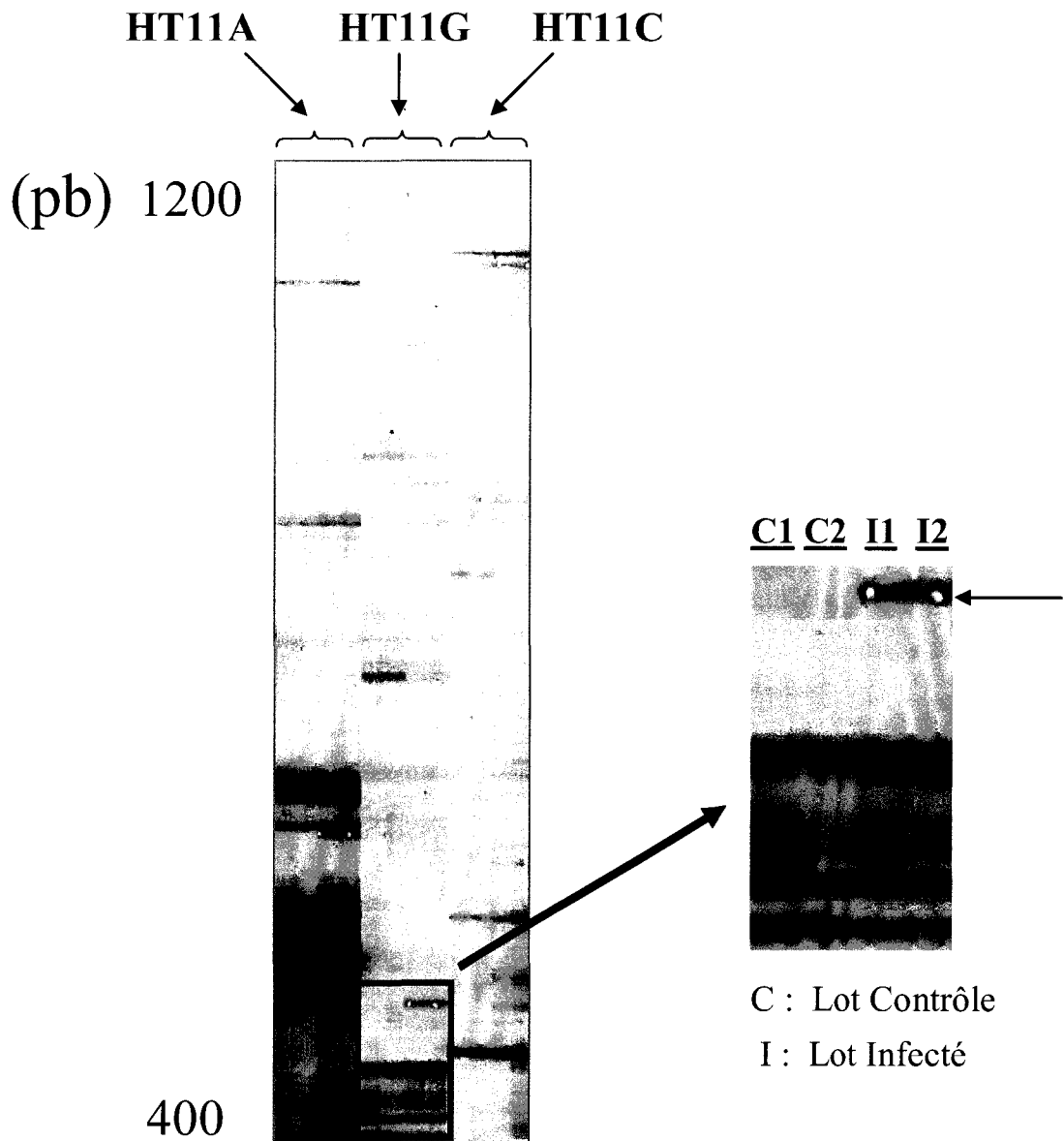


Figure 11: Exemple de profil d'amplification obtenu par DDRT-PCR.

Les profils électrophorétiques sont toujours analysés répliqués contrôles par rapport à répliqués expérimentaux (infectés). L'exemple fléché sur la région agrandie présente un signal identique dans chaque répliquat et il est clairement différentiel lorsqu'on compare les deux lots d'animaux. Les points blancs apparaissant sur ce candidat sont les trous réalisés dans l'autoradiogramme afin de superposer ce dernier avec le gel et d'exciser la bande d'intérêt.

scalpel stérile. Elles sont reprises dans 50 µl d'eau stérile. Après une agitation au vortex de 3 minutes, les tubes sont laissés à température ambiante 12 heures de manière à permettre l'élution de l'ADN hors du gel.

2.6- Réamplification des produits par PCR

Les produits d'intérêt sont réamplifiés avec les mêmes amorces que la *DDRT-PCR*. Le protocole est légèrement différent et n'utilise plus de radiomarquage :

	(µl)
H ₂ O	14,4
Tampon de PCR 10x (avec MgCl ₂) Applied Biosystem	4
dNTP (250 µM)	3,2
5' H-AP (2µM)	4
3' HT11M (2µM)	4
Produit élué	10
<u>Ampli Taq Gold (Applied Biosystem)</u>	<u>0,4 (2 unités /réaction)</u>
Total	40

Tampon PCR 10x Applied Biosystem (Tris HCl 100 mM pH8.3, KCl 500 mM, MgCl₂ 25 mM).

Les conditions d'amplification par PCR sont les suivantes :

94°C 10 minutes (activation de la Taq polymérase)
94°C 30 secondes
40°C 1 minute
72°C 1 minute 30 secondes
72°C 7 minutes
stockage à 4°C

} 40 cycles

Ces produits après contrôle sur gel d'agarose 2%, sont clonés et séquencés.

3- Clonage moléculaire des gènes d'intérêt

Les analyses biochimiques et moléculaires ont permis la caractérisation partielle de certaines molécules.

L'analyse biochimique a mené à la séquence partielle de peptides. L'étape suivante a consisté à obtenir la séquence nucléotidique correspondante puis à la compléter par criblage dans des banques d'ADNc de sangsues ou par RACE-PCR.

La même démarche a été utilisée dans l'analyse moléculaire car après avoir démontré l'intérêt de certains candidats de DDRT-PCR, les étapes ultérieures ont porté sur le clonage complet de l'ADNc correspondant. La détermination est soit réalisée par analyse manuelle des séquences étudiées, soit à l'aide du programme informatique Primer3 (Annexe 2 page 183). La synthèse de ces amorces oligonucléotidiques est réalisée dans le commerce (MWG-biotech AG, Allemagne, Annexe 2 page 183).

3.1- Clonage partiel à l'aide d'oligonucléotides dégénérés

Le clonage moléculaire des candidats biochimiques (P7 et P9) et d'autres gènes étudiés au cours ou la suite de notre approche moléculaire différentielle (famille des Cathepsines et Actine) a été réalisé à l'aide d'oligonucléotides dégénérés pour des motifs particuliers de certaines séquences. Afin d'obtenir la séquence nucléotidique codant les deux peptides, des motifs peu dégénérés ont été choisis de manière à utiliser deux amorces à chaque extrémité du fragment connu. Les cathepsines ont été clonées en choisissant dans les séquences de cathepsines d'autres espèces des régions très conservées et peu dégénérées en nucléotides.

Le détail de ces différents oligonucléotides utilisés est reporté dans le tableau 3 page 53.

Le protocole d'amplification utilisé est le suivant :

A- Synthèse d'ADNc

	(μ l)
H ₂ O	x
ARN totaux traités à la DNase (2 μ g)	y
<u>oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500μg/ml)</u>	<u>1</u>
Total	12,6
10 minutes à 70°C (thermocycler) puis sur glace	
ajouter :	
Tampon de synthèse 5x Life Technologies	4
DTT (0,1 M)	2
<u>dNTPs (25 mM)</u>	<u>0,4</u>
Total	19

Tampon 5x Life Technologies (Tris HCl 250 mM pH8.3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM)

Tableau 3: Oligonucléotides de synthèse utilisés dans les différents clonages moléculaires (5' - 3')

24.1 Rv1 (5'RACE-PCR)	ACTCCATTACTTTTGAGAAC
24.1 Rv2 (5'RACE-PCR)	TTAAAACCTTGTTGTTGGAAG
5'Fw vecteur 1 (banque)	CGCTTTGCCTGACCCTGCTTGC
5'Fw vecteur 2 (banque)	CGCCGTTACAGATCCAAGCTCC
Actine Fw (3'RACE-PCR)	GATCTGGCATCACACCTTCTACAA
Actine-Fw (dégénéré)	TCGTSACMAACTGGGACGATATGGA
Actine Rv (5'RACE-PCR)	GTTGAAGGTCTCGAACATGATCTG
Actine-Rv 1 (dégénéré)	GKCGSCACCAMCACTTACTCATTGG
Actine-Rv 2 (dégénéré)	GKCGSCACCAMCACTTTTCTCATTGG
CathepsineB Fw1 (3'RACE-PCR)	GGAAGTGAAGCATGGCCCC
CathepsineB Fw2 (3'RACE-PCR)	GCTGCACTCACCGTCTACTCTG
CathepsineB Rv1 (banque)	CAGAGTAGACGGTGAGTGCAGC
CathepsineB Rv2 (banque)	GGGGCCATGCTTCATCAGTTCC
CathepsineL Fw1 (dégénéré)	TGCGGGTTCGTGYTGGCNTT
CathepsineL Fw2 (3'RACE-PCR)	CTAGTGAAGAAYTCNTGGGG
CathepsineL Rv1 (dégénéré)	GTGCCCCAGGARTTYTTNAC
CathepsineL Rv2 (banque)	AAGGCCAGCANGANCCRCA
Cathepsines famille Rv	TCCCCAGGTGGTTCCCCAAGARTT
CathepsineZ Fw1 (3'RACE-PCR)	GGCCGGGAGAAGATGATGAAAG
CathepsineZ Fw2 (3'RACE-PCR)	TTACCAGCGGTCCGATCAGCTG
CathepsineZ Rv1 (banque)	CAGCTGATCGGACCGCTGGTAA
CathepsineZ Rv2 (banque)	CTTTCATCATCTTCTCCCGGCC
Cystatine B Rv1 (banque)	TCAGTTCATCGTGTGTTTGTCTTCG
Cystatine B Rv2 (banque)	GAGTTCAGGTTGGCCCCAC
Cystatine C Fw1 (3'RACE-PCR)	ATTGTTAGGCGGGGTGGAGGGTT
Cystatine C Fw2 (3'RACE-PCR)	GGAGGAAGATGAAGAAGAGATGAC
Cystatine C Rv (banque)	GACGTTCAACTTGTACAACATTCC
oligo d(T) adapter	CGAGTCGACATCGATCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
P7 Fw-1 (dégénéré)	AARGCNAARGAYCAGGAA
P7 Fw-2 (dégénéré)	AARGCNAARGAYCAGGAG
P7 Rv-1 (dégénéré)	CATNGARTANCCATCAAC
P7 Rv-2 (dégénéré)	CATNGARTANCCATCTAC
P7 Rv-3 (dégénéré)	CATNGARTANCCATCGAC
P7 Rv-4 (dégénéré)	CATNGARTANCCATCCAC
P7Fw1 (3'RACE-PCR)	AAGGCGAAGGATCAGGAATGTAGCGGGATCATAA
P7Fw2 (3'RACE-PCR)	AATGTTGTGGTTTCGTTGCAATGTTATTGGGTGGA
P9 Fw-1 (dégénéré)	GAYCAYCAYGARGATCAT
P9 Fw-2 (dégénéré)	GAYCAYCAYGARGATCAC
P9 Rv-1 (dégénéré)	YTRTCNGCRTAATCTTT
P9 Rv-2 (dégénéré)	YTRTCNGCRTAATCCTT
P9Fw1 (3'RACE-PCR)	GATCATGGACACGACGACCACGAAC
P9Fw2 (3'RACE-PCR)	CCACGAACACGAAGAATTAACGCTG
P9Rv2 (5'RACE-PCR/banque)	GTTTCTCGGCAGCAGTCAAT
P9Rv1 (5'RACE-PCR/banque)	GATGGCGGTCAACTCTAGCT

(AT=W; AC=M; AG=R; TG=K; GC=S; TC=Y; AGCT=N)

Après 2 minutes à 42°C ajouter 1µl (200 unités/µl) de Superscript II RNase H⁻ RTase (Life Technologies); 50 minutes à 42°C puis 15 minutes à 70°C.

B- Amplification par PCR

	(µl)
H ₂ O	37,4
Tampon de PCR 10x (avec MgCl ₂) Q Biogen	5
dNTP (25 mM)	0,4
amorce 5' (20µM)	2,5
amorce 3' (20µM)	2,5
Mix RT (ADNc)	2
<u>Taq DNA polymerase Q Biogen (1 unité)</u>	<u>0,2</u>
Total	50

Tampon PCR 10x Q Biogen (Tris HCl 100 mM pH9, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM, Triton X100 1%, gélatine 0.2%)

Les conditions d'amplification par PCR sont les suivantes :

94°C 3 minutes	} 40 cycles
94°C 30 secondes	
50-60°C 1 minute	
72°C 1 minute	
72°C 7 minutes	
4°C infini	

Certains clonages ont nécessité l'utilisation de deux tours de PCR avec des oligonucléotides plus internes pour le deuxième tour. Ces amorces sont détaillées dans le tableau 3 page 53.

3.2- Amplification sur les banques d'ADNc de sangsues

Le laboratoire dispose de deux banques d'ADNc de *T. tessulatum* totale insérées de façon orientée dans le vecteur pBM8 (Biométhodes, Génopôle Industries, Evry, France). L'une est une banque contrôle et l'autre est une banque stimulée où les animaux ont été infectés de la même manière que ceux utilisés lors de l'analyse moléculaire. Les deux banques ont également été construites à partir de populations d'animaux de stade 2 totalement à jeun par une approche utilisant des oligos (dT).

Ces banques d'ADNc ont été utilisées dans certains cas pour obtenir la séquence des extrémités 5' et/ou 3' des ADNc des gènes d'intérêts.

Le protocole utilisé est une PCR classique utilisant des amorces homologues pouvant être dirigées vers l'extrémité 5' ou vers l'extrémité 3' des clones d'ADNc.

Les protocoles utilisés sont les suivants :

A- Clonage de l'extrémité 5' de l'ADNc

	(μ l)
H ₂ O	37,4
Tampon de PCR 10x (avec MgCl ₂) Q Biogen	5
dNTP (25 mM)	0,4
amorce 5' homologue du vecteur de la banque (20 μ M)	2,5
amorce 3' homologue de la molécule à cloner (20 μ M)	2,5
ADN plasmidique dilué au 1/200 ^e (banque)	2
<u>Taq DNA polymerase Q Biogen (1 unité)</u>	<u>0,2</u>
Total	50

Les conditions d'amplification par PCR sont les suivantes :

94°C 3 minutes

94°C 30 secondes

55°C 1 minute

72°C 1 minute et 30 secondes

72°C 7 minutes

stockage 4°C

} 40 cycles

B- Clonage de l'extrémité 3' de l'ADNc

	(μ l)
H ₂ O	37,4
Tampon de PCR 10x (avec MgCl ₂) Q Biogen	5
dNTP (25 mM)	0,4
amorce 5' homologue de la molécule à cloner (20 μ M)	2,5
3' Oligo (dT) adapter (20 μ M)	2,5
ADN plasmidique dilué au 1/200 ^e (banque)	2
<u>Taq DNA polymerase Q Biogen (1 unité)</u>	<u>0,2</u>
Total	50

Les conditions d'amplification par PCR sont les suivantes :

94°C 3 minutes	}	40 cycles
94°C 30 secondes		
55°C 1 minute		
72°C 1 minute et 30 secondes		
72°C 7 minutes		
stockage 4°C		

Comme les PCR utilisant des amorces dégénérées, le criblage par PCR dans les banques peut requérir l'utilisation de deux tours de PCR. Dans ce cas, deux amorces homologues dans l'extrémité 5' du vecteur des banques sont disponibles (tableau 3 page 53). Ces amorces sont utilisées pour cloner les extrémités 5' des ADNc.

3.3- Clonage des extrémités 5' et/ou 3' par RACE-PCR

La 3' RACE-PCR utilise d'abord un protocole de synthèse d'ADNc analogue à celui présenté dans la partie A du 3.1 page 52, basé sur l'hybridation d'un oligonucléotide (dT) sur la queue polyA des ARNm. L'amplification par PCR utilise quant à elle le protocole suivant :

	(µl)
H ₂ O	37,4
Tampon de PCR 10x (avec MgCl ₂) Q Biogen	5
dNTP (25 mM)	0,4
amorce 5' homologue de la molécule à cloner (20µM)	2,5
3' Oligo (dT) adapter (20µM)	2,5
Mix RT (ADNc)	2
<u>Taq DNA polymerase Q Biogen (1 unité)</u>	<u>0,2</u>
Total	50

Les conditions d'amplification par PCR sont les suivantes :

94°C 3 minutes	}	40 cycles
94°C 30 secondes		
50-55°C 1 minute		
72°C 1 minute et 30 secondes		
72°C 7 minutes		
stockage 4°C		

Deux tours peuvent être nécessaires dans la PCR. Dans ce cas, une amorce 5' homologue est utilisée dans le premier tour et une autre homologue plus interne est utilisée dans le second.

L'approche en 5' RACE-PCR requiert un protocole en trois étapes :

A- Synthèse des ADNc

	(μ l)
H ₂ O	x
ARN totaux traités (5 μ g)	y
<u>Amorce 3' homologue de la molécule à cloner</u>	<u>1 (500μg/ml)</u>
Total	25,2
10 minutes à 70°C (thermocycler) puis sur glace	
ajouter :	
Tampon de synthèse 5x Life Technologies	8
DTT (0,1 M)	4
<u>dNTPs (25 mM)</u>	<u>0,8</u>
Total	38

Après 2 minutes à 42°C ajouter 1 μ l (200 unités / μ l) de Superscript II RNase H⁻ RTase (Life Technologies); 55 minutes à 42°C ; ajouter 1 μ l (2 unités / μ l) de RNase H (Life Technologies) puis 15 minutes à 55°C.

B- Addition de la queue poly A en 5' (tailing)

	(μ l)
Mix RT (ADNc)	15
Tampon de synthèse 5x (RT) Life Technologies	2
<u>dATP (2mM)</u>	<u>2</u>
Total	19
5 minutes à 70°C ; 10 minutes à 37°C ; ajouter 1 μ l (15 unités / μ l) de rTdT (Life Technologies) puis 5 minutes à 37°C et 10 minutes 65°C.	

C- Amplification par PCR

	(μ l)
H ₂ O	37,4
Tampon de PCR 10x (avec MgCl ₂) Q Biogen	5
dNTP (25 mM)	0,4
5' Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ (20 μ M)	2,5
amorce 3' homologue de la molécule à cloner (20 μ M)	2,5
Mix étape B (tailing)	2
<u>Taq DNA polymerase Q Biogen (1 unité)</u>	<u>0,2</u>
Total	50

Les conditions d'amplification par PCR sont les suivantes :

94°C 3 minutes	}	40 cycles
94°C 30 secondes		
45-50°C 1 minute		
72°C 1 minute et 30 secondes		
72°C 7 minutes		
stockage 4°C		

Il est parfois nécessaire de réaliser une amplification en deux tours dans la PCR. Pour cela, le premier tour utilise l'amorce 3' utilisée pour la synthèse des ADNc et le deuxième tour utilise une amorce 3' plus interne (tableau 3 page 53).

4- Clonage et séquençage des Produits d'intérêt

Le clonage des produits de PCR utilise le kit pGEM-T Easy Vector System (Promega).

pGEM-T Easy Vector (50 ng/μl)	1 μl
Tampon de ligation 2x	10 μl
Produit de PCR	8 μl
<u>T4 DNA Ligase</u>	<u>1 μl</u>
Total	20 μl

La ligation des produits dans le vecteur est réalisée à 4°C sur la nuit.

Les produits de ligation sont ensuite transformés dans des bactéries compétentes JM 109 disponibles dans le kit. Remarquons simplement que les vecteurs sont incorporés dans les bactéries par un choc thermique de 40 secondes à 42°C qui fragilise les membranes bactériennes. Ces bactéries sont ensuite laissées au repos dans un milieu nutritif 1 heure et 30 minutes à 37°C avant d'être étalées sur boîte de Petri (milieu de Luria Broth (LB)-Agar 15 g.L⁻¹ complété avec de l'ampicilline 100 μg.mL⁻¹ final, X-Gal 40 μg.mL⁻¹ final et IPTG 100 μg.mL⁻¹ final). Elles sont laissées en incubation à 37°C toute la nuit. Un test blanc-bleu permet de sélectionner les colonies bactériennes ayant incorporé le complexe vecteur-insert.

Les colonies d'intérêt sont incubées sous agitation 12 heures à 37°C dans 5 ml de LB-ampicilline 100 μg.mL⁻¹ final.

Une extraction de l'ADN plasmidique est ensuite effectuée à l'aide du kit d'extraction Qiaprep mini Kit ou Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen). Une fraction de l'ADN plasmidique est digérée par l'enzyme de restriction Eco RI pour vérifier la présence et la taille de l'insert ligé dans le vecteur.

Les clones positifs sont séquencés à l'aide d'une chimie BigDye Terminator v3.0 sur un séquenceur capillaire ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

Les séquences sont comparées aux banques protéiques Swissprot à l'aide du programme d'alignement BLAST X 2.1.2 [Altschul *et al.*, 1997]. Des alignements sont réalisés également sur les génomes de *Drosophila melanogaster* à l'aide du BLAST N 2.2.2 [Altschul *et al.*, 1997] qui aligne directement la séquence nucléotidique sur les banques de génome ou d'EST (Annexe 2 page 183). Le seuil de signification statistique a été fixé à $E=1000$ (expect) et il n'est pas fait usage de filtre. Les résultats du séquençage des candidats sont détaillés dans le chapitre suivant et indiquent le E (expect) maximum obtenu ainsi que l'espèce correspondante pour chaque candidat [Karlin & Altschul, 1990].

5- Distinction des clones issus de chaque candidat différentiel

La réaction de PCR réalisée dans les conditions peu stringentes que nécessite la technique de *DDRT-PCR* peut générer différents artefacts. Parmi ces derniers, une possibilité est que la bande différentielle extraite et réamplifiée peut comporter plusieurs produits de PCR de même taille. Dans ce cas, il est nécessaire de découvrir lequel des différents produits de taille identique correspond à l'amplification d'un messager différentiellement exprimé. Nous avons défini la stratégie suivante afin de détecter l'éventuelle existence de tels artefacts. Lors du clonage, 5 colonies différentes sont sélectionnées par candidat (5 clones X.1, X.2, X.3, X.4 et X.5). Parmi celles-ci un seul clone est initialement séquencé. Deux amorces oligonucléotidiques homologues sont synthétisées à partir de cette séquence (tableau 4 page 60). Ces amorces sont utilisées pour vérifier par PCR si les 4 autres clones sont identiques au premier (amplification possible) ou différents (pas d'amplification possible). Dans ce dernier cas, tous les clones sont séquencés et soumis aux mêmes contrôles ultérieurs. Ce contrôle utilise le même protocole que dans la réamplification des candidats. Il est important de noter que le clone séquencé parmi les 5 n'est pas toujours le clone X.1. Il se peut que l'ADN inséré de l'un des 5 soit mieux extrait ou mieux digéré après clonage. Cela conditionne le choix du clone séquencé.

Tableau 4: Oligonucléotides de synthèse pour la distinction des clones de DDRT-PCR

Candidat	Oligo (5' - 3') forward	Oligo (5' - 3') reverse
2.1	AACAACCCGAGCAATTAAC	TCCAACAGATGTGGATCA
3.4	CAAAGAGTTCAAAGCCATTC	TCAGTTCATCGTGTTTTGTC
4.5	AAGGAACGGACTGCATAGA	ACATAATCATCCCCTCTGC
7.1	TGGGCTCTAAATGAAATGAG	AATGATGAATGGACTCCAAG
9.2	CTTACTGAGGAAGAAGTC	CTCTATGAGCTCTGATTTTC
10.2	GTAGTTCTCAAAGCTGTCTG	CAAGATCTTACCAGCTTCTT
11.1	ATGACATAGTCAACCATCAC	CATAGCTGAAGAGAGAGACA
13.1	GATATCGTCCACATCAAAG	ACACACACCCTGTTATACAT
14.1	TGAAAGTACTTCTACCATCG	CAGAATCAGTTTTCTGGTAG
15.1	AGTATAACGTGGTCGATTAG	CACTTCCCAGTTTTTGTAAC
16.4	GGGTGAGAAAAAGACAAG	CTCCTCGTCTTCAGATTC
19.1	CTTTAACACGACTCGAAAG	CATAGCTGAAGAGAGAGACA
20.5	GTAAGATAACCGGCATGTTG	GCGTCACAACACAAGATTAGT
22.1	GTTAGGAGACGCATACATA	GGTTGGGATGTCTATTTAGT
23.1	GGAAGTATATTGACCAAACG	TCCCCTGATTTACTTGAC
24.1	GTTGTGCTTTGTGATCTG	GAGACTTGGTGAATCATAAC
25.1	GAGTTGAAGAACACCCTTA	ATTCGTCCAACACCTCTA
26.1	GGTTATTGAGAGAACTTCGT	ACAAGGAGTTGAAGAATACC
27.1	CCAGATGTTAGAATGAACAC	CTGTTGTTGAATCCTCCT
28.2	GCTGTTAGGAGACGCATACA	CGGGTAACAATCCGTATCTT
29.1	CATTTGTCCTGAACCTCTA	TACAGATATGGAACGAGAAG
30.1	AACATCTGATACAAGTGGAC	TCTTGCCAACCTCGTTATAC
32.5	ACCTAAAGATGCCACCATTC	GATTACGCCAAGCTATTTAGG
33.1	TAAAGACCTGCAAGCTACTA	CATCATCACCATGTACAATC
35.1	GCATACACAAAGAAGGTGACA	AGAGTGACTTCCTGAGGGTTAT
36.1	GACTGAAAAGACAATCACC	TCTATGAACTTCAGGTTGAC
37.1	TCTGGTTGGAATGGTGACAA	AATCCCCAGCTACATTTCCA
38.2	GAGTAGGTTTGATTGGGTTTG	CGTAAACTCTCAAGTGCCTTAT
39.1	GACTGAAAAGACAATCACC	GATGAACTTCAGGTTGACT
46.1	GAAGGTGACAAGTTGGTAAAGA	AGAGTGACTTCCTGAGGGTTAT

6- Contrôle par Northern Blot

6.1- Elaboration des membranes

Les ARN totaux sont d'abord séchés au Speed-Vac puis redissous dans 20 µl d'un tampon de reprise (Formaldéhyde 3.7% ; Formamide 50% ; Tampon Phosphate 0.02 M pH7.2 ; Bromure d'éthidium 0.004% ; EDTA 0.2 µM ; Bleu de Bromophénol 0.025% ; Xylène Cyanol 0.025% ; Glycérol 5% finaux). Les échantillons sont chargés en quantité égale sur un gel d'agarose 1% dénaturant (Tampon Phosphate 0.02 M pH7.2 final ; Formaldéhyde 7.2% final) puis séparés par électrophorèse dans un tampon de migration (Tampon Phosphate 0.02 M pH7.2 ; Formaldéhyde 3.7%) pendant 3 heures à 130 V constants.

Le gel est ensuite transféré sur membrane de nylon neutre (Hybond, Amersham) sur la nuit par transfert ascendant passif. La membrane après contrôle du transfert sous U.V est cuite 2 heures en étuve à 80°C.

6.2- Synthèse des sondes radioactives

Le fragment d'ADNc d'intérêt provient le plus souvent d'une extraction d'ADN plasmidique, suivie d'une digestion enzymatique (EcoRI) et d'une purification de l'insert digéré (système Wizard, Promega).

50 ng de ce fragment sont ensuite incorporés à une réaction de synthèse déjà prête (contenant 4 unités du fragment de Klenow, les dTTP, dGTP, dATP, les amorces internes aléatoires 9 mers et le tampon de l'enzyme) sous forme déshydratée (Ready to go system, Amersham Pharmacia Biotech) à laquelle sont ajoutés 50 µCi de dCTP- α ³²P (3000 Ci/mMol). Le mélange est incubé 30 minutes à 37°C puis l'ADN double brin radiomarqué synthétisé est purifié sur colonne Sephadex G50 (Amersham Pharmacia Biotech).

Les quantités de sondes purifiées sont ensuite évaluées à l'aide d'un compteur à scintillation liquide. Pour cela, une fraction de la sonde est ajoutée à 2 ml de liquide scintillant afin d'estimer en coups par minute (cpm) la quantité de radiomarquage présent dans l'échantillon.

6.3- Hybridation et rinçage des membranes

Avant l'hybridation, la membrane est pré-hybridée avec 50 ml de tampon (SSPE 5x ; Formamide 50% ; solution de Denhardt's 5x ; SDS 1% ; 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'ADN de sperme de Saumon préalablement dénaturé) pendant 3 heures à 42°C sous agitation. Ensuite, la sonde préalablement dénaturée 2 minutes à 95°C est ajoutée au tampon déjà présent de manière à constituer le tampon d'hybridation. Le volume du tampon peut être réévalué afin d'obtenir une sonde à 2.10^6 cpm.mL⁻¹.

Après l'hybridation la membrane est ensuite lavée par des bains successifs :

2 lavages rapides de la membrane avec un tampon SSC 2x ; SDS 0.1%

20 minutes avec SSC 2x ; SDS 0.1% (T° amb.)

5 minutes avec SSC 0.5x ; SDS 0.1% (T° amb.)

5 minutes avec SSC 0.1x ; SDS 0.1% (T° amb.)

Le lavage peut être poursuivi si le rapport signal/bruit de fond n'est pas suffisant par un rinçage plus stringent de 5 minutes avec SSC 0.1x ; SDS 0.1% à 42°C.

La membrane est exposée en cassette entre 1 et 24 heures avec un film (XAR-5, X-Omat, Kodak) afin d'être autoradiographiée.

Les ARN messagers mis en évidence peuvent être analysés par un système de scanner et d'analyse semi quantitative (Système de Densitométrie GS 710, Biorad Laboratories).

7- Contrôle par Biopuces à ADN

Ce type de contrôle a été réalisé dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire des Biopuces implanté à l'institut Pasteur de Lille et dirigé par le Professeur Yves Lemoine. Ces travaux ont été supervisés scientifiquement par le Dr. David Hot, chercheur au Laboratoire des Biopuces et effectués avec le support technique très précieux de Mr. Ludovic Huot, technicien au Laboratoire des Biopuces.

7.1- Préparation des candidats déposés sur les lames

Les candidats différentiels ont tous été clonés dans le même vecteur (pGEM-T Easy). Leur dépôt sur les lames de verre utilisées comme support nécessite de les amplifier au moyen

de trois PCR successives. Le clonage dans un vecteur de même type permet d'utiliser des amorces aminées communes spécifiques des parties flanquant l'insert.

La grande majorité des candidats ont une taille de séquence comprise entre 300 et 600 pb ce qui correspond à la longueur optimale pour un dépôt sur lame de verre. Les quelques candidats sortant de ces limites sont réamplifiés spécifiquement avec de nouveaux oligonucléotides homologues plus internes. Ces oligonucléotides sont détaillés dans le tableau 5 pour les candidats concernés. Les trois PCR successives sont réalisées avec les amorces du vecteur (tableau 5) et selon le protocole suivant :

	(µl)
H ₂ O	78,7
Tampon de PCR 10x Qiagen	10
dNTP (25 mM)	0,8
amorce vecteur Fw (20 µM)	2,5
amorce vecteur Rv (20 µM)	2,5
HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen)	0,5 (2,5 unités/réaction)
<u>ADNc (candidat inséré dans vecteur)</u>	<u>5</u>
Total	100

Tampon de PCR 10x Qiagen (Tris HCl 100 mM pH8.3, KCl 500 mM, (NH₄)₂SO₄ 50mM, MgCl₂ 15 mM).

Les conditions de PCR sont les suivantes :

95°C	15 minutes	
94°C	30 secondes	} 30 cycles
55°C	1 minute	
72°C	1 minute	
72°C	10 minutes	
stockage à 4°C		

Tableau 5: Oligonucléotides de synthèse utilisés pour l'élaboration des Puces à ADN

	amorce (5' - 3') Forward	amorce (5' - 3') Reverse
candidat		
38.2	TAAACACAAGGTGCCAGTGC	GAGGTTCTCAAGGGACGATG
37.1	TCTGGTTGGAATGGTGACAA	AATCCCCAGCTACATTTCCA
64.1	ACGACGCGTTGAGAATAAGG	TTCGGAGTTCCCTTTTGAGA
amorces du vecteur	NH2C6-GCGGCCGCGGAATTCGATT	NH2C6-GCGGCCGCGAATTCAGT

Ces amplifications sont réalisées à l'UMR 8017 et la suite des travaux est réalisée au Laboratoire des Biopuces.

Les produits amplifiés possèdent à leurs extrémités 5' un groupement amine porté par un bras aliphatique de 6 carbones, ce groupement amine est indispensable pour la liaison covalente avec la lame (cf. 7.2). Les trois amplifiats pour chaque candidat sont regroupés puis purifiés par filtration sur membrane (système Multiscreen, Millipore) et séchés sous vide (speed-vac pendant 1 heure, T° ambiante). Chaque produit concentré est alors utilisé pour le dépôt sur la lame.

7.2- Construction des lames

Les lames de verre utilisées (Genetix Microarray Slides) sont commercialisées après un traitement spécifique. Il y a fonctionnalisation du verre pour obtenir à sa surface des groupements Aldéhydes qui permettront l'interaction et la formation d'une liaison covalente avec les groupements amines des amorces de chaque produit.

Le dépôt est réalisé par un automate (Arrayer GMS417) dans un environnement dont la température et le taux d'humidité sont contrôlés (22°C et 60% d'humidité relative). La technique de dépôt utilisée, le « pin and ring » (aiguille et anneau), forme des spots d'environ 160 µm de diamètre estimés approximativement à 50 picolitres. Les candidats sont déposés en triplicat afin de réaliser une moyenne des trois spots pour chaque hybridation.

La fixation de l'ADN au verre et le traitement des lames après dépôt se fait d'après un protocole inspiré de la méthode utilisée par Schena [Schena *et al.*, 1995]. Les lames sont hydratées dans une chambre saturée en humidité (90%) à 37°C pendant au moins 8 heures. Les fonctions de surface sont réduites dans un bain de NaBH₄ au moins 8 heures à 42°C sous agitation afin de rendre irréversible les liaisons lame-produit de PCR et de saturer les groupements aldéhydes encore libres (figure 12 page 65). Cette étape est déterminante car elle augmente le rapport signal/bruit de fond. Les ADN double brins sur les lames sont dénaturés par un bain de 3 minutes dans de l'eau à 95°C ; 2 minutes à 42°C dans un bain de SDS 0.2% puis 2 bains successifs d'1 minute dans de l'eau milliQ à 42°C. Les lames sont séchées par centrifugation (placées sur la tranche sur un papier filtre) 4 minutes à 2000g. Enfin, en attendant l'hybridation, elles sont stockées dans une cloche sous vide.

7.3- Synthèse des sondes

Elle est effectuée à partir de 15 µg d'ARN totaux. Une étude préalable nous a permis de déterminer que cette quantité est légèrement au dessus de la quantité de matériel

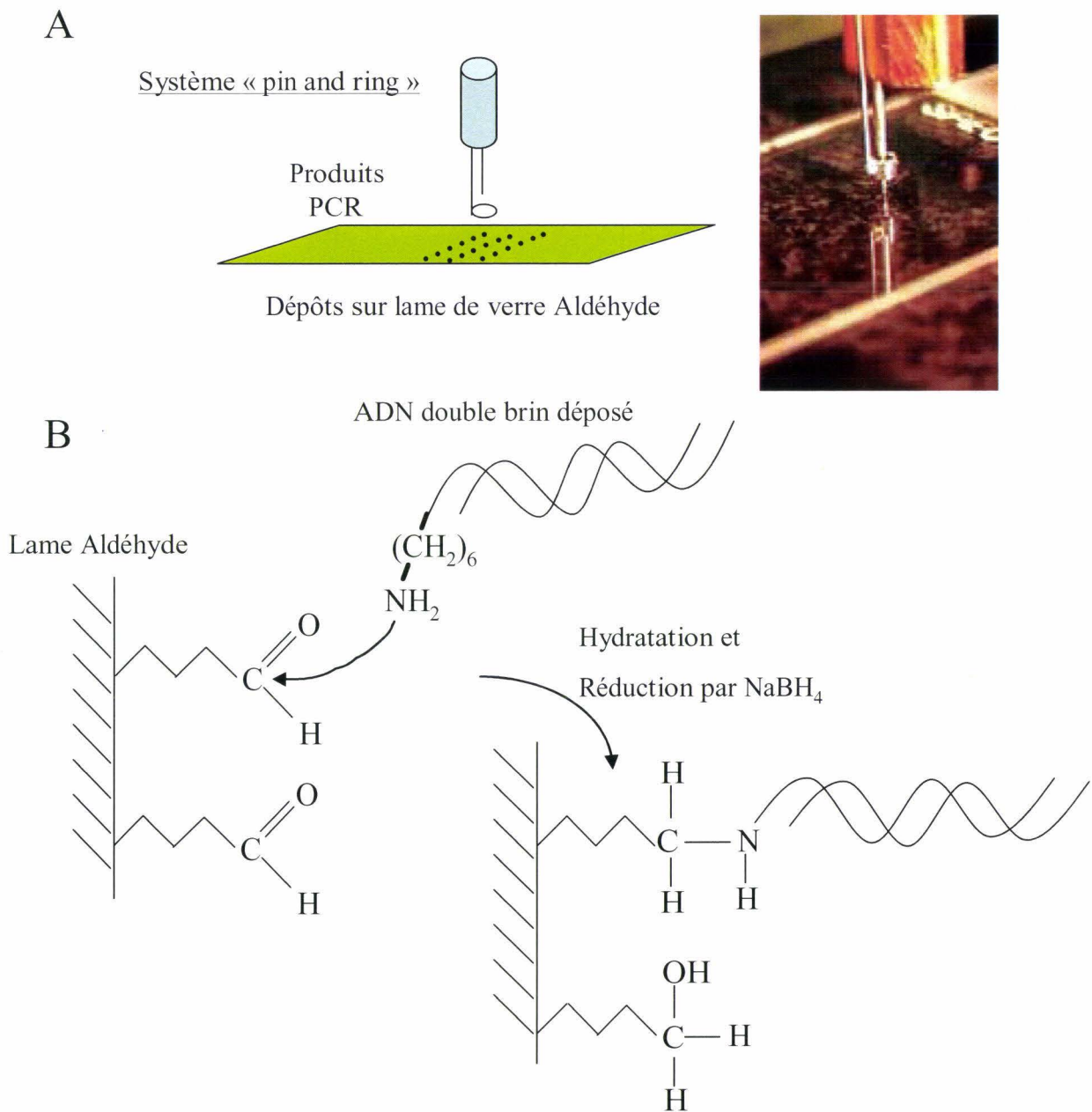


Figure 12: Elaboration et traitements des Biopuces à ADN.

A- Le système de dépôt par aiguille-anneau (pin and ring) est basé sur le passage de l'aiguille qui entraîne une quantité constante de produit (retenu sur l'anneau par tension superficielle) et le dépose sur la lame.

B- Les traitements chimiques suivants assurent la stabilité des produits sur la lame et réduisent le bruit de fond en saturant les aldéhydes libres.

nécessaire pour obtenir une hybridation facilement détectable et quantifiable sur 50 à 60% des spots. Les sondes sont réalisées à partir des deux lots de sangsues de stade2 : un lot contrôle et un lot d'animaux infectés par un mélange de bactéries.

Les synthèses utilisent deux types de dCTP fluorescents : les dCTP-Cy3 et dCTP-Cy5. Un des deux est incorporé pour chaque lot. Il y a alors les combinaisons suivantes :

- Contrôle Cy3 – Infecté Cy5 (expérience répétée trois fois)
- Contrôle Cy5 – Infecté Cy3 (expérience répétée trois fois)
- Contrôle Cy3 – Contrôle Cy5
- Infecté Cy3 – Infecté Cy5

Lors de la synthèse des sondes, un système de contrôles internes est mis en place en utilisant des fragments de gènes de houblon. Quatre produits de PCR provenant de 4 gènes différents de houblon sont déposés sur la lame en même temps que les gènes de la sangsue. Les ARN de ces gènes sont synthétisés *in vitro* et rajoutés aux préparations d'ARN de sangsue à des concentrations différentes créant ainsi une gamme d'intensités ce qui permet de calibrer l'ouverture du photo-multiplieur et la puissance du laser aux longueurs d'onde spécifiques des deux sondes (sonde Cy3 à 575 nm (vert) et sonde Cy5 à 680 nm (rouge)). Ainsi, les différences mesurées pour les candidats seront directement la conséquence de variations dans la quantité de transcrits de chaque lot.

Dans chaque combinaison Cy3 – Cy5, les synthèses des deux lots sont réalisées dans des tubes distincts selon le protocole détaillé ci-dessous puis sont mélangées en vue de leur purification sur microcon-YM30

<u>Pour chaque sonde synthétisée :</u>	(μ l)
ARN totaux (15 μ g)	x
Oligonucléotide (dT) (1 μ g/ μ l, Roche)	1
Mélange transcrits <i>in vitro</i> de Houblon	4
Eau stérile	y
Total	15

5 minutes à 70°C et 1 minute sur la glace.

Ajouter le mélange réactionnel :

DTT (0.1 M)	3
Tampon de synthèse 5x	6
dNTPs froids	0.6
RNasine (40 unités/ μ l)	0.4
Bien mélanger puis :	
<u>dCTP-Cy(3 ou 5) (1mM, Amersham)</u>	<u>3</u>

Tampon de synthèse 5x (Tris HCl 250mM pH8.3, KCl 375mM, MgCl₂ 15mM)
dNTPs froids (dATP, dTTP, dGTP 25mM ; dCTP 10mM).

Placer 2 minutes à 42°C ; Ajouter ensuite 2 µl (200 unités/µl) de Superscript II RNase H⁻ RTase (Life Technologies) puis incuber 2 heures à 42°C. Stopper la réaction par 5 µl de NaOH 1N et incuber 15 minutes à 65°C ; Après quelques minutes à 25°C, neutraliser la réaction avec 12,5 µl de Tris HCl 1N pH7.4.

Les sondes ADNcCy3 – ADNcCy5 sont ensuite mélangées pour être purifiées. Cette purification est effectuée sur colonne Microcon YM30. Les réactions de synthèse sont déposées sur une colonne avec 350 µl d'eau stérile puis sont centrifugées 10 minutes à 8000g. Deux lavages de la colonne sont effectués avec 350 µl d'eau suivis successivement par la même centrifugation. Un dernier lavage avec 200 µl d'eau permet d'obtenir après centrifugation une sonde pure dans un volume d'environ 5 µl. Celle-ci est récupérée par inversion de la colonne dans un nouveau tube stérile après centrifugation.

Une fraction peut être dosée au spectrophotomètre entre 230 et 700 nm afin d'estimer le taux de sonde (550 et 650 nm, dCTP-Cy3 et dCTP-Cy5 respectivement) par rapport aux ADNc non incorporés (260 nm).

7.4- Hybridation et rinçage des lames

Les lames sont d'abord pré-hybridées dans une chambre hermétique au moins 1 heure à 42°C au bain marie (cela peut être fait pendant la synthèse des sondes). Pour cela, 15 µl de tampon de pré-hybridation (SSC 4x, SDS 0.5%, Formamide désionisée 40%, Denhardt's 2.5%) sont déposés sur les spots entre lame et lamelle et deux mini-réservoirs sont remplis avec 15 µl de tampon afin de saturer la chambre.

Ensuite, les chambres sont nettoyées, les lamelles sont retirées puis les lames égouttées. L'hybridation est réalisée à 42°C durant toute la nuit. Le tampon d'hybridation (SSC 6x, SDS 0.75%, Formamide désionisée 50%, Denhardt's 3.75%) déposé entre lame et lamelle est composé de 10 µl de tampon et des 5 µl de sonde préalablement dénaturée 5 minutes à 95°C. La chambre est également saturée avec 2 fois 15 µl de tampon d'hybridation. Une fois hybridées, les lames sont rincées. Pour cela, après avoir retiré la lamelle, les lames sont plongées dans un bain de SSC 0.1x – SDS 0.1% pendant 5 minutes à T° ambiante. Elles sont rincées définitivement par deux bains successifs de SSC 0.1x à T° ambiante. Après séchage par centrifugation sur un papier filtre, elles sont prêtes à l'analyse.

7.5- Analyse statistique des spots

Les lames sont analysées en utilisant un scanner Affymetrix 418 (Affymetrix Santa Clara, CA, USA) capable de lire les longueurs d'onde spécifiques des deux fluorescents utilisés dans les sondes. Cette lecture est effectuée à une puissance et une ouverture de Photomultiplicateur donnée qui dépend des valeurs obtenues pour les contrôles (transcrits de Houblon) afin de calibrer les deux longueurs d'onde entre elles. Il est nécessaire de ne jamais saturer les spots à analyser sinon la comparaison entre les deux lots est impossible. Ensuite, les images sont analysées par un logiciel de segmentation d'images (ImaGene™ 4.2, BioDiscovery) afin de superposer et de quantifier les profils d'intensités obtenus avec les deux fluorochromes (un lot d'animaux par fluorochrome). Le logiciel permet de fournir des valeurs chiffrées pour les deux lots d'animaux. Les valeurs incluent les triplicats de chaque candidat pour chaque hybridation répétées 6 fois (3 fois Contrôle-Cy3/Infecté-Cy5 et 3 fois Contrôle-Cy5/Infecté-Cy3). L'ensemble des données est ensuite analysé en utilisant un algorithme statistique CyberT (Annexe 2 page 183) qui permet de mettre en évidence les gènes présentant des variations d'expression significatives selon certains paramètres déterminés à l'avance. Il faut préciser qu'un seuil de sensibilité dans l'analyse a été fixé arbitrairement afin que les tests soient réalisés uniquement sur les valeurs supérieures ou égales à trois fois la valeur moyenne du bruit de fond. Les candidats présentant une intensité de marquage inférieure à ce seuil ne seront pas pris en compte dans le but d'écarter les variations non significatives. La figure 13 page 69 réunit les grandes étapes de l'analyse par Biopuces à ADN.

8- Localisation de l'expression par Hybridation *in situ*

Cette partie de l'analyse a été supervisée par le Professeur Franck Vandebulcke (UMR 8017) et fut effectuée avec le concours de Mme Annie Desmons (UMR 8017).

8.1- Préparation des tissus analysés

Des sangsues de stade 2 sont d'abord stimulées selon le même protocole que lors de l'analyse moléculaire par DDRT-PCR. Les animaux entiers sont fixés dans une solution

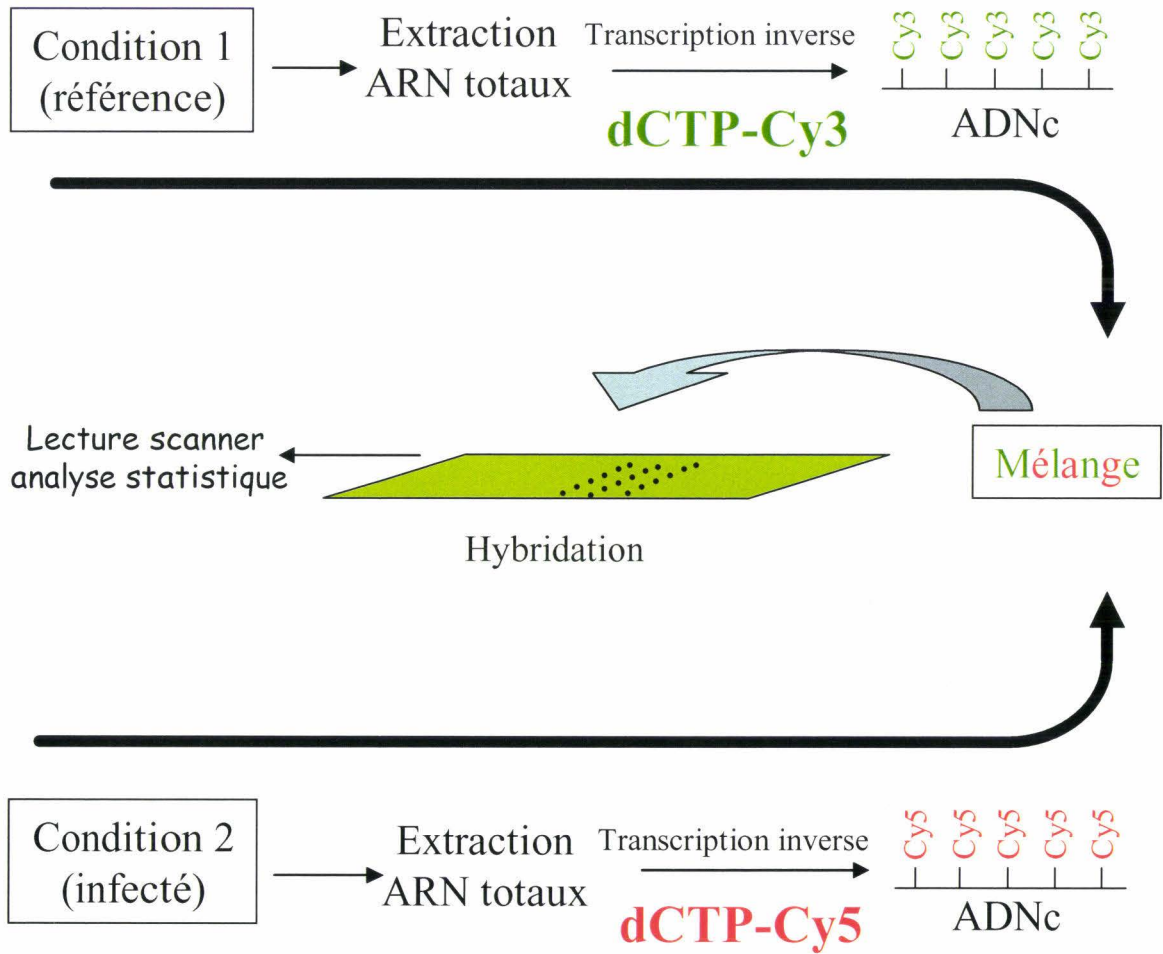


Figure 13: Principe de l'analyse par Biopuces à ADN.

Les ARN totaux des deux lots d'animaux sont utilisés pour générer deux sondes utilisant chacune un dCTP fluorescent. Ces sondes sont mélangées pour l'étape d'hybridation. Les lames sont ensuite lues par scanner confocal et les intensités d'hybridation sont analysées statistiquement.

tamponnée contenant 4% de paraformaldéhyde pH7.4 pendant environ 16h, ils sont ensuite déshydratés puis inclus dans le Paraplaste. Des coupes sériées de 8 µm, réalisées dans le plan frontal, sont alors déposées sur des lames traitées à la Poly-L-lysine puis stockées à 4°C jusqu'à l'hybridation.

8.2- Préparation des sondes

Les ADNc utilisés pour localiser les sites d'expression sont tous deux clonés dans le vecteur pGEM-T Easy. Ces deux ADNc ont respectivement une taille de 600 pb (fragment du gène de la cystatine B) et de 550 pb (fragment du gène de la cathepsine L).

Après avoir établi la carte de restriction de chaque ADNc inséré dans le vecteur, ces derniers sont linéarisés par SacI ou ApaI. La concentration moyenne de chaque ADNc linéarisé est estimée sur gel d'agarose.

Des sondes sens et antisens de chaque gène sont générées par transcription *in vitro* à partir des ADN plasmidiques linéarisés. Le marquage isotopique fait appel à un kit de marquage d'ARN contenant la T7 RNA Polymerase ou SP6 RNA Polymerase (SP6/T7 Transcription kit, Roche) et le radioisotope $\alpha^{35}\text{S}$ -UTP (Amersham). Les transcrits radiomarqués sont ensuite purifiés par précipitation à l'éthanol absolu 12 heures à -20°C suivi d'une centrifugation de 30 minutes à 10 000g à 4°C. La quantité de la sonde est estimée par comptage de la radioactivité. Les 2 ADNc sont orientés de la même façon. La linéarisation du vecteur par Apa I permet une transcription *in vitro* par SP6 et génère une sonde dont la séquence est complémentaire aux messagers recherchés, c'est la sonde antisens dite « spécifique ». La linéarisation des vecteurs par Sac I permet une transcription *in vitro* par T7 et donne naissance à une sonde dont la séquence est identique aux transcrits recherchés, c'est la sonde sens dite « non spécifique ».

La synthèse de sondes marquées à la digoxigénine suit le même protocole général que celui des sondes radiomarquées. En revanche, le marquage est réalisé en présence de DIG-11-UTP (SP7/T7 DIG RNA Labeling Kit, Roche).

Les expériences utilisent deux types de contrôle. Un premier contrôle consiste à soumettre les coupes à hybrider à une digestion préalable par la RNase A (10 µg.mL⁻¹) pendant 10 minutes à 37°C. Les lames ainsi traitées subissent ensuite le protocole d'hybridation classique. Le deuxième contrôle est basé sur l'utilisation de la sonde sens.

8.3- Hybridation

Le protocole d'hybridation utilisé a été adapté d'après Mitta *et al.* [Mitta *et al.*, 2000].

Les principales étapes sont les suivantes :

Lors de la préhybridation, les coupes sont plongées 10 minutes dans un mélange glycine 0.1M / Tris-HCl 0.2M pH7.4 afin de neutraliser le paraformaldéhyde résiduel du fixateur. Après rinçage dans un tampon Tris-HCl 100mM / EDTA 50mM, elles sont ensuite digérées par la protéinase K (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ final) pendant 15 minutes à 37°C pour permettre une meilleure pénétration de la sonde dans les tissus. Les coupes sont plongées dans un tampon Phosphate (paraformaldéhyde 4% ; MgCl_2 5mM) puis rincées dans du PBS. Après acétylation dans une solution de triéthanolamine 0.1M pH7.8 / anhydride acétique 0.25% 10 minutes à T° ambiante, les coupes sont lavées dans un bain de SSC 2X puis déshydratées dans trois bains successifs d'éthanol 30°, 70° et 96° pendant 5 minutes. Après séchage des lames à T° ambiante, les coupes sont hybridées. Pour cela, chaque sonde marquée est diluée dans un tampon d'hybridation (Formamide 50%, Sulfate de Dextran 10%, solution de Denhardt's 10%, ARNt (*E. coli*) 0.5 mg.mL^{-1} , DTT 100 mM, ADN de sperme de Saumon préalablement dénaturé 0.5 mg.mL^{-1}). Deux millions de cpm par lame ont été utilisés. L'hybridation est réalisée durant une nuit à 55°C dans une chambre d'hybridation saturée en humidité.

Les lames sont alors rincées à deux reprises 15 minutes dans un bain de SSC 2x. Elles sont ensuite traitées par la RNase A (20 mg.mL^{-1}) dans un bain de SSC 2x pendant 10 minutes à 37°C puis rincées dans deux bains successifs de SSC 0.1x, Mercaptoéthanol 0.07% de 10 minutes à 55°C. Elles sont enfin lavées dans un bain rapide de SSC 0.1x à T° ambiante puis immergées brièvement dans un bain d'éthanol 70% pure afin de les sécher définitivement pour l'étape ultérieure.

8.4- Exposition et quantification

Après hybridation, les lames rincées et séchées sont autoradiographiées. Pour cela, elles sont d'abord exposées en cassette hermétique 48 heures avec un film (Biomax, Kodak). Ce dernier est révélé (D19b, Kodak) après quelques jours afin d'évaluer par une première méthode rapide l'existence éventuelle et l'intensité d'un marquage. Les lames sont ensuite autoradiographiées par une émulsion liquide (LM1, Amersham) puis séchées et exposées pour une période de 28 jours. L'autoradiogramme situé sur les lames est ensuite révélé

(D19b, Kodak) et fixé dans le thiosulfate de sodium 30% pendant 10 minutes à T° ambiante. Le marquage se manifeste sous la forme de grains d'argent.

La quantification du radiomarquage est effectuée au moyen d'un microscope Axiophot (Zeiss) et du système de quantification Biocom. Ce système permet d'évaluer le nombre des grains d'argent qui marquent une structure. Cette étude est réalisée sur environ 120 cellules par lot expérimental (30 cellules par animal, quatre animaux par groupe). Les valeurs sont ensuite regroupées pour obtenir la médiane de chaque lot ainsi que l'écart-type.

8.5- Double hybridation *in situ*

Le protocole de double hybridation diffère peu du protocole de simple hybridation. Les deux sondes, l'une radiomarquée, l'autre marquée par la Digoxigénine, ont été mélangées. Le marquage non radioactif est révélé en premier selon le protocole décrit par Mitta *et al.* puis les lames présentant un signal satisfaisant sont trempées dans une émulsion photographique liquide afin de mettre en évidence le signal d'hybridation radioactif (« dipping »). Après exposition, les lames sont développées et fixées comme décrit précédemment [Mitta *et al.*, 2000].

L'ensemble de l'analyse transcriptomique de *T. tessulatum* est représenté sur la figure 14 de la page 73.

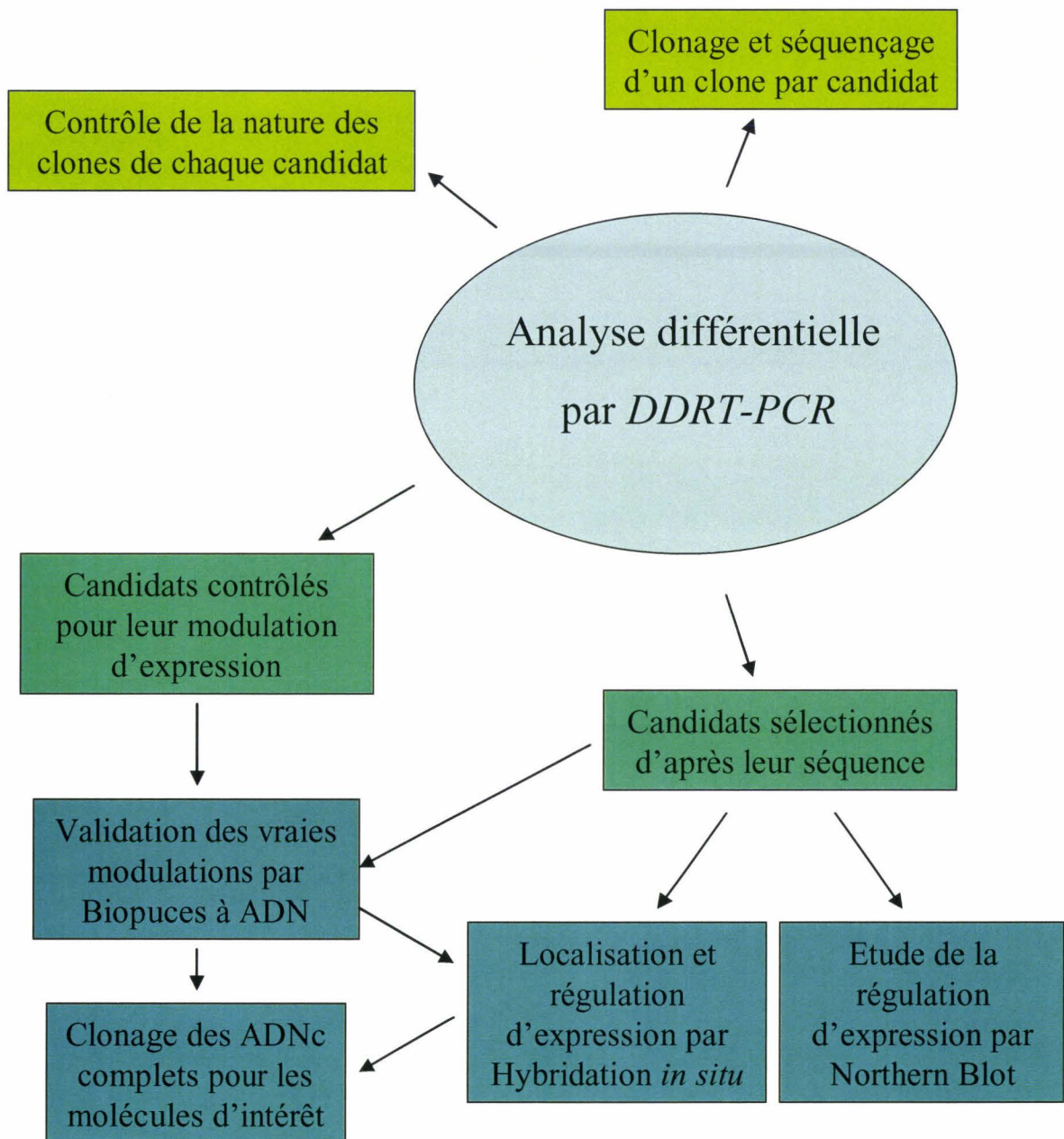


Figure 14: Différentes étapes de l'analyse transcriptomique de *T. tessulatum*.

Après avoir dressé une liste complète des candidats probables, l'analyse différentielle est fondée sur deux critères de sélection des candidats. Le premier repose sur leur modulation d'expression génique à vérifier par Biopuces à ADN. Le second s'intéresse d'abord à l'identité des candidats (molécule ayant par exemple un rôle immunitaire déjà connu) puis à leur modulation potentielle.

Résultats

L'immunité innée, présente chez les Mammifères, se compose d'une mosaïque de stratégies de défense, toutes inspirées de la diversité de mécanismes rencontrés chez les invertébrés. Ces derniers présentent des réponses adaptées à leur milieu propre. Même s'il existe des homologues de fonction sur lesquelles sont définies des familles de molécules, les homologues de séquences primaires ou de structures sont parfois très faibles entre les embranchements. La diversité de familles de peptides antimicrobiens entre dans cette définition. En effet, à travers certains modèles bien étudiés tels que la Drosophile, la Limule ou la Moule, plusieurs molécules sont limitées à quelques espèces. Tel est le cas par exemple pour les Tachyplésines chez la Limule ou la Drosomycine chez la Drosophile [Zasloff, 2002].

Une meilleure compréhension des modes de défense chez les Mammifères repose par conséquent en grande partie sur l'étude du plus grand nombre possible de modèles invertébrés [Hoffmann & Reichhart, 2002]. Peu d'études ont été réalisées, à ce jour, à un niveau moléculaire chez les Annélides, en comparaison de ce qui a été réalisé chez les Arthropodes, voire même chez les Mollusques. C'est pourquoi, nous avons entrepris la recherche des molécules impliquées dans la réponse immunitaire chez notre modèle.

Nous avons basé cette recherche sur une analyse différentielle entre animaux contrôles et animaux immunostimulés. Cette étude a été réalisée à différents niveaux de la modulation de l'expression génique. Nous nous sommes d'abord attachés à identifier les peptides libérés dans le liquide coelomique en réponse à l'infection expérimentale. Puis nous avons entrepris une analyse transcriptomique différentielle dans les mêmes conditions expérimentales.

I- L'analyse des peptides du liquide coelomique

Cette analyse réalisée dans un premier temps repose sur l'étude du contenu peptidique du liquide coelomique d'animaux témoins comparés à des animaux infectés. Le liquide coelomique est prélevé après que les animaux aient reçu une injection de liquide physiologique (contrôles) ou de Lipopolysaccharides (LPS) pour les animaux infectés. Les sangsues contrôles sont sacrifiées 30 minutes après l'injection et celles qui sont infectées forment deux groupes distincts : un premier sacrifié 30 minutes après l'injection et un second une heure après l'injection. Pour des raisons de disponibilité d'animaux au sein de l'élevage, il n'a pas été possible de réaliser un lot contrôle sacrifié après une heure.

Selon les protocoles de prépurification et de purification décrits dans le chapitre précédent, le contenu peptidique de chaque lot est analysé en chromatographie liquide

(CLHP). Cette analyse est divisée en deux comparaisons puisque les fractions principales étudiées sont les prépurifications 10-50% d'acétonitrile (ACN) et 50-80% d'ACN.

1- La fraction de prépurification 10-50% d'acétonitrile (ACN)

L'analyse de ces fractions sur colonne de phase inverse a révélé plusieurs modulations. En effet, la superposition des profils chromatographiques des différents lots a permis de mettre en évidence plusieurs pics dont la surface varie de façon significative après une injection de 10 µl de LPS (10 µM). Cette comparaison représentée sur la figure 15 page 76 s'est appuyée sur le système d'analyse Gold nouveau (Beckman Coulter). Celui-ci autorise les ajustements des chromatogrammes entre eux (ligne de base, délai d'éluion de l'échantillon en début de gradient d'ACN). Nous constatons la présence de 4 pics différentiels majeurs (A, B, C et D) dont les modulations observées dépassent largement un facteur 2, seuil de modulation minimum fixé avant l'analyse. Un agrandissement des pics A, B et C est représenté sur la figure 16 page 77 et permet de mieux observer leur signal différentiel entre les lots expérimentaux. Notons que ces pics présentent une augmentation de leur surface dans les deux lots d'animaux traités par les LPS par rapport au lot contrôle, excepté le pic C qui baisse de façon très significative après l'injection de LPS.

Après avoir déterminé les fractions d'intérêt, les pics différentiels A, B, C et D ont été purifiés par un deuxième passage sur colonne de phase inverse plus résolutive (250 x 2.1 mm) puis contrôlés par électrophorèse capillaire. Le produit pur a été déposé sur séquenceur automatique (LF 3000, Beckman Coulter) avec l'aimable collaboration du docteur P.E. Sautière.

Malheureusement, les peptides analysés semblent présenter des modifications post-traductionnelles qui requièrent des traitements enzymatiques afin de libérer leur extrémité amino-terminale. Les quantités purifiées n'ont pas permis ces traitements car la totalité de chaque produit était déposée sur le séquenceur. En outre, les membranes utilisées par ce dernier n'autorisent aucun traitement direct et nécessitent une purification ultérieure qui n'est pas réalisable aux vues des quantités insuffisantes disponibles. L'identification de ces peptides d'intérêt est alors impossible.

Toutefois, l'analyse peptidique de cette fraction démontre que le liquide coelomique est le siège de bouleversements moléculaires importants dans le cadre d'une réponse à l'injection de LPS chez la sangsue. L'identification de ces molécules est depuis peu rendue

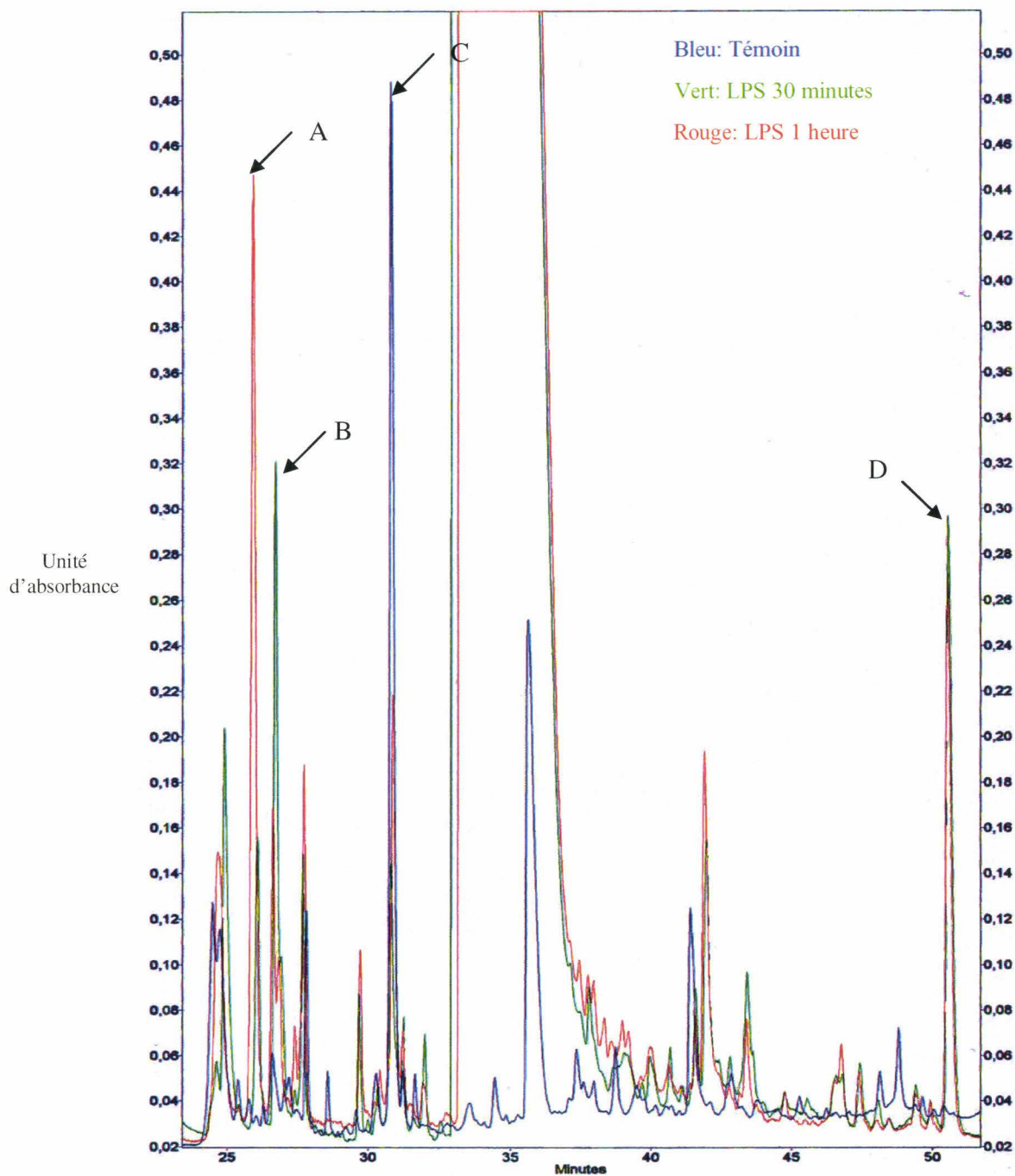


Figure 15: Superposition des chromatogrammes des fractions de prépurification 10-50% d'ACN.

Cette fraction montre plusieurs pics différentiels (A, B, C et D). La région comportant les candidats A, B et C est agrandie sur la figure 16.

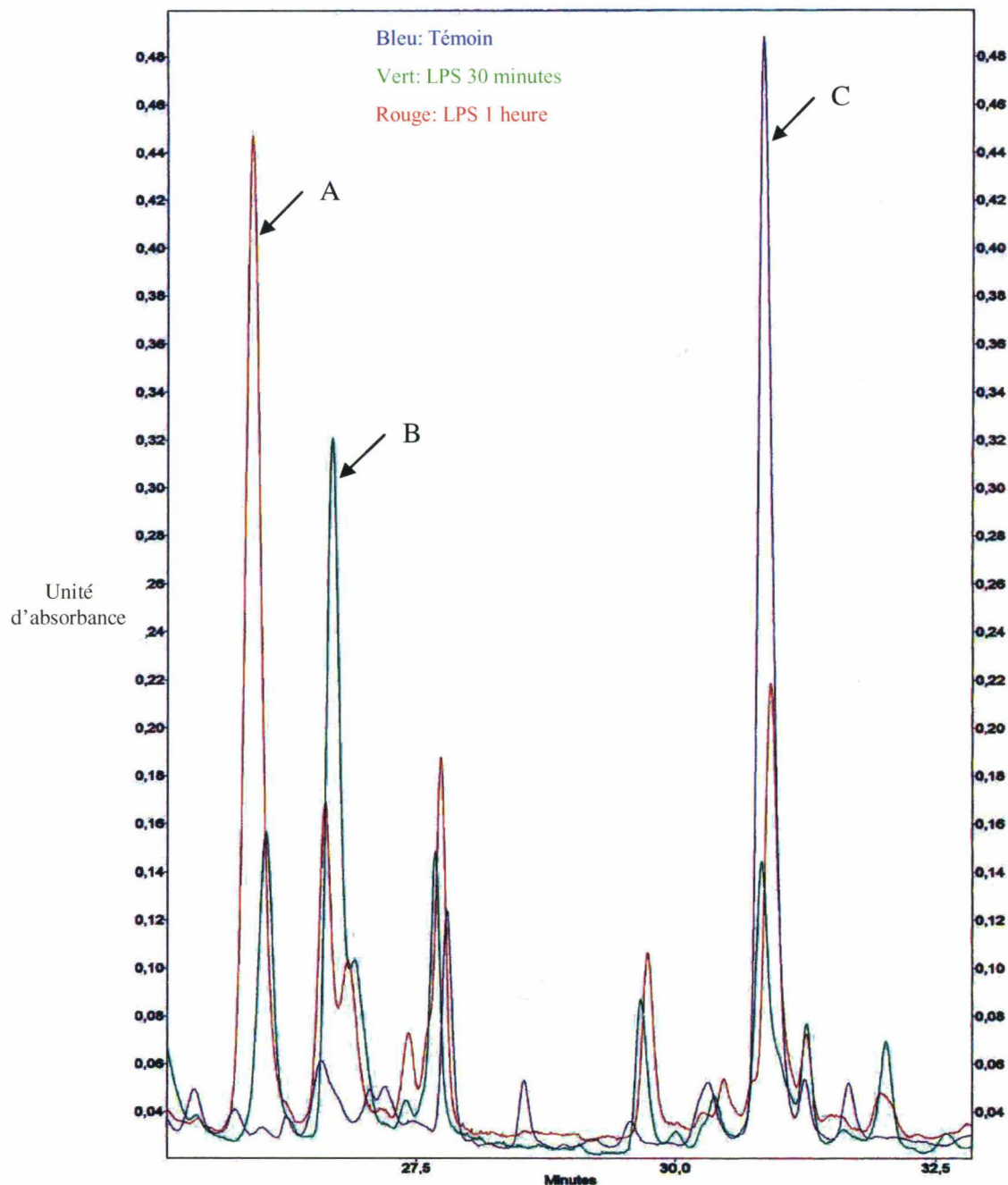


Figure 16: Agrandissement de la superposition des pics A, B et C.

L'agrandissement de cette région des chromatogrammes montre que la surface des pics A, B et C (en plus du pic D sur la figure 15 page 76) sont nettement modulés entre le contrôle et les lots traités par les LPS. Les pics A, B et D semblent correspondre à des molécules dont la concentration augmente dans le liquide coelomique d'animaux immunostimulés. Il est intéressant de constater que le pic C présente une modulation inverse avec une baisse de sa concentration dans le liquide coelomique après le traitement par les LPS.

possible par l'acquisition d'un séquenceur automatique plus sensible (PROCISE 492 cLC N-Ter, Applied Biosystem) et par l'utilisation d'un plus grand nombre d'animaux disponibles dans l'élevage.

2- La fraction de prépurification 50-80% d'acétonitrile

L'étude de cette fraction s'est révélée plus fructueuse. Même si le nombre de pics différentiels semble plus réduit que dans la fraction 10-50% d'ACN, les pics purifiés ici ont pu être séquencés partiellement sans l'intervention de traitements enzymatiques supplémentaires. Les profils chromatographiques ont été superposés par le système Gold nouveau (Beckman Coulter) et ont montré la présence de deux pics (P7 et P9) modulés de façon significative entre le lot contrôle et les deux lots d'animaux immunostimulés (figure 17 page 79). La région délimitée par des accolades correspond à un domaine d'éluion principalement représenté par les hémérythrines. Cette famille de peptides est très abondante dans les animaux de stade 3. Les hémérythrines sont synthétisées au niveau de cellules graisseuses qui bordent la cavité coelomique et sont ensuite stockées massivement dans les ovocytes durant la gamétogenèse [Baert *et al.*, 1992]. Les hémérythrines sont des protéines non-hémiques mais capables de fixer le fer et l'oxygène. Leur incorporation massive dans les ovocytes tend à leur conférer un rôle de détoxification lors du premier repas de sang mais également un rôle de protéines de réserve pour l'embryon, comme les vitellogénines [Baert *et al.*, 1992; Coutte *et al.*, 2001]. Le liquide coelomique d'animaux de stade 3 est très riche en hémérythrines. L'analyse de cette région du chromatogramme est donc assez complexe. Les variations de surface de pics peuvent être le résultat de changements physiologiques mais il est impossible de purifier rigoureusement une molécule possédant un degré d'hydrophobicité proche de ceux des hémérythrines. On ne peut donc pas attribuer les signaux différentiels à des pics distincts. Des étapes supplémentaires de purification à l'aide de gradient d'ACN plus fins aboutiraient certainement à la mise en évidence de peptides différents des hémérythrines dans cette zone. Mais la comparaison entre plusieurs lots expérimentaux ne serait plus possible car la multiplication des passages sur colonne provoque une altération du signal pour chaque échantillon.

Nous nous sommes donc plus intéressés au deux pics différentiels fléchés qui correspondent au pic 7 (P7) et au pic 9 (P9). Ils semblent présenter des modulations plus facilement identifiables.

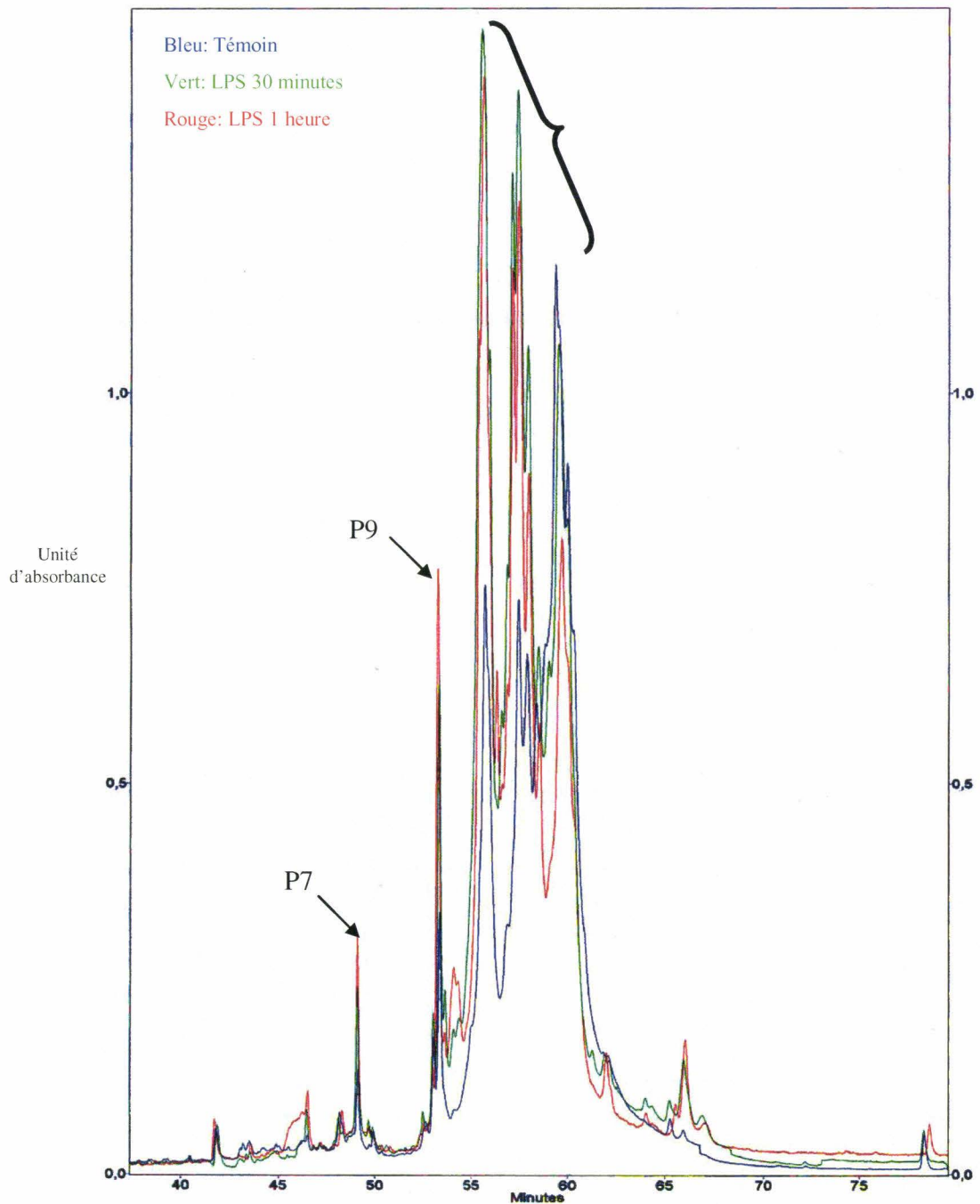


Figure 17: Superposition des chromatogrammes des fractions de prépurification 50-80% d'ACN.

Cette fraction montre deux pics différentiels appelés P7 et P9. La région cernée par une accolade correspond à la région d'éluion des hémérythrines, famille de peptides très concentrés dans le liquide coelomique des animaux de stade 3. La purification difficile de cette région du chromatogramme ne permet pas sa comparaison entre différents lots d'animaux.

La figure 18 page 81 représente un agrandissement de la région d'élution de P7 et P9 montrant que leur modulation est encore une fois très significative puisqu'elle est supérieure à un facteur 2. Cette modulation permet de penser que ces deux peptides ont une concentration dans le liquide coelomique qui est accrue par le traitement aux LPS. Ces deux pics ont été purifiés sur colonne C18 plus résolutive (250 x 2.1 mm) et leur pureté a été vérifiée par électrophorèse capillaire.

2.1- Le peptide du pic P7

La dégradation d'Edman a permis d'obtenir une séquence de 33 acides aminés décrite ci-dessous :



La comparaison de cette séquence aux banques de données BLAST P 2.2.2 [Altschul *et al.*, 1997] ou Bic 2 [T. F. Smith & Waterman, 1981] (Annexe 2 page 183) n'a révélé aucun alignement significatif. En revanche, l'analyse en spectrométrie de masse, réalisée avec l'aimable collaboration du Professeur J. Lemoine au centre commun de spectrométrie de masse de l'USTL, a montré que ce peptide possède une taille de 12558 Da.

A la suite de ces résultats nous avons entrepris le clonage de l'ADNc complet codant ce peptide par une approche en RT-PCR avec des oligonucléotides dégénérés (tableau 3 page 53). Ces amorces ainsi que l'approche sont représentées sur la figure 19 page 82. Huit combinaisons d'amorces ont été réalisées dans les amplifications. Chaque amorce P7 Fw a été utilisée avec chaque amorce P7 Rv. La combinaison P7 Fw-1 / P7 Rv-4 a produit une amplification de 81 paires de base. Ce produit nous a alors permis de lever certaines incertitudes quant à la séquence biochimique obtenue et a servi de base au clonage plus complet de l'ADNc.

Malheureusement, la technique de RACE-PCR qui s'appuie sur les oligonucléotides détaillés dans le tableau 3 (P7Fw1, P7Fw2 et dT adapter) n'a pas permis sur la base de ces amorces d'obtenir les fragments correspondants aux extrémités 5' et 3' et ce malgré des expériences répétées au moins trois fois. Cette caractérisation moléculaire serait peut-être plus aisée avec l'utilisation d'autres amorces. Cela fera certainement l'objet de travaux ultérieurs afin de pouvoir obtenir de plus amples informations sur sa séquence.

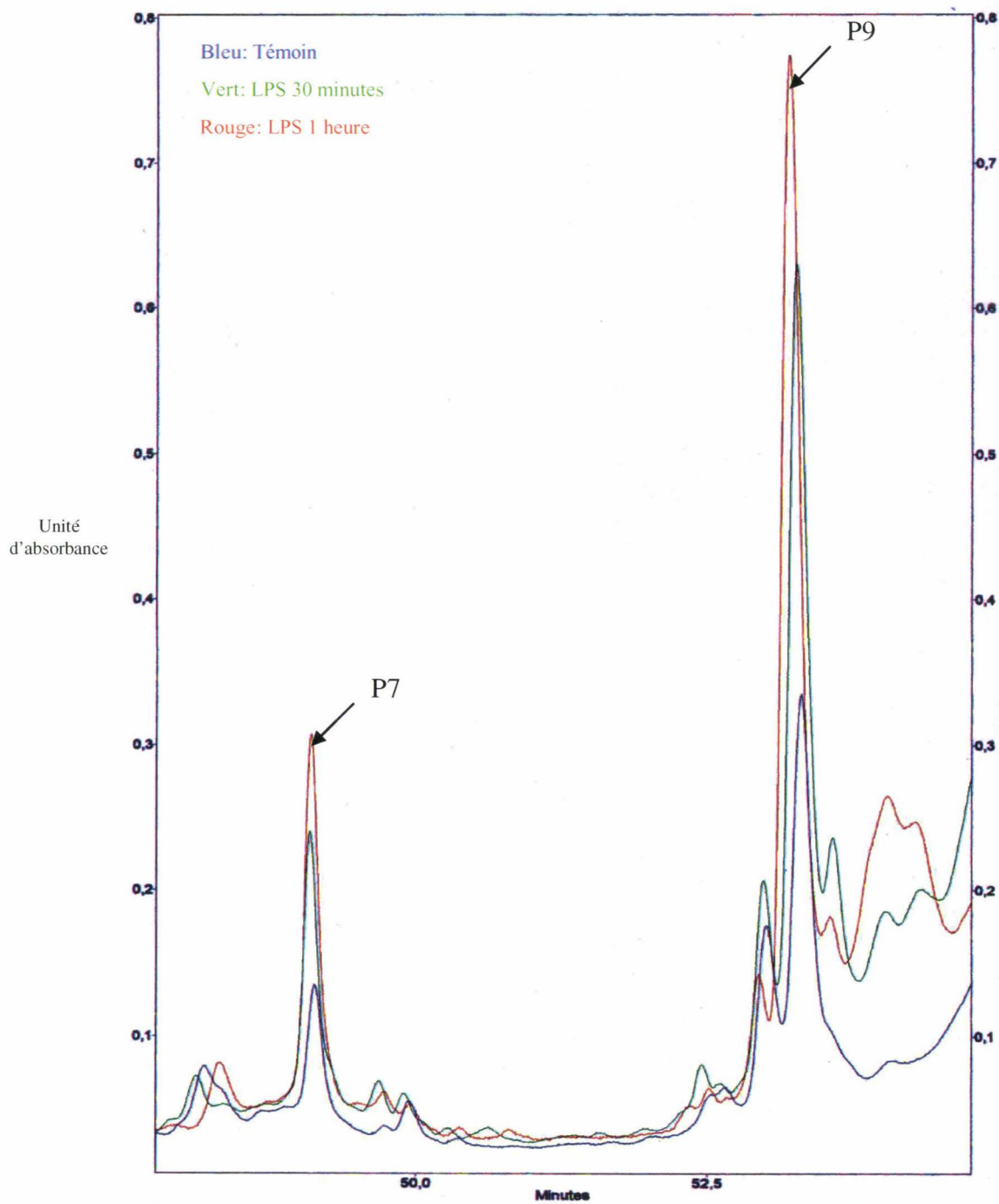


Figure 18: Agrandissement de la superposition des pics P7 et P9.

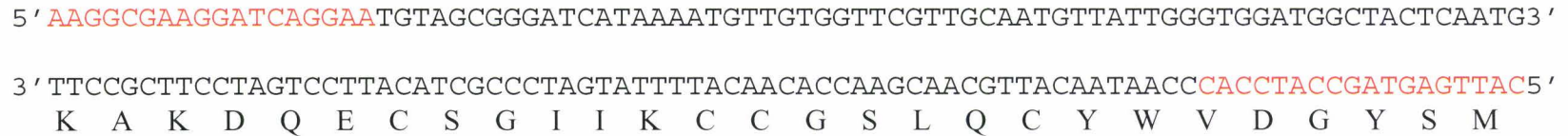
Cet agrandissement présente les deux pics différentiels auxquels nous nous sommes intéressés dans la fraction de prépurification 50-80% d'ACN. Leur modulation semble indiquer que leur concentration dans le liquide coelomique de *T. tessulatum* est influencée par l'infection expérimentale.

Clonage d'un fragment interne de 81 pb par approche dégénérée.



82

Après PCR :



Après clonage partiel:



Figure 19: Approche générale du clonage partiel de l'ADNc codant le peptide P7.

Le clonage moléculaire n'a pas permis de compléter la séquence nucléotidique mais a permis de lever les incertitudes de la séquence en acides aminés.

Malgré le clonage partiel de l'ADNc correspondant à ce peptide nommé P7, il n'a pas été possible de l'identifier. Néanmoins, il présente des différences de concentration dans le liquide coelomique d'animaux infectés par rapport à celui d'animaux contrôles. Ce peptide peut par conséquent jouer un rôle dans la réponse immunitaire de *T. tessulatum* mais les résultats actuels ne permettent pas de le démontrer. Il semble intéressant d'approfondir son étude, d'autant plus que ce peptide ne possède aucun homologue connu chez d'autres espèces.

2.2- Le peptide du pic P9

Après purification, le séquençage de ce peptide a permis d'obtenir un fragment de 35 acides aminés.

1

35

Ter NH₂-DHHEDHGSDDEHEELTLEKIKEXIKDYADKYPVD...

Ce peptide a été analysé en spectrométrie de masse MALDI-TOF et possède une masse de 9970 Da.

Sa comparaison aux banques de séquences primaires BLAST P 2.2.2 [Altschul *et al.*, 1997] ou Bic 2 [Smith & Waterman, 1981] (Annexe 2 page 183) n'a pas permis un alignement significatif avec une molécule déjà connue. Afin de compléter les données sur sa séquence, un clonage partiel par PCR basé sur l'utilisation d'amorces dégénérées a été réalisé à partir de la même approche que celle utilisée pour le peptide P7.

L'emploi de quatre combinaisons d'oligonucléotides dégénérés (figure 20 page 84) a permis d'amplifier par PCR un fragment de 93 pb et cela grâce à la combinaison d'amorces P9 Fw-1/P9 Rv-1 (tableau 3 page 53). Ce clonage partiel a permis de lever les incertitudes liées au séquençage biochimique. Sur la base de la séquence nucléotidique interne obtenue, des oligonucléotides homologues ont été dessinés afin d'amplifier l'extrémité 3' de l'ADNc par 3'RACE-PCR. Les amorces utilisées dans cette approche sont représentées sur la figure 20 page 84.

La séquence complète du transcrite codant le peptide P9 obtenue à la suite de cette approche est montrée sur la figure 21 page 85. D'après l'analyse de la séquence déduite en acides aminés dans le programme SignalP V1.1 [Nielsen *et al.*, 1997] (Annexe 2 page 183), le peptide P9 possède un peptide signal (figure 21 page 85) qui lui permettrait d'être libéré sous forme soluble dans le liquide coelomique. En revanche, aucune homologie avec une molécule ou famille de molécule connues n'a été trouvée pour cette séquence de 107 acides aminés.

A- Clonage d'un fragment de 93 pb par approche dégénérée

1

35

D H H E D H G S D D H E H E E L T L E K I K E X I K D Y A D K Y P V D

Séquence
nucléotidique
déduite

GAYCAYCAYGARGAYCAYGGNWSNGAYGAYCAYGARCAYGARGARCTNACNCTNGARAARATHAARGARNNNATHAARGAYTAYGCNGAYAARTAYCCNGTNGAY

P9 Fw-1 5' GAYCAYCAYGARGATCAT 3'

3' TTTCTAATRCGNCTRTTY 5' P9 Rv-1

P9 Fw-2 5' GAYCAYCAYGARGATCAC 3'

3' TTCCTAATRCGNCTRTTY 5' P9 Rv-2

Après PCR :

GATCATCACGAGGATCATGGACACGACGACCACGAACACGAAGAATTAACGCTGGAAAAAATCAAGGAAAAAATTAAGACTACGCAGACAAG
D H H E D H G H D D H E H E E L T L E K I K E K I K D Y A D K
CTAGTAGTGCTCCTAGTACCTGTGCTGCTGGTGCTTGTGCTTCTTAATTGCGACCTTTTTTAGTTCCTTTTTTAATTTCTGATGCGTCTGTTC

84

B- Clonage de l'extrémité 3' par 3'RACE-PCR :

GATCATCACGAGGATCATGGACACGACGACCACGAACACGAAGAATTAACGCTGGAAAAAATCAAGGAAAAAATTAAGACTACGCAGACAAG-----

P9Fw1 5' GATCATGGACACGACGACCACGAAC 3' (1^{er} tour de PCR)

P9Fw2 5' CCACGAACACGAAGAATTAACGCTG 3' (2^{eme} tour de PCR)

dT Adapter 3' (T)₁₇CGATCGATGTCGACTCG 5'

CTAGTAGTGCTCCTAGTACCTGTGCTGCTGGTGCTTGTGCTTCTTAATTGCGACCTTTTTTAGTTCCTTTTTTAATTTCTGATGCGTCTGTTC-----

Figure 20 : Approche utilisée pour le clonage partiel de l'ADNc codant le peptide P9.

Les séquences des amorces ayant servi à la 3'RACE-PCR (B) sont colorées en rouge. Cette séquence plus longue n'a pu être alignée de façon significative avec le contenu de banques génomique et protéique. En revanche, elle a permis de concevoir des amorces homologues inverses complémentaires afin de tenter d'amplifier l'extrémité 5' de l'ADNc dans une banque d'ADNc de *T. tessulatum* de stade 2 (figure 21).

Séquence nucléotidique obtenue par 3' RACE-PCR

GATCATCACGAGGATCATGGACACGACGACCACGAACACGAAGAATTAACGCTGGAAAAAATTAAGGCAAAAATTAAGACTACGCCGATAAACTCCAGTCGATCAATTGACTGA
5'Fw vecteur 1 et 5'Fw vecteur 2
ACGTGTCCAGGCTGGACGCGACTACCTTTTGGGCAAAGGAGCCAGACCAGCTCATTGGCCAGCTAGAGTTGACCGCCATCTCAGCAAATTGACTGCTGCCGAGAAACAAGAGTTGG
P9Rv1 TCGATCTCAACTGGCGGTAG TAACTGACGACGGCTCTTTG P9Rv2
CTGATTATTTGCTCACTTTTATTTCATTAGAGAGAAGAGATAAGCTGACCTAGCTTTGTTGCGAATTAATTTTAATTTTATTTCATTTTATTACTGTGATCTAAAGTATTTAAATAGT
TTAAACAAATTTAATGTAAACGTAATAAATTAAGTTGTCTACATAAAAAAAAAAAAAAAAAA
TTTTTTTTTTTTTTTTGCTAGCTACAGCTGAGC Oligo dT adapter

Séquence nucléotidique complète obtenue après PCR dans la banque d'ADNc témoin de *T. tessulatum* (déduite en acides aminés)

85 5' GTCGTTATCTCTCCTCACAGATTTTCAGGTTTTCTAATCCATCATCATGACAGCTAAAATAATTTGGCTCTTTTCCTCGGTATGACCGCTTTCTTGGCAGTCCAGGCCGATCAT
M H A K I I L A L F L G M T A F L A V Q A D H
CACCACGACCATGGACACGACGACCACGAACACGAAGAATTAACGCTGGAAAAATCAAGGAAAAAATTAAGACTACGCCGATAAGACTCCAGTTGATCAATTGACTGAACTGT
H H D H G H D D H E H E E L T L E K I K E K I K D Y A D K T P V D Q L T E R V
CCAGGCTGGACGCGACTACCTTTTGGCAAAGGAGCCAGACCCTCTCACTTGCCAGCTAGAGTTGACCGCCATCTCAGCAAATTGACTGCTGCCGAGAAACAAGAGTTGGCTGATT
Q A G R D Y L L A K E P D P L T C Q L E L D R H L S K L T A A E K Q E L A D
ATTTGCTCACTTTTATTTCATTAGAGAGAAGAGATAAGCTGACCTAGCTTTGTTGCGAATTAATTTTAATTTTATTTCATTTTATTACTGTGATCTAAAGTATTTAAATAGTTTAAAC
Y L L T F I H
AAATTTAATGTAAACGTAATAAATTAAGTTGTCTACATAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3'
Site de polyadénylation (prédit par Genscan, Annexe 2)

Figure 21: ADNc complet codant le peptide P9 obtenu après PCR dans la banque d'ADNc témoin de *T. tessulatum*.

Les motifs ayant servi à synthétiser les amorces oligonucléotidiques pour le clonage de l'extrémité 5' sont colorés en bleu. L'oligonucléotide P9Rv2 est utilisé pour un premier tour d'amplification contre une amorce oligonucléotidique dessinée dans l'extrémité du site d'insertion du vecteur de la banque entourant l'ADNc inséré (5'Fw vecteur 1). Un second tour de PCR permet d'amplifier de manière plus spécifique l'ADNc recherché et utilise des amorces plus internes P9Rv1 et 5'Fw vecteur 2. Cette approche a abouti à l'amplification de l'extrémité 5' de l'ADNc codant le peptide P9. Elle a d'ailleurs permis de lever une erreur de séquençage biochimique supplémentaire, remplaçant un acide glutamique en histidine en position 4 du peptide mature (surlignée en bleu). Cette séquence a été confirmée par un double séquençage des deux brins d'ADNc. L'obtention de la séquence nucléotidique a permis de déduire la séquence complète du peptide (en vert) ainsi que le peptide signal prédit dans SignalP V 1.1 (souligné).

D'autres expériences menées au sein du laboratoire à l'époque par A. Tasiemski au cours de son travail de thèse et portant sur la recherche de peptides antimicrobiens chez *T. tessulatum* ont révélé l'existence d'une activité antibactérienne pour une fraction peptidique récoltée par chromatographie liquide (CLHP) issue du liquide coelomique d'animaux immunostimulés. Après purification et séquençage biochimique, la molécule portant cette activité s'est avérée identique au peptide P9 et a été rebaptisée Théromyzine.

Nous avons montré dans le cadre des travaux présentés dans ce manuscrit que la Théromyzine est libérée de manière accrue dans le liquide coelomique. Des travaux d'hybridation *in situ* menés par le Dr. A. Tasiemski et le Pr. F. Vandebulcke ont montré que l'expression du gène de la théromyzine se concentre dans un type cellulaire qui tapisse la cavité coelomique. Ce type de cellules qui possède de gros granules lipidiques exprime également spécifiquement le gène codant la Théromacine, un autre peptide antibactérien actif contre les bactéries Gram+ [Tasiemski *et al.*, 2002]. Les expériences d'hybridation *in situ* et de Northern Blot ont montré que l'expression des gènes de ces deux peptides est induite par une infection expérimentale [Tasiemski *et al.*, 2002]. Nos propres travaux de thèse ont montré également dans l'analyse moléculaire par Biopuces à ADN (page 98) que les deux gènes sont induits lors d'une infection par les bactéries Gram+ et Gram-.

Par conséquent, l'analyse des peptides contenus dans le liquide coelomique après une infection avec des LPS a montré que ce tissu est le siège de nombreuses réponses à cette stimulation. La comparaison des deux lots d'animaux dans la fraction 10-50% d'ACN a révélé la présence de plusieurs molécules différentielles qui n'ont pu, faute de matériel et de sensibilité de séquençage, être identifiées. L'analyse de la deuxième fraction de pré-purification 50-80% d'ACN a permis la purification de deux peptides dont un (le P9 ou théromyzine) possède une activité antibactérienne. Ce dernier portant une activité primordiale dans la réponse immunitaire de la sangsue ne peut que nous encourager à poursuivre les études fonctionnelles du peptide P7 et à identifier les candidats différentiels de la fraction 10-50% d'ACN.

En outre, les données concernant les expressions localisées des deux peptides antibactériens dans ce type cellulaire laissent penser à une spécialisation des cellules graisseuses dans la production de peptides à activité antibactérienne. En revanche, nous ne possédons aucune information : (i) sur les mécanismes de reconnaissance qui mènent à l'activation de ces cellules et (ii) sur les mécanismes intracellulaires qui aboutissent à la

production de ces peptides ou à la synthèse d'autres effecteurs de la réponse immunitaire chez la sangsue.

Afin d'identifier des molécules dont l'expression serait modulée à un niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel au cours de la réponse immune chez *T. tessulatum*, des analyses comparatives des ARNm de sangsue ont été entreprises par une approche de *Differential Display RT-PCR*.

II- Analyse transcriptomique par DDRT-PCR

Au cours de cette approche nous avons employé la technique de *Differential Display RT-PCR* (DDRT-PCR) qui fut mise au point initialement sur la lignée cellulaire humaine Hela par Liang et Pardee [Liang & Pardee, 1992]. Depuis leurs travaux, plusieurs variantes de la technique ont été décrites par différents auteurs, notamment des approches différentielles ciblées sur des familles de gènes [Dominguez *et al.*, 1998; Lopez-Nieto & Nigam, 1996]. Lopez-Nieto et collaborateurs ont récemment développé une approche différentielle *in silico* basée sur l'emploi de sets d'oligonucléotides aléatoires permettant d'amplifier préférentiellement les récepteurs à 7 domaines transmembranaires (7TM) [Lopez-Nieto & Nigam, 1996]. Dans la même étude, ils ont démontré que ces sets d'oligonucléotides mis au point initialement pour les récepteurs 7TM humains permettaient toujours *in silico* d'amplifier dans 60% des cas des récepteurs 7TM de drosophile [Lopez-Nieto & Nigam, 1996]. En connaissance de ces résultats et en collaboration avec le Dr. C. Breton, dont la thématique au sein du laboratoire est la caractérisation de récepteurs 7TM chez *T. tessulatum*, nous avons entrepris parallèlement à notre approche par DDRT-PCR classique une approche différentielle ciblée entre animaux témoins et stimulés, cela en utilisant les sets d'oligonucléotides mis au point par Lopez-Nieto *et al.* Deux raisons nous ont essentiellement incité à entreprendre cette approche différentielle ciblée sur cette famille: (i) la superfamille des récepteurs 7TM est l'une des plus conservées dans le règne animal, et ses membres sont impliqués dans toutes les grandes fonctions physiologiques, (ii) plusieurs exemples de modulation d'expression de récepteurs 7TM ont été rapportés dans un contexte immunitaire [Brezillon *et al.*, 2001; Caulfield *et al.*, 2002; Y. Li *et al.*, 2000].

1- L'approche par DDRT-PCR classique

Cette analyse représente une grande part des travaux et a requis la majeure partie du doctorat. Ce temps fut consacré à la mise au point de la technique sur notre modèle animal et à l'utilisation de 72 combinaisons d'amorces sur les 240 possibles mises au point par Liang et Pardee [Liang & Pardee, 1992].

1.1- Sélection des bandes différentielles

Les critères de définition d'un signal différentiel que nous avons utilisés dans notre approche ont abouti à l'excision de 74 bandes (Matériels et Méthodes page 49). Quelques exemples de profils électrophorétiques obtenus sont présentés sur la figure 22 page 89.

Le nombre de bandes différentielles présentes sur les autoradiogrammes est en fait beaucoup plus important. D'une part, certaines combinaisons d'amorces ont généré des profils d'amplification inexploitable même après plusieurs reprises. Cela peut provenir de la qualité des amorces utilisées ou de la nature même de leur séquence ou encore d'un artefact expérimental. Les profils ne présentant pas de réplicats majoritairement similaires n'ont donc pas été pris en compte. Ces combinaisons d'amorces inexploitées sont représentées en hachures grises sur le tableau 6 pages 90 et 91. D'autre part, sur les profils exploités, de nombreuses bandes différentielles sont présentes sous la taille minimale fixée arbitrairement à 300 pb (Matériels et Méthodes page 49). Ces bandes ne sont pas prises en compte dans l'étude. Ces deux paramètres limitent donc volontairement le nombre de produits sélectionnés. Ce seuil de sécurité fixé pour l'analyse doit être considéré dans toute statistique visant à évaluer l'efficacité de l'approche. En effet, il apparaîtrait peu objectif de comptabiliser uniquement 74 signaux différentiels pour 72 combinaisons d'amorces testées.

Une très grande majorité des bandes différentielles a été réamplifiée puis clonée générant ainsi environ 310 clones. Toutefois, 12 produits d'élution sur les 74 n'ont pu être réamplifiés. Il s'agit dans chaque cas de produits de taille supérieure à 700 paires de base. Deux exemples indiqués par des flèches bleues sont représentés sur la figure 22 page 89. La taille plus importante de l'ADN représente une limite dans la technique puisque les grands produits sont plus difficiles à éluer de la bande d'acrylamide. Malgré un protocole d'élution réadapté ainsi qu'un volume de produit d'élution plus important dans la réamplification, nous n'avons pas pu cloner ces produits différentiels. Soixante deux produits sur la totalité sont

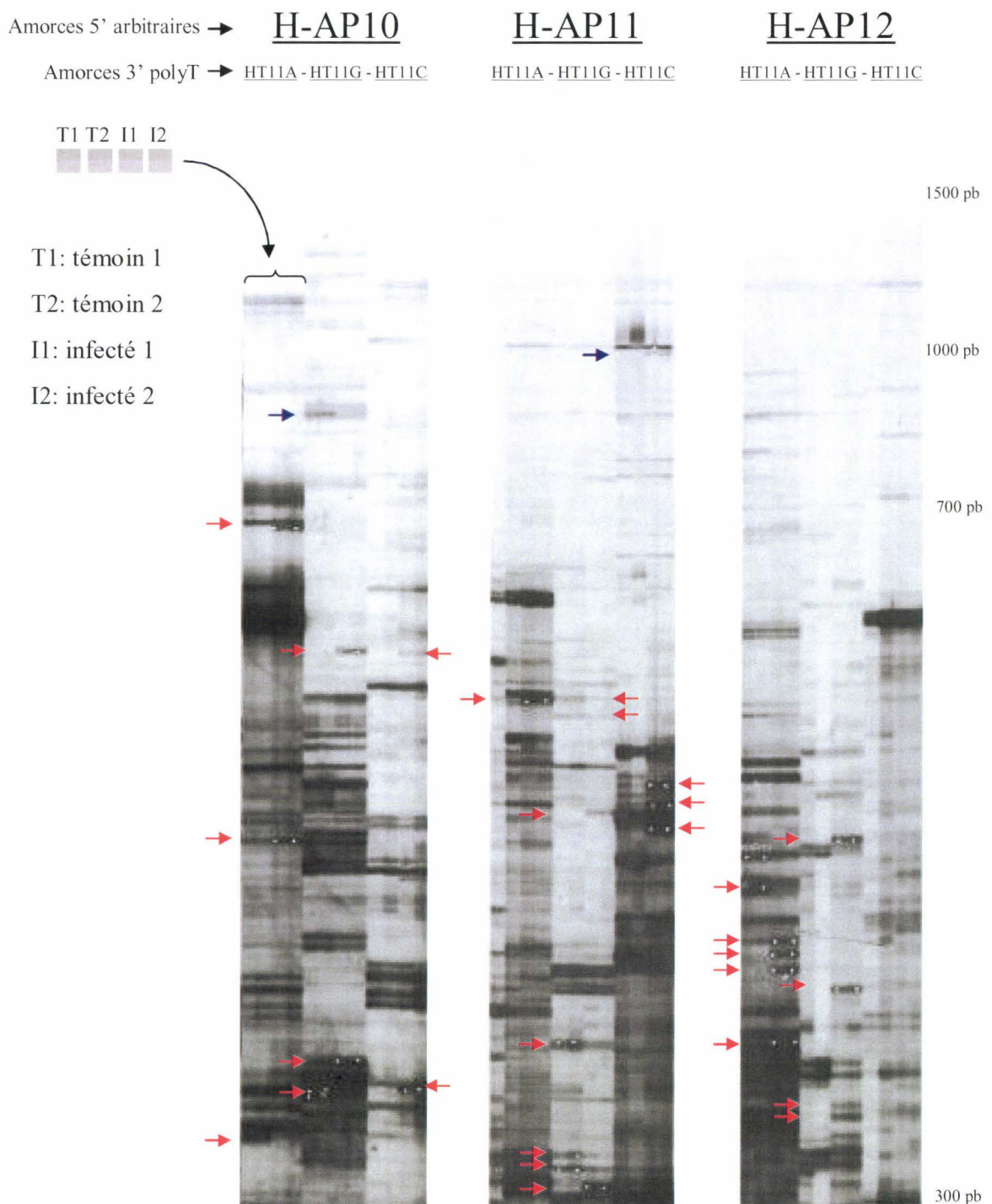


Figure 22: Exemples de profils électrophorétiques obtenus par DDRT-PCR.

Les flèches rouges indiquent l'emplacement de quelques bandes différentielles par comparaison des répliquats témoins (contrôles) avec les répliquats des animaux infectés. Les flèches bleues concernent des produits de grande taille qui n'ont pu être réamplifiés.

Tableau 6: Liste des candidats de DDRT-PCR.

Amorce arbitraire	Numéro du candidat (amorces HT11 utilisée)	Identification du candidat ou observation (valeur de E ; espèce alignée en premier)	Sens de la modulation
H-AP1			
H-AP2			
H-AP3	56.1 (HT11G)	inconnu	+
	57.1 (HT11G)	PEPTIDYL-PROLYL CIS-TRANS ISOMERASE (0.041; rat)	+
	58.1 (HT11G)	ACIDE LIPOIQUE SYNTHETASE (5e-19; saccharomyces)	-
H-AP4	59.1 (HT11A)	inconnu	-
	60.1 (HT11C)	inconnu	+
	61.1 (HT11C)	inconnu	+
	62.1 (HT11C)	inconnu	+
H-AP5			
H-AP6	63.1 (HT11C)	inconnu	-
H-AP7	64.1 (HT11A)	inconnu	+
	65.1 (HT11A)	inconnu	+
	66.1 (HT11A)	CULLINE-3 (1e-32; souris)	-
H-AP8			
H-AP9	4.5 (HT11G)	PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE-BINDING PROTEIN (8e-28; bovin)	+
	10.2 (HT11C)	inconnu	-
H-AP10	1 (HT11C)	pas de réamplification	+
	2.1 (HT11A)	ACTINE 2 (2e-38; huître creuse)	+
	3.4 (HT11G)	CYSTATINE B (4e-18; homme)	+
	5.2 (HT11G)	inconnu	+
	6.3 (HT11C)	inconnu	+
	7.1 (HT11G)	inconnu	-
	8.3 (HT11G)	inconnu	-
	9.2 (HT11A)	PROTEINE RIBOSOMALE 40S S18 (1e-52; homme)	+
H-AP11	11.1 (HT11A)	PROTEINE RIBOSOMALE 40S S4 (3e-10; hamster)	+
	12.1 (HT11G)	aucune séquence obtenue	-
	13.2 (HT11G)	PROTEINE RIBOSOMALE 40S S4 (2e-13; drosophile)	+
	14.1 (HT11G)	FRUCTOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE 1 (4e-34; C. elegans)	-
	15.1 (HT11G)	inconnu	-
	15.1 (HT11G)	inconnu	-
	16.4 (HT11G)	inconnu	+
	17 (HT11C)	pas de réamplification	+
	18.2 (HT11C)	PROTEINE RIBOSOMALE 40S S4 (7e-31; hamster)	+
	19.1 (HT11C)	PROTEINE RIBOSOMALE 40S S4 (4e-22; drosophile)	+
20.5 (HT11C)	POLYADENYLATE-BINDING PROTEIN 1(6e-13; homme)	+	
H-AP12	21 (HT11A)	pas de réamplification	-
	22.1 (HT11A)	aucune séquence obtenue	-
	23.1 (HT11A)	inconnu	-
	24.1 (HT11A)	inconnu	+
	25.1 (HT11A)	inconnu	+
	26.1 (HT11A)	inconnu	+
	27.1 (HT11A)	inconnu	+
	28.2 (HT11G)	inconnu	+
	29.1 (HT11G)	inconnu	+

Tableau 6: Liste des candidats de DDRT-PCR (suite).

Amorce arbitraire	Numéro du candidat (amorces HT11 utilisée)	Identification du candidat ou observation (valeur de E ; espèce alignée en premier)	Sens de la modulation
H-AP13	30.4 (HT11A)	inconnu	-
	31.1 (HT11A)	inconnu	-
	32.5 (HT11A)	inconnu	+
	33.1 (HT11A)	inconnu	+
	34 (HT11G)	pas de réamplification	+
	35.1 (HT11G)	PROTEINE RIBOSOMALE 60S L3 (2e-39; homme)	+
	36.1 (HT11G)	PROTEINE RIBOSOMALE 60S L4 (7e-41; drosophile)	+
	37.1 (HT11C)	FACTEUR D'ELONGATION 1-ALPHA 2 (3e-52; souris)	+
	38.2 (HT11C)	MALATE DESHYDROGENASE (3e-28;mésembryanthème)	+
H-AP14	39.4 (HT11G)	PROTEINE RIBOSOMALE 60S L3 (9e-54; drosophile)	-
	40 (HT11C)	pas de réamplification	+
	41 (HT11C)	pas de réamplification	+
	42 (HT11C)	pas de réamplification	+
	43 (HT11C)	pas de réamplification	+
	44 (HT11C)	pas de réamplification	+
	45 (HT11C)	pas de réamplification	+
	46.1 (HT11C)	PROTEINE RIBOSOMALE 60S L3 (7e-62; drosophile)	+
	47 (HT11C)	pas de réamplification	+
48 (HT11C)	pas de réamplification	+	
H-AP15			
H-AP16			
H-AP17	49.1 (HT11G)	inconnu	+
	50.1 (HT11G)	inconnu	-
	51.1 (HT11C)	aucune séquence obtenue	+
H-AP18	52.1 (HT11A)	SOUS UNITE ALPHA PROTEINE COATOMER (4e-14; homme)	+
	53.1 (HT11G)	ALDEHYDE DESHYDROGENASE (3e-14; grindal: ver annélide)	-
	54.1 (HT11G)	inconnu	-
	55.1 (HT11C)	inconnu	+
H-AP19			
H-AP20	67.1 (HT11A)	inconnu	+
	68.1 (HT11A)	inconnu	+
	69.1 (HT11G)	inconnu	-
	70.1 (HT11G)	inconnu	-
	71.1 (HT11G)	inconnu	-
	72.1 (HT11G)	inconnu	+
	73.1 (HT11C)	ALDEHYDE DESHYDROGENASE (1e-37; grindal: ver annélide)	-
	74.1 (HT11C)	inconnu	+
H-AP21			
H-AP22			
H-AP23			
H-AP24			

Modulation + : signal différentiel avec augmentation après infection expérimentale

Modulation - : signal différentiel avec diminution après infection expérimentale

donc clonés. Au moins un clone de chaque candidat réamplifié a pu être séquencé. L'ensemble de ces résultats forme ainsi la première banque d'EST de *T. tessulatum* au sein du laboratoire.

La figure 22 page 89 montre que les candidats possèdent une grande diversité de taille, avec une majorité des bandes entre 400 et 600 paires de base. En revanche, bien que les modulations puissent être observées dans les deux sens (régulation positive ou négative de l'expression génique), la majorité des signaux différentiels correspond à des inductions présumées de l'expression génique par l'infection expérimentale (tableau 6 pages 90 et 91).

1.2- Séquençage des produits clonés

L'information essentielle est l'obtention de la séquence d'un clone bactérien par candidat d'intérêt. L'identification des candidats n'est pas une nécessité à ce stade de l'analyse. Le séquençage représente une étape qui permet de synthétiser un couple d'amorces oligonucléotidiques homologues internes afin de vérifier par PCR que 5 clones bactériens prélevés au hasard contiennent tous la même séquence, celle du candidat différentiellement exprimé. En effet, certains auteurs ont avancé l'existence d'une grande hétérogénéité de produits de même taille après réamplification du matériel excisé du gel [Callard *et al.*, 1994; F. Li *et al.*, 1994]. Différentes techniques de vérification ont été utilisées afin de résoudre ce problème, comme notamment l'utilisation de *Single Strand Conformation Polymorphism* PCR (SSCP-PCR) [Mathieu-Daude *et al.*, 1996]. Nous avons fait le choix d'utiliser une approche par séquençage suivi d'un contrôle par PCR.

Plus de la moitié des candidats clonés, à savoir 36 sur les 62, ont dans un premier temps été contrôlés par cette technique. Cette première série a permis d'évaluer la nécessité de ces contrôles. Ils montrent que 57,1% des candidats présentent 5 clones identiques. 28,6% des candidats présentent 1 clone non amplifié par les amorces homologues du clone séquencé. 11,4% présentent 2 clones non amplifiés et 2,9% présentent 3 clones non amplifiés. Aucun candidat testé n'a présenté 4 clones non amplifiés. Ces résultats montrent qu'une majorité importante des bandes différentielles ne contient qu'un produit (à condition de considérer qu'un nombre de 5 clones testés est significatif). Les différences observées ensuite sont successivement de moins en moins probables. En outre, le séquençage ultérieur des clones bactériens non amplifiés a révélé que la moitié de ces clones ne contient aucun insert ou uniquement les amorces de PCR dans le vecteur et que l'autre moitié contient un produit différent du premier séquencé. Cela restreint encore le nombre de produits différents par

bande puisque certains clones bactériens ne sont que le résultat d'artéfact de clonage. La figure 23 page 94 expose quelques exemples des contrôles effectués. Les clones différents de chaque candidat sont ensuite considérés comme des candidats potentiels car les produits sont distincts et peuvent représenter le véritable message différentiellement exprimé.

1.3- Stratégie d'analyses des candidats.

A la suite de l'analyse des bandes excisées et réamplifiées par l'approche *Séquence/PCR*, nous avons entrepris deux démarches différentes en fonction des résultats de séquence.

Dans un premier cas où la séquence permet d'identifier de façon fiable le candidat, une recherche bibliographique nous a permis de déterminer si cette molécule était déjà connue pour être impliquée dans des mécanismes immunitaires. Ce fut le cas de l'un des premiers candidats analysés qui possédait une forte homologie à la cystatine B humaine, un inhibiteur de cystéines protéases (développé au III page 108). Pour cette catégorie de candidats, nous avons confirmé ou infirmé la modulation d'expression observée en DDRT-PCR par Northern-blot. Cette confirmation par une technique quantitative est nécessaire car l'un des inconvénients majeurs de la DDRT-PCR est de générer un grand nombre de faux positifs [Matz & Lukyanov, 1998]. Notre stratégie de sélection de bandes différentielles au niveau de réactions dupliquées amoindrit ce problème sans toutefois l'éliminer.

Quand le nombre de candidats différentiels augmente, notamment dans le second cas où la recherche d'homologie significative après séquençage est infructueuse, il est nécessaire de disposer d'une technique quantitative autre que le Northern-blot, trop long et trop coûteux en quantité d'ARN. Différentes approches ont été proposées à cette fin depuis ces dernières années, notamment l'emploi de la technique de *Reverse-Northern Blot* [Corton & Gustafsson, 1997; Martin *et al.*, 1998]. Dans nos mains, et ce malgré plusieurs essais, cette technique n'a jamais donné de résultats satisfaisants. C'est pourquoi nous avons eu l'idée de mettre au point la confirmation des candidats différentiels par l'emploi de Biopuces à ADN.

Cette analyse, dans le cadre d'une DDRT-PCR classique, suit un raisonnement qui est repris ensuite dans l'étude des modulations transcriptionnelles par DDRT-PCR ciblée sur les récepteurs à sept domaines transmembranaires.

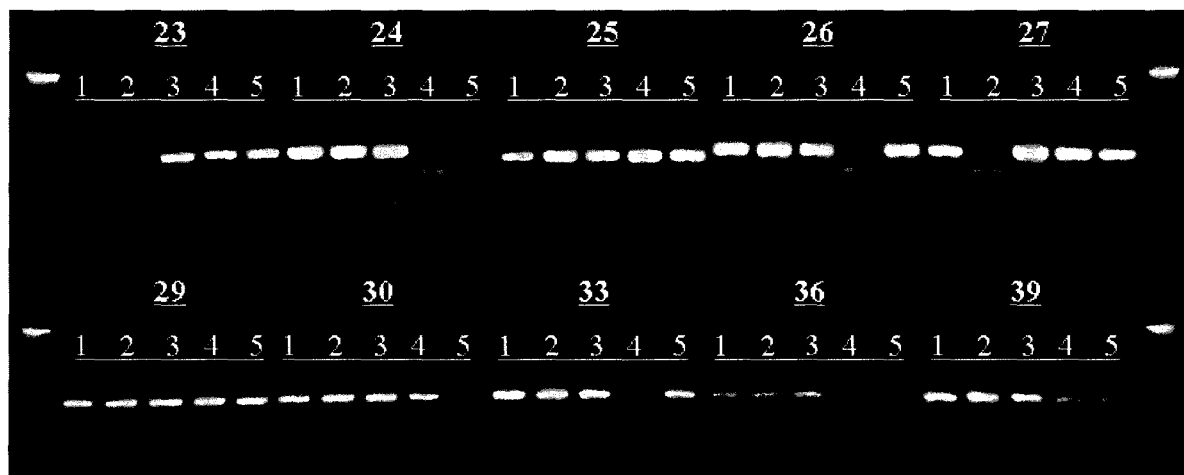


Figure 23: Distinction des clones de chaque candidat différentiel.

Elle repose sur une amplification par PCR utilisant des amorces oligonucléotidiques homologues basées sur la séquence d'un clone de chaque produit. Nous avons représenté ici le cas de 10 candidats. Les signaux obtenus après séparation des produits de PCR sur gel d'agarose 2% avec bromure d'éthidium permettent de répertorier les clones.

Par exemple, les clones des produits 25, 29, 36 et 39 sont tous identiques. En revanche, certaines pistes ne montrant pas d'amplification apportent la preuve que certains clones sont différents du clone séquencé à l'origine. Ces clones différents sont alors incorporés à la suite de l'étude, c'est-à-dire au contrôle par Biopuces à ADN. Il est en effet nécessaire de montrer, si la modulation observée est physiologique, lequel de ces produits exprime le signal différentiel.

2- L'analyse par DDRT-PCR ciblée sur les récepteurs à sept domaines transmembranaires

Cette approche a fait l'objet, elle aussi, d'une mise au point technique essentiellement au niveau des conditions d'hybridation des amorces afin d'augmenter au maximum la spécificité des amplifications sur la famille des récepteurs étudiés.

Les amplifications ont été réalisées à l'aide d'oligonucléotides dessinés par informatique et présumés spécifiques des domaines transmembranaires de récepteurs humains [Lopez-Nieto & Nigam, 1996]. Ces amorces oligonucléotidiques sont utilisées sous forme de sets de 9 oligonucléotides. Neuf sets au total sont utilisés ici et sont détaillés dans le chapitre Matériels et Méthodes à la page 48.

Ces travaux ont abouti à la détection de 17 bandes différentielles dont quelques exemples sont représentés sur la figure 24 page 96. Elles ont, après excision, toutes été réamplifiées. Dans cette analyse, plusieurs produits ont été identifiés et n'ont malheureusement pas abouti au clonage de gènes codant des récepteurs à sept domaines transmembranaires. La spécificité de l'amplification ne semble pas être suffisante malgré une augmentation importante de la température d'hybridation au cours des PCR successives. Le fait d'utiliser des amorces dessinées sur des séquences humaines a peut-être une incidence importante, malgré les résultats que trouve Lopez-Nieto et col. *in silico* chez la Drosophile. Toutefois, si la spécificité ou l'homologie des amorces n'atteignent pas un niveau satisfaisant pour étudier les modulations d'expression génique de cette famille de récepteurs, cette analyse aura permis la découverte de nouvelles bandes différentielles dans le cadre de la réponse à l'infection expérimentale. Ces candidats sont représentés dans le tableau 7 page 97.

Les molécules correspondant à ces signaux différentiels observés sont en partie identifiées. Cela peut s'expliquer par la nature des amorces qui sont ici internes. Les PCR sont issues de l'hybridation de deux amorces arbitraires et non d'une amorce arbitraire et d'une amorce HT11M. Par conséquent, les produits d'amplification ont une probabilité beaucoup plus importante de correspondre à un fragment du cadre de lecture d'un transcrit. Une information codante est alors plus facilement identifiable par rapport aux banques disponibles.

Les candidats différentiels sont parfois redondants ce qui est expliqué par l'emploi de set d'oligonucléotides. Il semble que parmi ces sets, deux oligonucléotides ou plus se sont majoritairement hybridés sur les ADNc.

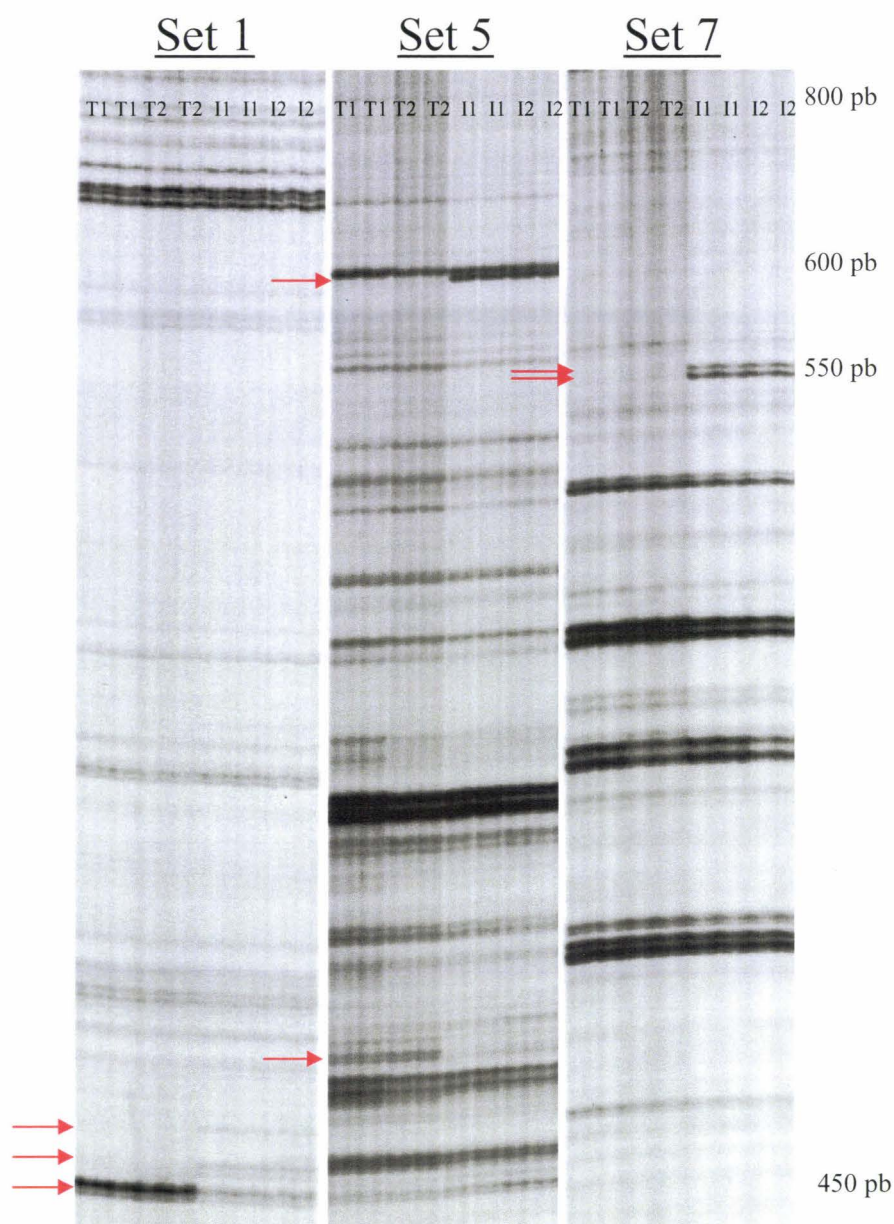


Figure 24: Exemple de profils électrophorétiques obtenus par DDRT-PCR ciblée.

Cette amplification, utilisée avec des amorces oligonucléotidiques internes, génère un nombre plus réduit de bandes différentielles que la DDRT-PCR classique. Quelques exemples de candidats sont indiqués par des flèches. Les dépôts sont doublés, c'est-à-dire que chaque échantillon est chargé deux fois sur le gel afin d'augmenter la quantité disponible de produit dans la bande différentielle. La concentration plus élevée de produit élué favorise la réamplification. Cela est en effet nécessaire lorsque les produits sont de grande taille ou lorsque les amplifications sont rendues difficiles par la compétition des oligonucléotides dans le set utilisé.

Tableau 7: Liste des candidats de DDRT-PCR ciblée.

Set	Numéro du candidat	Identification du candidat ou observation (valeur de E ; espèce qui est alignée en premier)	Sens de la modulation
Set 1			
Set 2	R1.1	EARLY GROWTH RESPONSE PROTEIN 1 (0.087; souris)	+
	R2.1	inconnu	+
	R3.1	EARLY GROWTH RESPONSE PROTEIN 1 (0.087; souris)	-
Set 3			
Set 4	R4.1	THREONINE DESAMINASE (2e-26; salmonelle)	+
Set 5	R5.1	PROTEINE RIBOSOMALE 40S SA (1e-68; ver aubergiste)	+
	R6.1	ALPHA-GALACTOSIDASE A (1e-12; homme)	-
	R7.1	PARAMYOSINE (1e-26; schistosome)	-
Set 6	R8.1	PARAMYOSINE (5e-22; taenia)	+
	R9.1	inconnu	+
	R10.1	RNA HELICASE DEPENDANTE DE L'ATP (2e-21; levure)	+
	R11.1	ACTINE 2 (2e-39; lombric)	+
	R12.1	ALPHA TUBULINE (4e-48; patelle)	+
	R13.1	TROPOMYOSINE 2 (3e-23; planorbe)	-
Set 7	R14.1	THREONINE DESAMINASE (2e-29; E. coli)	+
	R15.1	THREONINE DESAMINASE (4e-24; H. influenzae)	+
Set 8			
Set 9	R16.1	inconnu	+
	R17.1	inconnu	+

Modulation + : signal différentiel avec une augmentation après infection expérimentale

Modulation - : signal différentiel avec une diminution après infection expérimentale

Les candidats obtenus par cette *DDRT-PCR* ciblée ont été incorporés à la construction des lames de Biopuces à ADN. Aucun candidat issu de cette analyse n'a fait l'objet de travaux plus approfondis que la confirmation d'expression différentielle.

3- Contrôle par Biopuces à ADN

Les premières expériences ont porté sur la recherche de conditions optimales pour la synthèse des sondes. Elles ont montré que les hybridations ayant le meilleur rapport signal / bruit de fond sont obtenues par des sondes issues directement des ARN totaux (figure 25 page 99). L'enrichissement des ARNm est donc inutile et la synthèse en est simplifiée. La diminution du nombre d'étapes est par ailleurs un atout dans la reproductibilité des expériences. En outre, la quantité de matériel utilisé au départ est alors mieux maîtrisée et n'est pas sous la contrainte de rendement d'enrichissements variables des ARNm avant chaque synthèse de sonde.

Les expériences suivantes ont consisté à rechercher une quantité satisfaisante d'ARN totaux requise pour les synthèses de sondes. Les résultats obtenus ont montré que les signaux d'hybridation sont identiques pour des sondes générées à partir de 30 µg, 20 µg et 10 µg d'ARN totaux. Afin de s'accorder une marge de sécurité dans ces synthèses, nous avons choisi de réaliser les sondes à partir de 15 µg d'ARN totaux pour chaque lot d'animaux.

Cette analyse basée sur le dépôt sur lame de produits de PCR a permis de constater que la construction de biopuces à façon permet d'obtenir des signaux d'hybridation très homogènes. La fluorescence de la sonde observée est dans la grande majorité des spots très bien répartie sur la surface du dépôt. Cela démontre la stabilité des produits entre autre lors des traitements de la lame, lors de l'hybridation et du rinçage de la sonde. L'homogénéité et la reproductibilité des signaux obtenus apportent la preuve que cette technique de contrôle est la plus pertinente et la plus adaptée à la validation des candidats de *DDRT-PCR* en grand nombre dans de futures études.

Cent huit produits composés des candidats différentiels (*DDRT-PCR* classique et ciblée) et de plusieurs contrôles ont été déposés sur des lames de verre fonctionnalisées par des aldéhydes. Ces produits sont accompagnés des référents internes de l'expérience que sont six séries de quatre ADNc spécifiques de Houblon. Tous les produits sont déposés en triplicat. Les lames contiennent donc 348 spots à analyser.

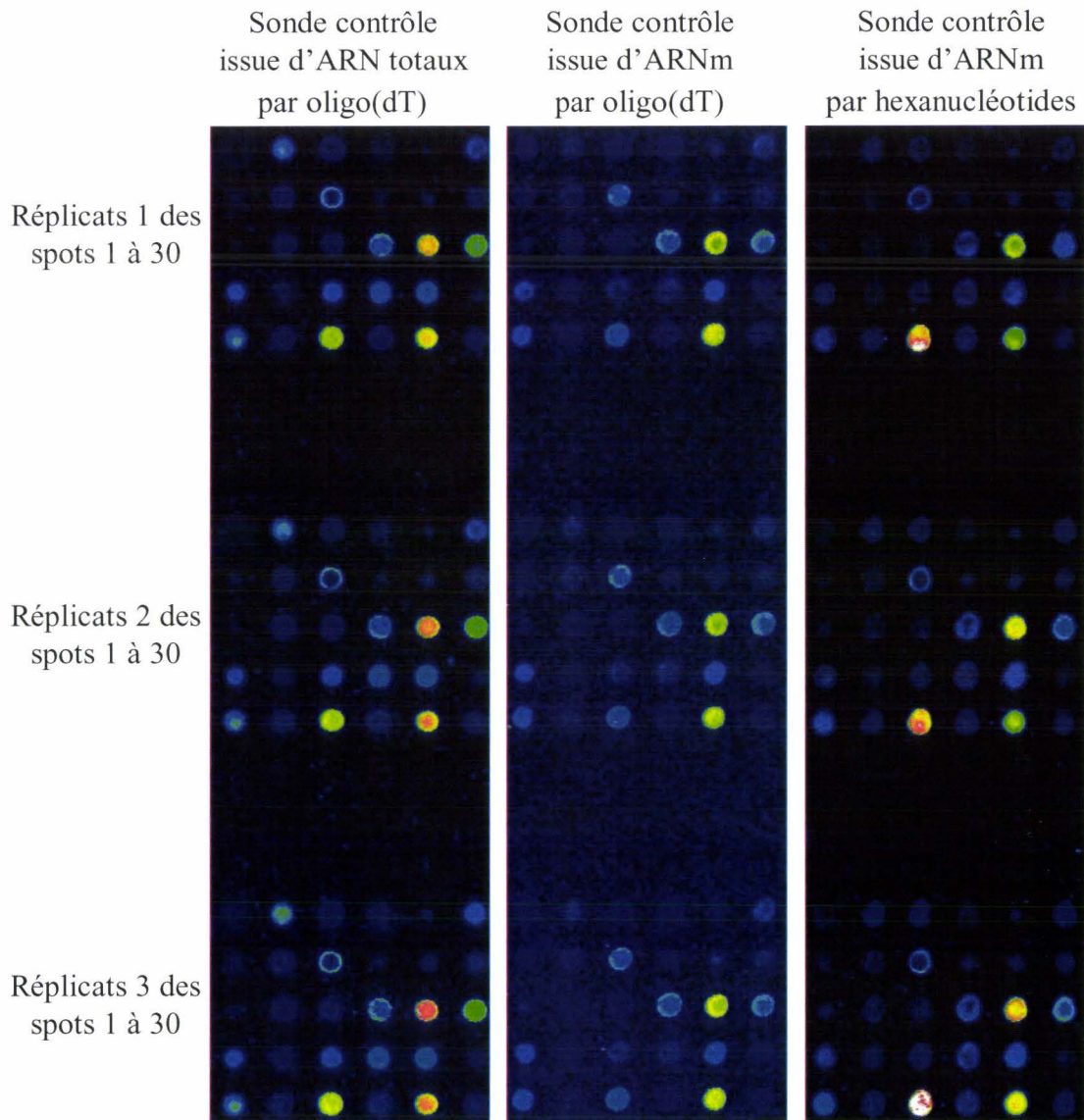


Figure 25: Recherche des meilleures conditions de synthèse pour les sondes de Biopuces à ADN.

Les premières expériences montrent que le meilleur rapport signal / bruit de fond est obtenu lors de synthèse issue directement des ARN totaux, réalisée par oligo (dT). Ce type de synthèse permet en outre d'éviter l'enrichissement en ARNm qui peut parfois présenter des rendements variables, ce qui n'est pas très recommandé lors d'expériences comparatives.

Quelques exemples d'hybridation sont représentés sur la figure 26 page 101. Il est d'ailleurs déjà possible d'observer visuellement des signaux différentiels pour certains produits lorsqu'on compare des hybridations par des sondes de lot contrôle avec des hybridations par des sondes de lot d'animaux infectés. Toutefois, la détermination des modulations n'est heureusement pas effectuée visuellement mais par l'acquisition des intensités de fluorescence émises par chaque sonde sur chaque spot. Les images des lames scannérisées sont traitées par informatique. Les intensités sont matérialisées sous forme de valeurs chiffrées. Pour chaque spot, un ratio est calculé. Il correspond à la valeur de l'intensité du lot infecté sur la valeur de l'intensité du lot contrôle. Ces ratios sont ensuite moyennés pour les trois réplicats de chaque produit. Enfin, les valeurs des six expériences successives sont rassemblées et sont entrées dans un algorithme statistique, CyberT, sur internet (Annexe 2 page 183). Ce dernier détermine les candidats qui présentent un ratio significativement cohérent avec une modulation entre les deux lots d'animaux. Les valeurs entrées sont les ratios issus de valeurs brutes. Le programme informatique convertit ensuite les valeurs sous forme logarithmique afin de déterminer les candidats modulés. Ce calcul statistique s'appuie sur un paramètre très important qui est la correction de Bonferroni. En fixant la valeur « p » de cette correction, nous verrons que le nombre de candidats retenus peut varier sensiblement. La liste des candidats sélectionnés est présentée sur le tableau 8 page 102. Les différents paramètres du calcul sont détaillés dans ce tableau.

L'étude comparative étant basée sur les transcrits de l'animal entier, les informations concernant les gènes induits peuvent être masquées plus ou moins fortement par les autres transcrits majoritaires ne répondant pas à l'infection bactérienne. C'est pourquoi, la valeur de la correction de Bonferroni proposée par l'algorithme a été successivement augmentée de $p=0.1$ à $p=0.2$ puis à $p=0.25$ afin de sélectionner trois séries de candidats.

Parmi les candidats retenus, il faut distinguer ceux provenant de la DDRT-PCR classique et ceux provenant de la DDRT-PCR ciblée.

L'analyse réalisée avec une correction de Bonferroni de $p=0.1$ a sélectionné 7 candidats. Les trois premiers, les plus significatifs, sont issus de la DDRT-PCR ciblée. Ce ne sont pas du tout des gènes codant des récepteurs à sept domaines transmembranaires. Il s'agit en fait du même gène : la Thréonine désaminase. La comparaison des trois séquences a révélé quelques différences peut-être dues à des erreurs générées lors de la PCR ou lors du séquençage. En revanche, les trois produits correspondent au même fragment d'ADNc et ont été amplifiés par des amorces oligonucléotidiques identiques. Le set 4 a amplifié en DDRT-

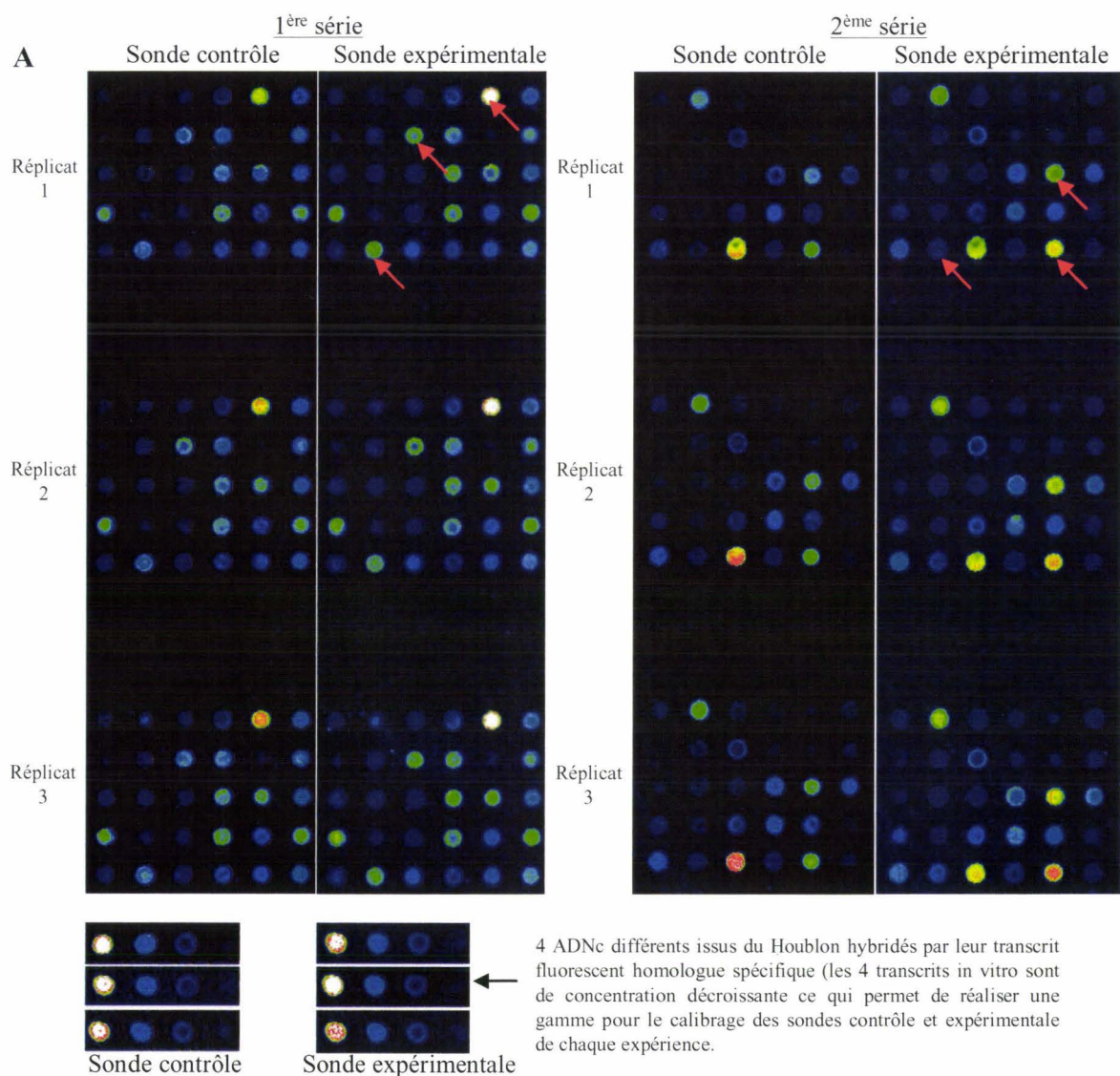
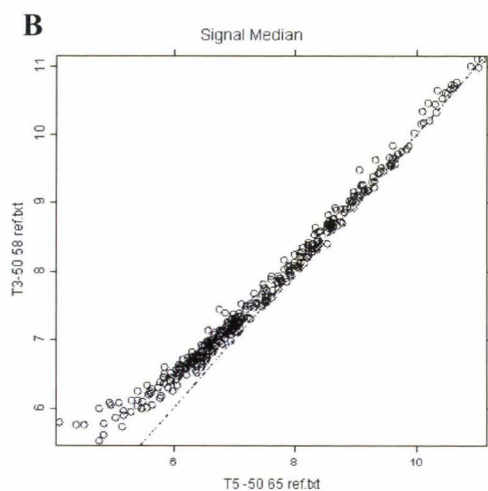


Figure 26: Exemples de résultats obtenus par Biopuces à ADN.



En A sont représentés quelques exemples d'hybridations comparatives sur deux séries de candidats. Avant même la superposition des intensités des deux longueurs d'onde, il est possible de détecter quelques différences indiquées ici par des flèches. Les transcrits *in vitro* de Houblon permettent de calibrer les deux hybridations. En B figure l'ensemble des valeurs relevées pour le contrôle Témoin Cy-3 / Témoin Cy-5. Les valeurs de chaque candidat sont approximativement identiques pour les deux sondes.

Tableau 8: Analyse statistique des candidats contrôlés par Biopuces à ADN.

Candidats	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	N	M	"SD"	"t"	"p"
R4.4	0,8418	0,8437	0,8001	1,244	0,7063	1,1629	6	0,9331	0,2168	10,545	0,0001
R15.1	1,0136	0,7384	0,5888	0,6706	1,1547	1,0819	6	0,8747	0,2377	9,012	0,0003
R14.4	0,7823	0,7079	0,5878	0,8127	0,9136	1,2681	6	0,8454	0,234	8,8511	0,0003
24.1	0,714	0,7913	0,7784	0,4749	0,3548	0,7449	6	0,6431	0,1828	8,6155	0,0003
Théromacine	0,7493	0,7238	0,6091	0,2068	0,6417	0,7561	6	0,6145	0,2084	7,2224	0,0008
Actine	0,357	0,4879	0,6059	0,3803	0,4944	0,8663	6	0,532	0,1867	6,981	0,0009
38.4	0,402	0,4645	0,4629	0,1659	0,2195	0,5658	6	0,3801	0,1553	5,9947	0,0019
3.4	0,4214	0,3677	0,313	0,1278	0,5479	0,6431	6	0,4035	0,1812	5,4557	0,0028
20.5	0,3652	0,2879	0,2944	0,1395	0,4977	0,6044	6	0,3648	0,1653	5,4053	0,0029
36.1	0,3327	0,2846	0,3085	0,0897	0,4066	0,5597	6	0,3303	0,1542	5,2463	0,0033
R12.1	0,2065	0,3597	0,3897	0,4353	0,5976	0,8706	6	0,4766	0,2306	5,0629	0,0039
67.1	0,4203	0,3821	0,3758	0,0209	0,3587	0,5678	6	0,3543	0,1802	4,8154	0,0048
Théromyzine	0,5704	0,4417	0,3927	0,0178	0,5282	0,6314	6	0,4304	0,2197	4,7983	0,0049
74.1	0,2203	0,353	0,255	0,6538	0,1951	0,5559	6	0,3722	0,1906	4,7838	0,005

R version R 1.1.1 (August 15, 2000)

Cyber-T version 7.03

hdarray library version 3.65

Exp: Ratios convertis sous forme logarithmique des expériences 1 à 6

N: nombre de valeurs analysées par candidat

M: moyenne des 6 valeurs par candidat

SD: déviation standard de chaque candidat

"t": résultat du test T

"p": valeur p de probabilité du résultat du test pour chaque candidat

Les valeurs absolues des ratios moyens sont reportées sur la colonne ci-contre

Candidats	ratio(Log)	ratio(abs)
R4.4	0,9331	2,5425
R15.1	0,8747	2,3981
R14.4	0,8454	2,3289
24.1	0,6431	1,9023
Théromacine	0,6145	1,8487
Actine	0,532	1,7023
38.4	0,3801	1,4624
3.4	0,4035	1,497
20.5	0,3648	1,4403
36.1	0,3303	1,3914
R12.1	0,4766	1,6105
67.1	0,3543	1,4251
Théromyzine	0,4304	1,5378
74.1	0,3722	1,4509

Les analyses statistiques sont réalisées en

s'appuyant sur une correction de Bonferroni :

une première analyse sélectionne 7 candidats selon une correction avec p=0.1 (jaune foncé)

une deuxième analyse sélectionne 11 candidats selon une correction avec p=0.2 (jaune foncé + jaune clair)

une troisième analyse sélectionne 14 candidats selon une correction avec p=0.25 (jaune foncé + jaune clair + jaune pale)

PCR le candidat R4.4 avec les amorces R-AP11 et R-AP13 tout comme le set 7 qui contient ces deux oligonucléotides et a amplifié les candidats R14.4 et R15.1. Cette redondance involontaire des deux combinaisons d'amorces tend à apporter une cohérence supplémentaire à l'approche entreprise.

Le candidat suivant sélectionné, le clone 24.1, est issu de l'analyse par DDRT-PCR classique. Malgré son séquençage, il n'a quant à lui pas été identifié en raison de sa séquence principalement constituée de la région 3' non traduite du transcrit. L'observation de gènes inconnus induits par l'infection bactérienne chez la sangsue renforce ici l'idée de développer des analyses combinatoires fondées sur des techniques comparatives globales comme les Biopuces à ADN et des techniques comparatives plus spécifiques comme la DDRT-PCR ciblée afin de pouvoir étudier des familles de gènes connus.

Le produit sélectionné suivant correspond à notre contrôle positif interne : le gène de la thérômacine. Ce peptide isolé chez *T. tessulatum* possède une activité antibactérienne dirigée contre les bactéries Gram+ [Tasiemski *et al.*, 2002]. Le gène codant ce peptide est inductible très rapidement par une infection expérimentale et constitue un référent de choix pour l'étude. Sa détection renforce la signification de l'analyse statistique.

Un produit prévu comme contrôle négatif de l'étude s'est avéré sélectionné par l'analyse statistique. Il s'agit du gène d'une actine de *T. tessulatum*. En effet, afin d'obtenir à la fois un gène de ménage pour les quantifications en Northern Blot et un contrôle négatif dans la vérification des candidats par Biopuces à ADN, l'ADNc complet du transcrit codant une forme d'actine a été obtenu par PCR. Des amorces dégénérées ont d'abord amplifié un fragment interne puis des approches de 3' RACE et 5' RACE-PCR ont abouti au clonage complet de l'ADNc. La figure 27 page 104 représente la séquence ainsi que le profil de l'ARNm obtenu par Northern Blot. Sa comparaison aux banques de données lui confère 83 % d'identité avec l'ARNm de l'actine 2b de la méduse *Podocoryne carnea* [Aerne *et al.*, 1993]. Ce produit présumé invariant s'est en fait montré induit par l'infection expérimentale.

Par ailleurs, un candidat de DDRT-PCR (clone 2.1) correspond à un gène codant une autre actine. Ce candidat n'est pas sélectionné dans l'analyse par Biopuces à ADN. Cette forme d'actine ne correspond pas à celle utilisée comme contrôle négatif qui s'avère modulée. Nous reviendrons dans le chapitre suivant sur ces deux formes d'actine et sur les modulations, déjà évoquées dans la littérature, de tels gènes dans un contexte immunitaire.

Le dernier candidat sélectionné dans cette première série (à $p=0.1$) est le clone 38.4. Ce candidat est un clone homologue du clone 38.2 qui est identifié au gène de la Malate

A

5' TCCGAGCTTTGTTACAGTAAAACCTTTGTGAAACTACAACCTTTGTCAAAAATGTGCGACGAAGACGTTACCGCTCTTGTTGTAGACAATGGATCAGGTTTGTGCAAAGCTGGATTT
M C D E D V T A L V V D N G S G L C K A G F
GCAGGAGATGATGCCCCAAGAGCTGTTTTCCCTTCCATCGTTGGAAGACCCAGACATCAAGGTGTAATGGTTGGCATGGGACAAAAGGATAGCTATGTAGGAGATGAAGCTCAAAGC
A G D D A P R A V F P S I V G R P R H Q G V M V G M G Q K D S Y V G D E A Q S
AAGAGAGGTATCCTGACTCTCAAATACCCAATTGAACACGGTATTGTTACAACTGGGATGATATGGAGAAGATCTGGCATCACACCTTCTACAACGAATTGCGTGTGCCCCCTGAA
K R G I L T L K Y P I E H G I V T N W D D M E K I W H H T F Y N E L R V A P E
GAACATCCAGTCCTTCTGACAGAAGCCCCCTCAACCCAAAAGCCAACAGAGAAAAAATGACACAGATCATGTTTCGAAACGTTCAACTCTCCTGCGATGTATGTCGCGATCCAAGCT
E H P V L L T E A P L N P K A N R E K M T Q I M F E T F N S P A M Y V A I Q A
GTACTCTCCCTGTACGCTTCAGGAAGAACTACTGGTATCGTACTCGATTCTGGAGATGGTGTCACTCACACGGTACCCATCTACGAAGGGTATGCTCTCCCTCATGCCATTCTTCGT
V L S L Y A S G R T T G I V L D S G D G V T H T V P I Y E G Y A L P H A I L R
TTGGATTTGGCCGGCAGAGATCTTACAGATTACCTCATGAAAATCCTCACCGAACGTGGTTACAGTTTACAACCACAGCCGAAAGGGAAATTGTCCGTGACATCAAAGAAAACTT
L D L A G R D L T D Y L M K I L T E R G Y S F T T T A E R E I V R D I K E K L
TGCTACGTTGCCCTCGATTTTGAACAAGAAATGGCTACCGCTGCTGCTTCATCATCTCTCGAAAAAAGCTACGAACTTCCCGATGGTCAAGTCATCACTATTGGGAAAGAAGCTTTC
C Y V A L D F E Q E M A T A A A S S S L E K S Y E L P D G Q V I T I G K E R F
CGTTGCCCTGAATCCGTCTTCAGCCAGCCTTTCTTGGGATGGAATCCTGCGGTATTACGAAACCACGTACAACAGTATCATGAAATGCGACGTCATACGTAAGATTATACGCC
R C P E S V F Q P A F L G M E S C G I H E T T Y N S I M K C D V I R K D L Y A
AACACCGTTTTATCCGGTGGTTCCAGGTTTTTCCCCAGGCATCCGCCGACAGAATGCAGAAAGAAATTACGTCGATGGCCCCGTCCACAATGAAAATCAAATCATTTGCTCCTCCA
N T V S S G G S Q V F P Q A S A D R M Q K E I T S M A P S T M K I K I I A P P
GAGCGTAAATATTCCGTTTGGATTGGTGGATCCATTCTCGATTTTTATCCACTTTCCAACAGATGTGGATCAGCAAACAAGAATACGATGAATCAGGCCCTCAATTGTCCACCGA
E R K Y S V W I G G S I L A F L S T F Q Q M W I S K Q E Y D E S G P S I V H R
AAATGCTTCTAAATTTATCACATCATATTTTTACTTCCGTGAACTCAATTGATTTAAAAAATTTTATTCCAAGCTATTTACATGTAATTTATATACAGATTTAATGGTGATTTTT
K C F
GTCATTTCAATCCCTTTTAAAAAATAACATTAAGTAAAATTGCCGTGTTACAGTGGTATGCTAGAGCTTTTGATATTTCAATAAAGAATTTTTTCGT poly(A) 3'

Site de polyadénylation prédit par Genscan (Annexe 2)

B

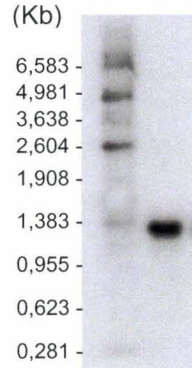


Figure 27 : Clonage complet de l'ADNc codant une actine chez *T. tessulatum*.

Les expériences d'amplifications par 3'RACE-PCR et par PCR dans la banque d'ADNc ont permis d'obtenir l'ADNc complet de cette forme d'actine (A). Son cadre de lecture est constitué de 1128 bases (376 acides aminés). L'hybridation d'une sonde spécifique par Northern Blot a montré que son ARNm possède une taille approximative de 1,38 Kb (B). Sa comparaison aux banques de données lui confère 83 % d'identité avec l'ARNm de l'actine 2b de la méduse *Podocoryne carnea* [Aerne *et al.*, 1993].

déshydrogénase. Il faut alors apporter quelques précisions concernant le clone 38.2 pour comprendre pourquoi il n'a pas été retenu par l'algorithme. Lorsqu'on observe les moyennes logarithmiques des ratios des deux clones, on peut constater que tous deux ont un M de 0.38 (valeurs non fournies pour les produits différentiels non sélectionnés). Toutefois, le clone 38.2 présente des valeurs plus fluctuantes au cours des six expériences. Sa déviation standard (SD) est alors plus élevée ce qui diminue la valeur du test et l'élimine statistiquement.

Il est donc intéressant de faire varier la valeur de la correction de Bonferroni afin de réaliser une étude la plus objective possible.

L'analyse réalisée avec une correction de Bonferroni avec $p=0.2$ a permis de sélectionner d'autres candidats. Ce degré de probabilité moins sélectif ajoute quatre produits à ceux déjà obtenus dans l'analyse avec $p=0.1$. Ils présentent soit des différences plus petites entre les deux lots d'animaux (avec des ratios plus faibles), soit des ratios de même valeur approximative mais avec une déviation standard des six expériences plus importante qui réduit alors la probabilité du test T. Les trois premiers sont issus de la DDRT-PCR classique et le dernier est issu de la DDRT-PCR ciblée.

Parmi ces candidats, il y a le clone 3.4 qui correspond au gène de la cystatine B de la sangsue. Des travaux particuliers réalisés sur ce candidat ont montré qu'il est induit après une infection par des bactéries. L'étude plus approfondie de ce gène fera l'objet de la dernière partie du chapitre.

Le candidat suivant est le clone 20.5. Il correspond à un gène codant une protéine de liaison à la queue poly(A) des ARNm (PABP1). Le clone 36.1 est aussi retenu et correspond à un gène codant une protéine ribosomale 60S. Le candidat sélectionné issu de la DDRT-PCR ciblée est le clone R12.1. Son séquençage a permis de l'identifier à un gène codant une α tubuline.

Enfin, une troisième et dernière analyse effectuée avec une correction de Bonferroni avec un $p=0.25$ a abouti à la découverte de trois autres candidats. Leur sélection n'est pas aussi évidente que celle des premiers candidats. En revanche, elle reste significative pour une raison majeure. En effet, parmi eux, seuls deux produits sont issus de l'analyse par DDRT-PCR classique : les clones 67.1 et 74.1 (séquencés mais non identifiés). Le troisième correspond au gène de la théromyzine. L'ADNc de ce gène fut cloné complètement à la suite de l'analyse biochimique, celle-ci ayant montré une présence différentielle du peptide dans le liquide coelomique après une infection expérimentale. Des travaux parallèles en Hybridation

in situ semblent montrer que ce gène est induit lors d'une telle infection dans les cellules graisseuses. L'objectif de son dépôt sur Biopuces était de tenter de confirmer cette induction. Sa présence parmi les produits significativement modulés va dans ce sens et surtout tend à montrer que des analyses statistiques réalisées avec ces valeurs de correction peuvent avoir toute leur signification biologique, à plus forte raison lorsque les transcrits utilisés sont issus d'un homogénat de l'animal entier. L'ensemble des candidats ainsi que leur identité pour certains sont représentés sur le tableau 9 page 107.

Par conséquent, l'analyse statistique a révélé la sélection de plusieurs candidats et cela s'est effectué à trois degrés de sélectivité avec des valeurs croissantes de « p ». De manière intéressante, les trois tests T ont mis en évidence des candidats parmi lesquels des gènes étaient déjà connus pour être induits par l'infection expérimentale. Dans la première série, le gène de la thérômagine comme contrôle positif est effectivement sélectionné. Dans la deuxième série, le gène codant la cystatine B (clone 3.4) a montré préalablement qu'il était induit après infection bactérienne, ce que nous aborderons plus loin. Enfin la troisième série avec un $p=0.25$ comporte le gène de la théromyzine, peptide antibactérien dont l'expression est connue pour être induite dans les conditions expérimentales.

S'il est donc légitime d'accorder plus de poids aux premiers candidats sélectionnés par une valeur $p=0.1$, les résultats obtenus avec des valeurs de « p » plus importantes sont tout aussi probants car les tests sont tous confortés par des gènes déjà connus pour être induits.

Il est important enfin de remarquer que des expériences contrôles ont été réalisées. Des lames ont été hybridées avec des sondes témoin Cy-3 / témoin Cy-5 et d'autres avec des sondes expérimental Cy-3 / expérimental Cy-5. Cela permet de vérifier dans chaque cas que les deux sondes hybridées génèrent des valeurs d'intensité approximativement égales (B de la figure 26 page 101). Ce type de vérification apporte l'assurance que les signaux différentiels statistiquement détectés proviennent de modulations physiologiques et non d'un artefact expérimental.

Tableau 9: Liste des candidats sélectionnés dans l'approche par Biopuces à ADN

Candidats	Identification	p
R4.4	THREONINE DESAMINASE (2e-26; salmonelle)	0.1
R15.1	THREONINE DESAMINASE (4e-24; H. influenzae)	
R14.4	THREONINE DESAMINASE (2e-29; E. coli)	
24.1	inconnu	
Théromacine	peptide antibactérien de <i>T. tessulatum</i> (contrôle positif)	
Actine	contrôle présumé négatif avant l'expérience (e-113; méduse)	
38.4	MALATE DESHYDROGENASE (3e-28; mésembryanthème)	
3.4	CYSTATINE B (4e-18; homme)	0.2
20.5	POLYADENYLATE-BINDING PROTEIN 1(6e-13; homme)	
36.1	PROTEINE RIBOSOMALE 60S L4 (7e-41; drosophile)	
R12.1	ALPHA TUBULINE (4e-48; patelle)	
67.1	inconnu	0.25
Théromyzine	peptide antibactérien de <i>T. tessulatum</i>	
74.1	inconnu	

III- Etude de la cystatine B et de la cathepsine L de *T. tessulatum*

1- Le candidat n°3 est homologue à la cystatine B humaine.

L'étude des ARNm de *T. tessulatum* par DDRT-PCR a mené à la détection de plusieurs candidats différentiels. Le clone 3.4 (tableau 6 pages 90 et 91) après analyse avec le programme BLASTX 2.1.2 (Annexe 2 page 183) sur la banque swissprot s'est avéré être identique à 54% sur 76 acides aminés avec la cystatine B humaine.

Les cystatines sont des inhibiteurs de cystéines protéases largement présents dans les règnes végétal et animal. Ils sont classés en trois familles distinctes comprenant la famille des cystatines de type 1 (stéfines), la famille des cystatines de type 2 et la famille des cystatines de type 3 (kininogènes). La cystatineB (stéfine B) appartient à la première famille. Ces inhibiteurs de la famille des stéfines sont intracellulaires. Ils ne possèdent aucun peptide signal, ce qui les empêche d'être sécrétés. La stéfine B est connue essentiellement chez les vertébrés. Hormis *T. tessulatum*, cet inhibiteur n'est isolé, chez les invertébrés, que chez l'huître *Crassostrea virginica* [Gross, 2001]. Une cystatine non sécrétée est également présente chez *Drosophila melanogaster* mais elle ne semble pas correspondre au type B. Leur alignement est repris sur la figure 29 page 111. La Stéfine B est, comme toutes les cystatines, un inhibiteur spécifique de cystéines protéases, les cathepsines [Anastasi *et al.*, 1983]. Elle est connue pour inhiber spécifiquement *in vitro* l'activité enzymatique des cathepsines B, H, L et S chez les bovins et l'homme [Thiele *et al.*, 1988; Turk *et al.*, 1994].

Les interactions entre les cathepsines et les cystatines représentent un élément important de certains mécanismes cellulaires. C'est pourquoi, il nous est apparu intéressant de développer l'étude de la cystatine B de *T. tessulatum* (*Tt-CYSB*) dans un contexte de réponse immunitaire.

1.1- Clonage de l'ADNc complet de *Tt-cysB*

La première étape a consisté à réaliser le clonage moléculaire complet de l'ADNc de la cystatine B de sangsue. Pour cela, des amplifications ont été effectuées par PCR sur la banque d'ADNc de *T. tessulatum* de stade 2. Sur la base de la séquence obtenue par DDRT-PCR, des oligonucléotides inverses complémentaires (Cystatine Rv 1 et Cystatine Rv 2) ont

été dessinés de manière à amplifier l'extrémité 5' de l'ADNc. Ces amorces ont été utilisées contre les amorces 5' du vecteur dans lequel sont insérés les ADNc de la banque (5' Fw vecteur 1 et 5' Fw vecteur 2). Les amplifications ont d'abord utilisé les amorces les plus externes dans les séquences, c'est-à-dire l'amorce 5' Fw vecteur 1 et l'amorce Cystatine Rv 1. Ensuite le mélange réactionnel de ce premier tour est réutilisé comme matrice pour une deuxième amplification avec cette fois des amorces plus internes que sont l'amorce 5' Fw vecteur 2 et l'amorce Cystatine Rv 2. La figure 28 page 110 regroupe les différentes étapes de ce clonage moléculaire.

L'ADNc de *Tt-cysB* est composé d'un cadre de lecture de 306 nucléotides codant un peptide de 102 acides aminés. Le programme SignalP V1.1 (Annexe 2 page 183) n'a révélé aucun peptide signal, ce qui est en accord avec les cystatines B connues. Les expériences de Northern Blot permettent d'évaluer la taille approximative de l'ARNm à 700 paires de base (figure 30 page 115).

La figure 29 page 111 présente un alignement de la séquence en acides aminés avec les cystatines B d'autres espèces à l'aide du programme Multalin (Annexe 2 page 183) [Corpet, 1988]. Cet alignement permet de constater la conservation importante de la séquence biochimique par rapport à plusieurs espèces vertébrées. Le motif QXVXG ainsi que la glycine (en position 5 chez *Tt-CYSB*) nécessaires aux interactions avec les cathepsines sont présents [Stubbs *et al.*, 1990; V. Turk & Bode, 1991]. Par ailleurs, tout comme chez les vertébrés, nous remarquons la présence d'une cystéine conservée à l'extrémité amino-terminale. Chez les vertébrés, cette cystéine libre en troisième position est un caractère propre à la cystatine B dans toute la superfamille des cystatines. De récentes études réalisées *in vitro* ont montré que ce résidu était primordial pour inhiber la papaine ainsi que les cathepsines H, B et L [Pol & Bjork, 2001]. En ce qui concerne *Tt-CYSB*, il est intéressant de constater l'existence d'un résidu surnuméraire par rapport aux séquences de vertébrés (MPLCG contre MMCG, figure 29 page 111).

Concernant la répartition, sur le plan phylogénétique, des cystatines non sécrétées (dépourvues de peptide signal), il faut souligner leur existence chez de nombreux végétaux (Annexe 2, DOMAINES Cystatines, page 183) comme entre autre *Arabidopsis thaliana* ou *Vigna unguiculata* [Fernandes *et al.*, 1993; Seki *et al.*, 2001]. Concernant la cystatine B plus précisément, des travaux font état de sa caractérisation chez l'huître *Crassostrea virginica* [Gross, 2001] (Annexe 2 page 183). Celle-ci présente de nombreuses homologies avec *Tt-CYSB* (figure 29 page 111). En revanche, la faible ressemblance de son extrémité amino-terminale avec celles de sangsue et de vertébrés et plus particulièrement l'absence de la

Clone 3.4 obtenu par DDRT-PCR (512 pb).

H-AP 10

5' AAGCTTCCACGTAGAAAGTAAAATTAACAAAAGTTTCAAAGAGTTCAAAGCCATTCAATTTTCATCACAAGTTGTTGCCGGCACAATTACTTTGTCAAGGTGCACGTGGGTGA
GGAGGAGTATTTGCACCTGAGGGTGTTTGCCCTCTGCCCTCCAAGTGGGGGCCAACCTGAACTCATGGTATCGAGTACC CGAAGACAAAACACGATGAACTGAAGTACTTCAATC
CTAACTAAATATTTGTGACATTTTTTTTAGTGATGCAATACCGATGGAATTCTTATTGATAATGTGTGCTAGCTACAATCTGTTATATTTTCTACTCAGCATCCAATTATGTCATGG
TCTAATTGTGAAGATATTTCAAATTATGTTGCATCAATGTCATGAGCAGTTAATTCATATTTTTTTTATAGATTTTTTTCAATTGAATAAAGCAAAAATATAAATTTCAAGTGTCCGT
TTGTATACCATAAAAATAAATTTATTTCAAATGGGC CAAAAAAAAAAGCTT 3' Cystatine Rv2 Cystatine Rv1

HT11G

Résultat de l'amplification dans la banque d'ADNc

5'Fw vecteur 2 extrémité du vecteur de la banque

5' CGCCGTACAGATCCAAGCTCCTCGAATCGAATTGCTCGAGTCGACCCACGGCGTCCGGCGCAGAAGTGAACGTTTCAACCTCTTCGACGTTTGAATCTGCGTTGGAACCTTAA
TTAAATTAATTAATTAATAAATTAACTTTAAGATGCCTTTGTGCGGTGGAACCTCCGACGTTAAGCAAGCCGATGGAAGACTCAAGAAATCGTTGATAAGGTGAAGCACCACGTAGA
AAGTAAAATTAACAAAAGTTTCAAAGAGTTCAAAGCCATTCAATTTTCATCACAAGTTGTTGCCGGCACAATACTTTGTCAAGGTGCACGTGGGTGAGGAGGAGTATTTGCACC
TGAGGGTGTTCGCCCTCTGCCCTCCAAGTGGGGGCCAACCTGAACTC 3' Cystatine Rv2

Clonage complet de l'ADNc de *Tt-cysB*

5' GCGCAGAAGTGAACGTTTCAACCTCTTCGACGTTTGAATCTGCGTTGGAACCTTAATTAATAATTAATTAATAAATTAACCTTTAAGATGCCTTTGTGCGGTGGAACCTCCGACG
TTAAGCAAGCCGATGGAAGACTCAAGAAATCGTTGATAAGGTGAAGCACCACGTAGAAAAGTAAAATTAACAAAAGTTTCAAAGAGTTCAAAGCCATTCAATTTTCATCACAAGTT
V K Q A D G K T Q E I V D K V K H H V E S K I N K S F K E F K A I Q F S S Q V
GTTGCCGGCACAATACTTTGTCAAGGTGCACGTGGGTGAGGAGGAGTATTTGCACCTGAGGGTGTTCGCCCTCTGCCCTCCAGTGGGGGCCAACCTGAACTCCATGGTATCGA
V A G T N Y F V K V H V G E E E Y L H L R V F A P L P S S G G Q P E L H G I E
GTACCCGAAGACAAAACACGATGAACTGAACTTCAATCCTAACTAAATATTTGTGACATTTTTTTTAGTGATGCAATACCGATGGAATTCTTATTGATAATGTGTCGTAGCTAC
Y P K T K H D E L K Y F N P N
AATCTGTTATATTTTCTACTCAGCATCCAATTATGTCATGGTCTAATTGTGAAGATATTTCAAATTATGTTGCATCAATGTCATGAGCAGTTAATTCATATTTTTTTTATAGATTTT
TTCAATTGAATAAAGCAAAAATATAAATTTCAAAGTGTCCGTTTGTATACCATAAAATAAATTTATTTCAAATGGGC poly(A) 3'

Site de polyadénylation (prédit par Genscan, Annexe 2)

Figure 28 : Différentes étapes du clonage moléculaire complet de l'ADNc de *Tt-cysB*.

cystéine normalement conservée émettent des interrogations sur le type exact de cette cystatine (figure 29 page 111). La structure ne permet pas de certifier que cette forme existant chez l'huître est une cystatine B. En outre, la présence d'un inhibiteur de cystéines protéases chez la *Drosophila* a été observée [Adams *et al.*, 2000] mais son alignement par rapport aux séquences types d'invertébrés et de cystatine B humaine révèle des similitudes qui sont restreintes aux motifs conservés dans toutes les cystatines (figure 29, B, page 111). Le domaine d'interaction avec les cathepsines est conservé mais il n'y a pas de cystéine dans l'extrémité amino-terminale (Annexe 2, DOMAINES Cystatines, page 183). On ne peut donc pas l'apparenter non plus à une cystatine de type B.

Tt-CYSB semble donc être la seule cystatine B à être caractérisée complètement chez les invertébrés et à présenter des similitudes importantes de séquence avec celles des modèles vertébrés.

Par ailleurs des expériences réalisées par le Dr. C. Cocquerelle au sein du laboratoire ont mené au clonage d'un fragment d'ADNc qui montre 42% d'identité sur 64 résidus avec la cystatine C bovine. Cet inhibiteur appartient à la deuxième famille des cystatines, sécrétées dans le milieu extracellulaire. Des expériences de 3'RACE-PCR et d'amplification de l'extrémité 5' dans la banque d'ADNc de *T. tessulatum* sont en cours de réalisation afin de pouvoir compléter la caractérisation moléculaire de ce deuxième inhibiteur de cystéines protéases chez *T. tessulatum*.

1.2- Contrôle de l'induction du gène *Tt-cysB* après infection bactérienne

Ce contrôle a dans un premier temps été réalisé par Northern Blot. Il a consisté à comparer le taux d'ARNm de *Tt-cysB* dans des lots d'animaux ayant reçu les mêmes traitements que lors de l'analyse par DDRT-PCR. Nous avons donc un lot d'animaux injectés avec du PBS et un lot d'animaux immunostimulés avec un mélange bactérien. Cette analyse utilise également un lot d'animaux témoins intacts. Les lots injectés sont sacrifiés après 24 heures.

Ce contrôle par Northern Blot, qui s'est déroulé chronologiquement avant l'approche par Biopuces à ADN, n'a pu être répété pour deux raisons. D'une part, des analyses par Northern Blot concernant la vérification de l'induction du gène *Tt-cysB* ont été réalisées dans trois Northern Blot distincts successifs. Malheureusement, à ce moment nous utilisons comme contrôle interne le gène de l'actine cloné spécialement pour les contrôles en Northern Blot et en Biopuces à ADN. Nous avons observé pour ce contrôle des augmentations du taux

de transcrit dans le lot d'animaux immunostimulés par rapport aux lots contrôles. Cette variation a d'abord été perçue comme une différence de quantité d'ARN totaux chargés sur le gel d'agarose. L'étude ultérieure par Biopuces à ADN a confirmé cette modulation du gène de l'actine. Cette variation semble intéressante puisqu'elle peut s'intégrer à l'étude. En revanche, ces trois Northern Blot n'ont pas permis de vérifier l'induction du gène de la cystatine B puisqu'il n'y avait pas de véritable contrôle d'expression constante. D'autre part, après avoir choisi un autre contrôle réellement invariant qui correspond à l'ARN ribosomal 18S de sangsue, la quantité d'ARN totaux disponible pour reprendre ces études par Northern Blot n'était plus suffisante pour réaliser trois fois l'expérience.

Une seule expérience a donc été effectuée. Néanmoins, la membrane a pu regrouper des lots supplémentaires pour étayer l'étude. En parallèle des trois premiers lots expérimentaux, d'autres conditions ont été ajoutées. Ainsi, des animaux ont été sacrifiés soit 3 heures soit 24 heures après une immunostimulation réalisée par des bactéries Gram+ (*M. luteus*) ou par des bactéries Gram- (*E. coli*) uniquement. Un lot à 3 heures a été également réalisé avec une injection contrôle de PBS. Ces populations d'ARN totaux ont été hybridées avec une sonde spécifique du transcrit de *Tt-cysB* puis après rinçage de la membrane, avec une sonde spécifique de l'ARN ribosomal 18S. Même si statistiquement, les résultats ne sont pas significatifs car non répétés, il est tout de même possible d'en tirer une première information sur l'induction du gène *Tt-cysB*.

Les autoradiogrammes correspondant aux sondes *Tt-cysB* et contrôle 18S ont été analysés par le système de Densitométrie GS 710 (Biorad) qui estime les intensités de radiomarquage de chaque transcrit. Des valeurs semi-quantitatives sont ainsi obtenues pour chaque sonde et sont directement liées au taux moyen basal de chaque transcrit dans l'animal, à l'exposition relative de la membrane pour chaque sonde et aux variations de charges d'ARN totaux déposés avant leur migration sur gel dénaturant.

Afin d'éliminer les variations dues aux différences de quantité d'ARN totaux contenus dans chaque condition expérimentale sur la membrane, il est donc nécessaire de réaliser un rapport pour chaque condition expérimentale qui correspond à la valeur d'intensité de la sonde cystatine B sur la valeur d'intensité de la sonde 18S. En effet, puisque le taux d'ARN ribosomal 18S est constant quelque soit les conditions expérimentales, le rapport élimine ce paramètre. Les rapports pour la sonde 18S sont donc toujours de 1 puisque chaque condition est divisée sur elle-même. En revanche, pour la sonde *Tt-cysB*, les rapports varient entre les conditions expérimentales mais leur valeur absolue n'a aucun sens car elle est directement liée à la durée d'exposition de la membrane pour les deux sondes et au taux basal de chaque ARN

dans l'organisme. Les valeurs de *Tt-cysB* sont donc ramenées à une référence qui est le témoin intact. Le rapport pour le témoin intact est de 1 et les valeurs des autres conditions expérimentales seront des intensités relatives par rapport au témoin intact.

Les résultats détaillés sur la figure 30 page 115 montrent bien une augmentation significative du taux de transcrite spécifique de *Tt-cysB* dans le lot d'animaux immunostimulés par rapport au lot d'animaux injectés par des PBS (24 heures). Le facteur d'augmentation est de 1,64 et correspond environ au ratio obtenu pour ce candidat dans le contrôle par Biopuces à ADN effectué quelques mois plus tard (tableau 8 page 102). En revanche, l'injection de PBS ne semble pas déclencher cette induction. Les lots complémentaires d'animaux stimulés 24 heures soit par *E. coli* soit par *M. luteus* semblent montrer de faibles variations du taux de transcrite qu'il est impossible ici de démontrer.

Quant aux stimulations de 3 heures, elles montrent quelques variations mais ne sont pas suffisantes pour dire que le gène *Tt-cysB* est induit après 3 heures.

Par conséquent, les expériences réalisées permettent de souligner l'induction probable du gène *Tt-cysB*, 24 heures après l'injection du mélange de bactéries. Nous savons maintenant que le contrôle par Biopuces à ADN a confirmé cette induction. En revanche, les études concernant la spécificité d'induction pour les deux types de bactéries et les stimulations de 3 heures ne permettent pas de conclure en l'état des données.

Tt-cysB est donc induit 24 heures après l'infection par le mélange de bactéries. Des expériences de localisation tissulaire par hybridation *in situ* ont été réalisées afin de connaître les tissus concernés par cette induction.

1.3- Localisation tissulaire de l'expression du gène *Tt-cysB*

L'étude de la localisation des transcrits de *Tt-cysB* a été réalisée par Hybridation *in situ*. Cette analyse a eu pour objectifs de localiser l'expression basale et de déterminer les tissus dans lesquels a lieu l'induction de l'expression après immunostimulation, dans les mêmes conditions d'infections expérimentales que la DDRT-PCR. Pour cela, les cellules marquées sont observées par microscopie en épifluorescence. Un logiciel informatique de semi-quantification (Biocom) permet de déterminer le nombre de grains d'argent présents dans chaque cellule observée. Ce taux de marquage est directement proportionnel au taux de transcrite de *Tt-cysB*. Le comptage d'environ 30 cellules par animal, à raison de quatre

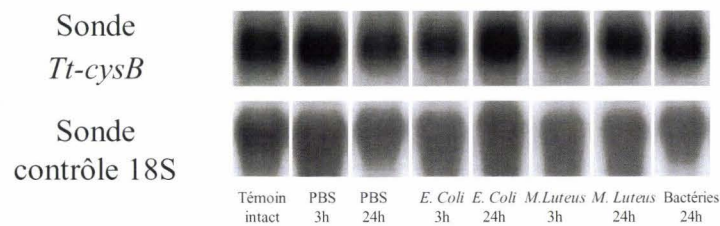
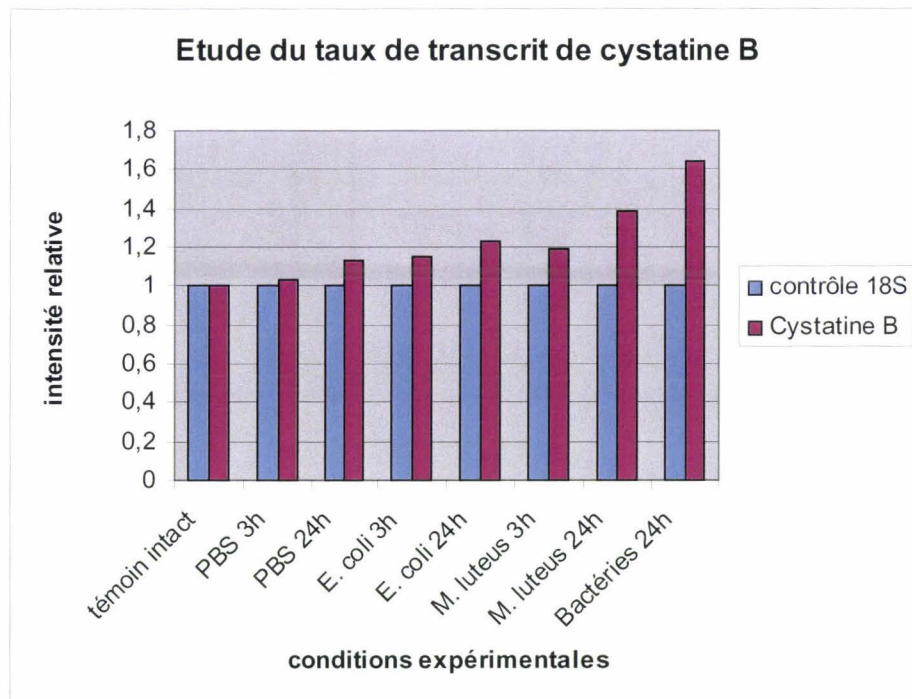


Figure 30: Contrôle par Northern Blot de la modulation transcriptionnelle de *Tt-cysB*.

Le taux de transcrit de *Tt-cysB* augmente 24 heures après l'injection du mélange de bactéries. Cette mesure a été effectuée à l'aide du système de Densitométrie GS 710 (Biorad Laboratories).

animaux par lot expérimental, a permis d'obtenir une valeur médiane du taux de grains d'argent pour chaque condition.

Nous constatons que l'expression du gène *Tt-cysB* est concentrée dans un type cellulaire unique de l'organisme en absence de toute stimulation (animal intact). Les cellules ainsi marquées sont une population de cœlomocytes (figure 31, A et B page 117). Ce type de cellule de grande taille est compris dans la cavité coelomique de l'animal. Trois populations de cœlomocytes classés selon leur taille sont présentes dans le liquide coelomique. Il y a des petits, des moyens et des grands cœlomocytes. Ces cellules sont soit circulantes dans le liquide soit adhérentes aux parois de la cavité coelomique. Dans le lot d'animaux analysés 24 heures après une simple piqûre, la localisation concerne toujours les mêmes cellules (autoradiogramme non présenté pour ce lot). En outre, la densité de grains d'argent ne présente pas de variation significative par rapport au lot d'animaux témoins intacts ce qui indique que la piqûre seule n'induit pas (ou plus) après 24 heures l'expression du gène *Tt-cysB* (figure 31, F page 117).

Dans le lot d'animaux immunostimulés par un mélange de bactéries, le marquage obtenu est toujours situé dans les grands cœlomocytes (figure 31, C et D page 117). Il ne concerne aucun autre type cellulaire dans l'organisme. La mesure de la densité des grains d'argent a permis de confirmer l'induction significative de l'expression du gène *Tt-cysB*, 24 heures après l'infection expérimentale. En outre, la comparaison du lot d'animaux immunostimulés avec le lot d'animaux piqués montre que cette induction est spécifique de l'injection de bactéries dans la cavité coelomique et non de la piqûre (figure 31, F page 117). Il est important de souligner que les expériences contrôles, basées sur l'utilisation distincte de sondes sens aux ADNc et de coupes digérées au préalable par la RNase A, n'ont présenté aucun marquage au sein de l'animal (figure 31, E page 117).

Par conséquent, l'étude par Hybridation *in situ* a permis de montrer que l'expression du gène *Tt-cysB* est exclusivement concentrée dans les grands cœlomocytes du liquide coelomique. Ce gène peut ainsi être utilisé comme marqueur spécifique de ce type de cellules. En outre, la comparaison des différents lots indique que l'injection du mélange de bactéries provoque spécifiquement une augmentation du nombre de transcrits de *Tt-cysB* dans les grands cœlomocytes.

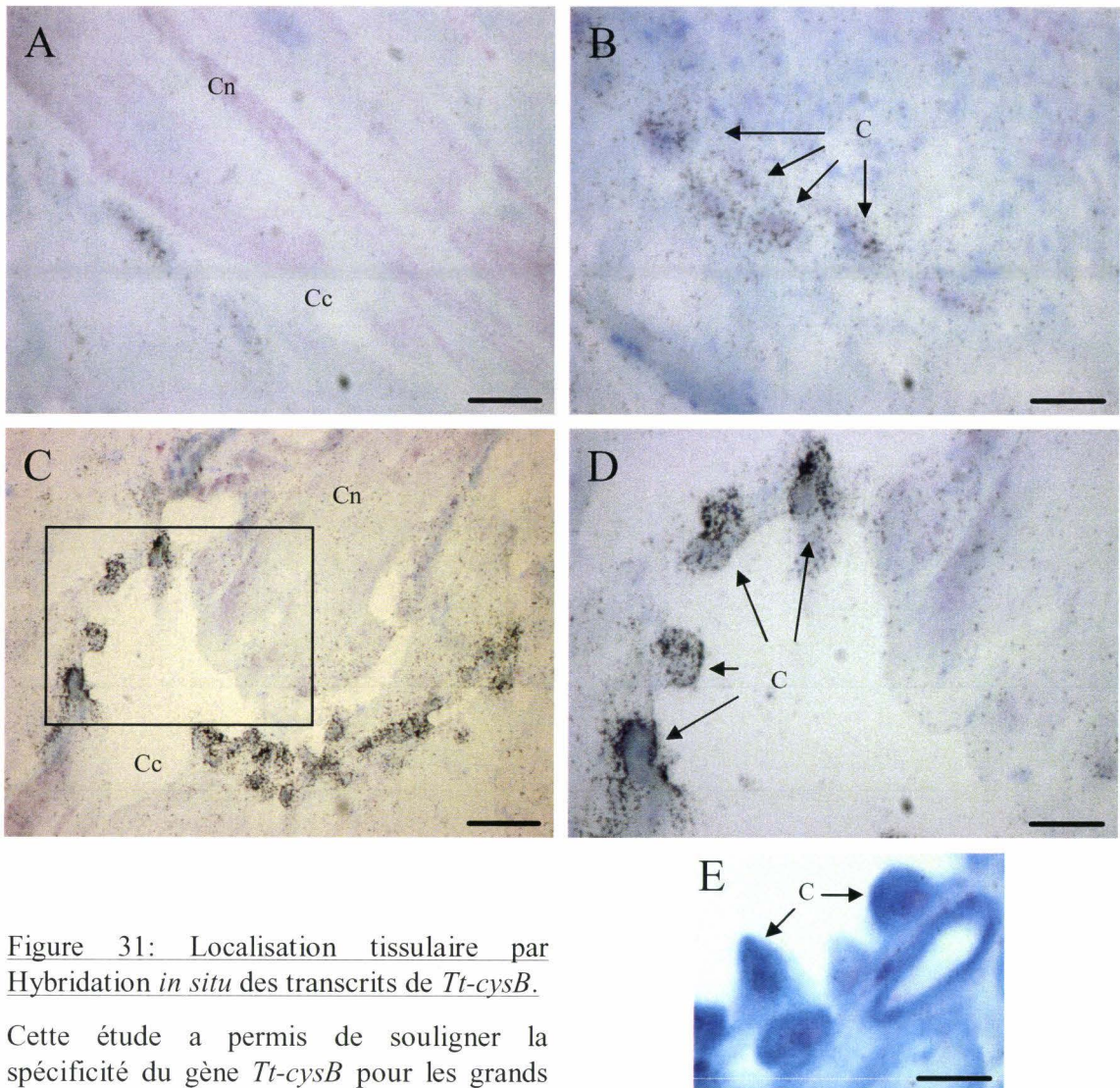
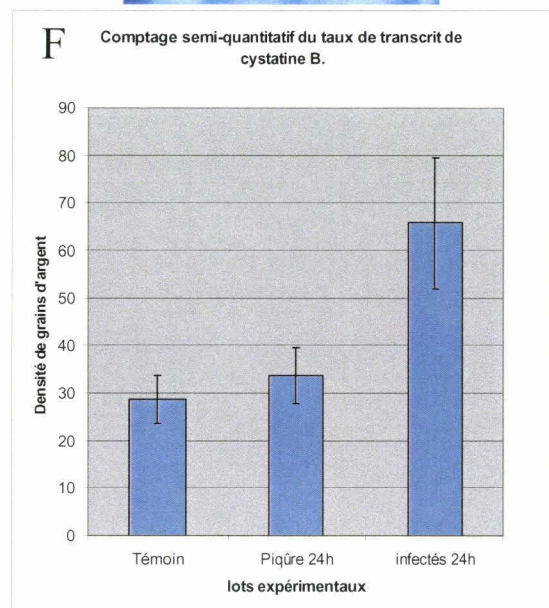


Figure 31: Localisation tissulaire par Hybridation *in situ* des transcrits de *Tt-cysB*.

Cette étude a permis de souligner la spécificité du gène *Tt-cysB* pour les grands cœlomocytes (C). Ils se situent dans la cavité coelomique (Cc) et peuvent border la chaîne nerveuse (Cn). La comparaison du taux de transcrit entre les animaux témoins (A et B) et les animaux immunostimulés (C et D) a montré que le gène *Tt-cysB* est induit 24 heures après infection bactérienne (F).

Un contrôle négatif est obtenu par hybridation de la sonde sens sur une coupe d'animal immunostimulé (E). L'absence de marquage confirme la spécificité de la sonde utilisée.

(Les barres d'échelle correspondent en A et C à 200 μm ; en B, D et E à 100 μm).



2- Etude des gènes codant les cathepsines de *T. tessulatum*

Si le gène *Tt-cysB* est spécifiquement induit par une infection bactérienne, quelles seront les fonctions potentielles de la cystatine B dans la réponse à cette infection ?

Selon la littérature, la cystatine B serait l'inhibiteur spécifique des cathepsines de type L et S [Leonardi *et al.*, 1996; Ritonja *et al.*, 1996; Turk *et al.*, 1994]. Des données existent déjà chez de nombreuses espèces invertébrées pour la cathepsine L [Grams *et al.*, 2001; A. M. Smith *et al.*, 1994; Tryselius & Hultmark, 1997]. Nous nous sommes focalisés à rechercher chez *T. tessulatum* une cathepsine de type L (*Tt-CPL*) et à étudier le cas échéant sa relation avec la cystatine B au cours de la réponse immune.

2.1- Clonage de l'ADNc complet de *Tt-cpl*

Avec les séquences des cathepsines L déjà connues, un alignement des régions conservées a été réalisé à l'aide du programme Multalin (Annexe 2 page 183) [Corpet, 1988] afin de déterminer dans quels motifs les amorces oligonucléotidiques doivent être dessinées. Ces motifs sont détaillés sur la figure 32 page 119.

Les amorces dégénérées synthétisées (CathepsineL Fw1 et CathepsineL Rv1) ont servi à amplifier par PCR le fragment d'ADNc situé entre les deux régions choisies. Ces dernières ont servi également à la synthèse d'amorces pour une approche 3' RACE-PCR et une approche d'amplification dans la banque d'ADNc de *T. tessulatum*.

La 3' RACE-PCR a utilisé l'amorce CathepsineL Fw2 et l'amorce Oligo d(T) adapter et l'amplification de l'extrémité 5' de l'ADNc dans la banque a utilisé l'amorce CathepsineL Rv2 et l'amorce 5' Fw vecteur 2 (amorce spécifique du vecteur de la banque). Les résultats de clonage sont représentés sur la figure 33 page 120. La séquence présentée est la combinaison des trois amplifications (extrémité 5' dans la banque, interne dégénérée, extrémité 3' par RACE-PCR). Le cadre de lecture de l'ADNc est constitué de 1053 paires de base qui après traduction donne un peptide de 351 acides aminés. D'après le programme SignalP V1.1 (Annexe 2 page 183), ce peptide possède un peptide signal de 15 acides aminés (souligné sur la figure 33 page 120).

Sur le plan phylogénétique, la cathepsine L est connue chez de nombreuses espèces invertébrées [Loukas *et al.*, 1998; A. M. Smith *et al.*, 1994; A. M. Smith *et al.*, 1993; Tryselius & Hultmark, 1997]. Il en est de même pour les différentes cathepsines. Cette famille

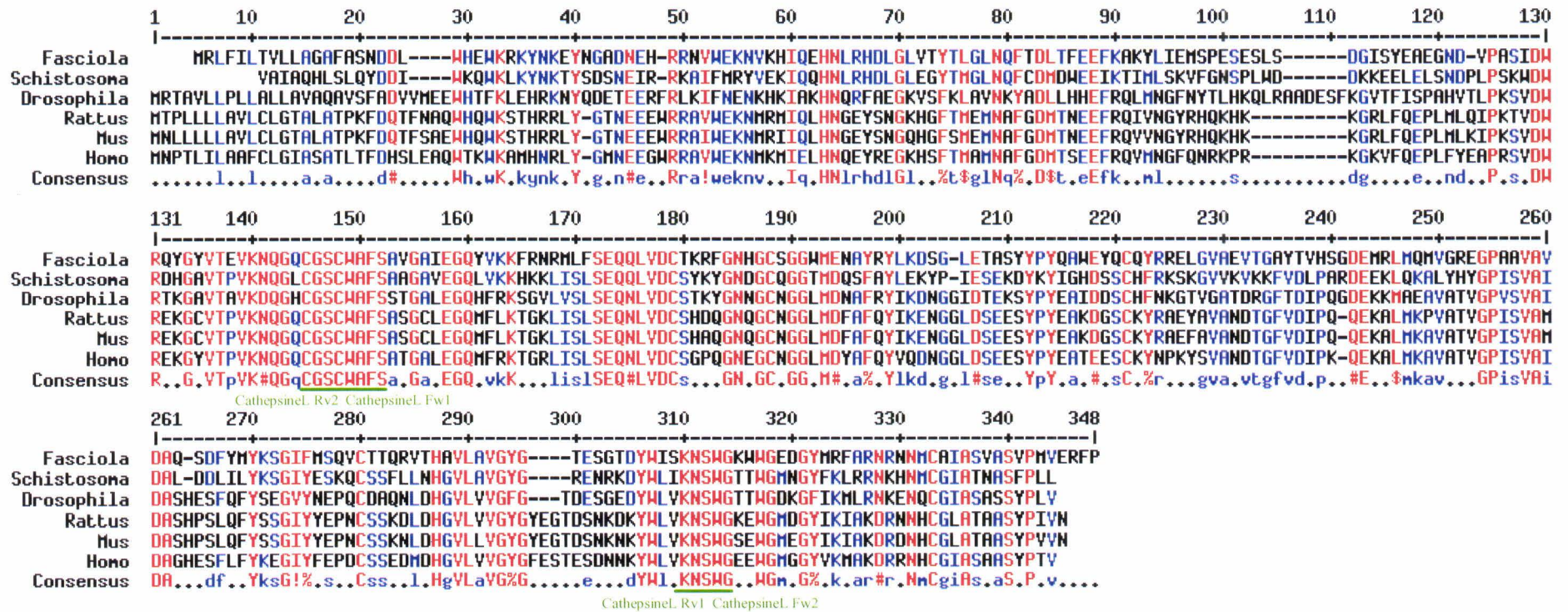


Figure 32: Choix des amorces oligonucléotidiques pour le clonage moléculaire de *Tt-cpl*.

Cet alignement sur les séquences de cathepsine L de *Fasciola hepatica*, de *Schistosoma mansoni*, de *Drosophila melanogaster* et d'espèces vertébrées telles que *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* et *Homo sapiens sapiens* a permis de déterminer des régions très conservées dans lesquelles il est possible de dessiner des amorces oligonucléotidiques dégénérées afin d'amplifier par PCR un fragment de l'ADNc de *Tt-cpl* (les motifs choisis sont soulignés en vert).

Clonage de l'ADNc complet de *Tt-cpl*

5' CAGAAAGTTTATCAGGATTTAGCTCTAACCTAGGAAAATTGAAGAAAATGTTGACATTAATTTTTGTGACCTTGTCTGTTGTGTACTGTGCGAAAGATTTGCATTGGGAGAGTC
M L T L I F V T L F C C V L S K D L H W E S
ATCGTGACAATTTGTA C T C A A C T T C C A A G A A G T T C T T G A T G C T G A A G T G G C C T G G C A C A A A T T C A A G T T G G A A C A T A A C A A G G T A T A T G T G G G C A T T G A G G A G G A G A G C T T G A G G
H R D N L Y S N F Q E V L D A E V A W H K F K L E H N K V Y V G I E E E S L R
AAGACCATATTTGCGACCACTACAAGTTCATCAAGGACCACACTCCAGCCACTGGGGAGAAAGTCTTCACTGTGGGGGTCAATGAATTCGCTGATATGACAGTCCACGA
K T I F A T N Y K F I K D H N A L H A T T G E K S F T V G V N E F A D M T V H E
GTTCCGCCAGATGATGAACGGGTTGAAACCTGACTCGACCCGAGTCTCAGGGTCGACCTACTTGTCTCCAACATCGATGCCCCACTGCCCGTGAAGTCGACTGGAGGACAAAGG
F A Q M M N G L K P D S T R V S G S T Y L S P N I D A P L P V E V D W R T K
GATTGGTATCTGAAGTTAAGAACCAGGGTTCGTGTGGATCATGCTGGGCCTTCACTACAACGGGTTTATTGGAGGGCCAACACATGAGGAAGACAGGGACGATGGTTGACCTGAGC
G L V S E V K N Q G S C G S C W A F S T T G S L E G Q H M R K T G T M V D L S
GAACAGAACCTCGTAGATTGTTCCACAAGTTACGGCAACGATGGATGCAATGGGGCCTCATGACCAATGCATTCAAGTACATCAAGGACAACAAGGGCATCGACACTGAAGAGGC
E Q N L V D C S T S Y G N D G C N G G L M T N A F K Y I K D N K G I D T E E A
ATATCCTTATGCAGGACGAGATGGTACTGCAAATTCAGAAGAACAAGTAGGAGCCACGGTGACAGGATTTGTTGAGATCCCCGCGGGAACGAGAAGAAGTTGCAGGAGGCAC
Y P Y A G R D G D C K F K K N K V G A T V T G F V E I P A G N E K K L Q E A
TAGCCACCGTAGGACCTGTGTCTGTGGCCATCGATGCCAACCATCAGTCCTTCACTGTCTACAAGTCAGGTGTGTATGATGAACCCGAATGCGACAGTGCACCAGCTAGATCATGGA
L A T V G P V S V A I D A N H Q S F M L Y K S G V Y D E P E C D S A Q L D H G
GTTCTTGTCTGTGGGGTATGGAAGCATCCATGGAAGGATTATTACATTGTGAAAACTCCTGGGGCACCCTTGGGGAGAGCAAGGTTACATCAGATTACAGCACCACCGCTGTCCC
V L A V G Y G S I H G K D Y Y I V K N S W G T T W G E Q G Y I R F S T T A V P
TGATGCCATCGGAGGTATCTGCGGTATCCTCCTCGATGCCTCTTACCCAGTCATTGCTAAAGATGATGTCTCGGACTTCAAGATGACTAATTGCTCGTGTCTTTCAGTAAAGAATCAAC
D A I G I C G I L L D A S Y P V I A
CGAAAAAAAAAAAAAAAA 3'

120

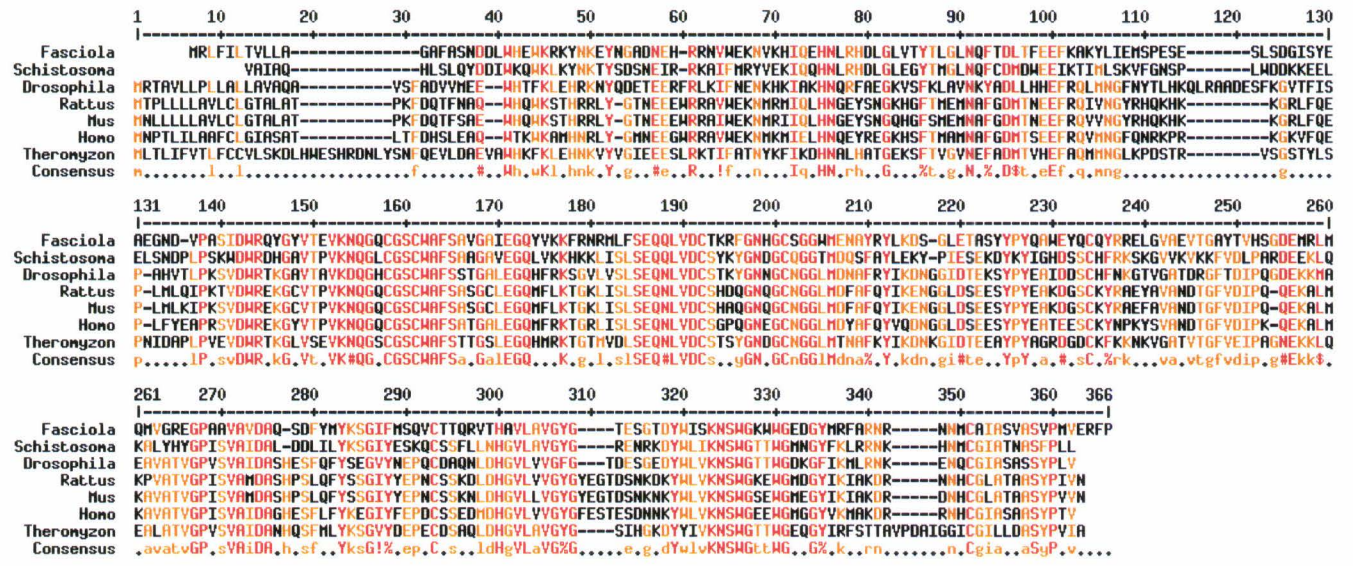


Figure 33 : Caractérisation complète de *Tt-cpl*.

La séquence de l'ADNc complet a permis de déduire la séquence en acides aminés de la cathepsine L de sangsue. Celle-ci a montré une grande homologie avec celles d'autres espèces invertébrées et vertébrées.

présente un domaine catalytique peptidase conservé (Annexe 2, DOMAINES Cystéines protéases, page 183).

La séquence traduite en acides aminés est alignée aux séquences d'autres espèces et révèle une première homologie de 68% avec la cathepsine L de Drosophile [Gray *et al.*, 1998; Tryselius & Hultmark, 1997]. Les homologies de *Tt-CPL* avec les cathepsines L de vertébrés supérieurs sont également très importantes puisque celle du porc et celle de l'homme s'alignent respectivement avec 64% et 62% [Gal & Gottesman, 1988; Okamura *et al.*, 1995]. Deux questions se posent alors :

- Face à la localisation d'expression du gène *Tt-cysB* dans des cœlomocytes particuliers et sachant que ce gène est induit uniquement dans ce type cellulaire après infection bactérienne, il est nécessaire de savoir où se situe l'expression du gène de *Tt-cpl*.

- Après localisation de l'expression basale de ce gène dans des conditions contrôles, il est tout à fait intéressant d'étudier sa régulation par l'infection expérimentale et, si elle existe, de voir où elle a lieu.

2.2- Localisation tissulaire de l'expression du gène *Tt-cpl*

L'étude de la localisation tissulaire d'expression du gène *Tt-cpl*, réalisée par hybridation *in situ* sur les mêmes lots d'animaux que ceux utilisés pour localiser le gène *Tt-cysB*, montre une localisation spécifique des transcrits de *Tt-cpl* dans les grands cœlomocytes (figure 34, A et B page 122). Cette expression a donc lieu dans le même type cellulaire que l'expression du gène *Tt-cysB*. Lorsqu'on compare le lot d'animaux témoins intacts avec le lot d'animaux piqués puis le lot d'animaux immunostimulés par des bactéries, aucune augmentation visuelle du marquage spécifique des transcrits de cathepsine L n'est détectable. Par conséquent, malgré l'absence de comptage semi-quantitatif, le gène *Tt-cpl* ne présente pas d'induction notable, 24 heures après une infection bactérienne ni même par une piqûre.

Le gène de l'enzyme et celui de son inhibiteur potentiel sont donc exprimés dans le même type cellulaire, à savoir les grands cœlomocytes (figure 34, A et B page 122). Les expériences contrôles distinctes utilisant des sondes sens aux ADNc et des coupes digérées par la RNase A montrent une disparition complète du marquage (figure 34, C page 122). Cette expression spécifique commune a été complétée par des expériences de double hybridation

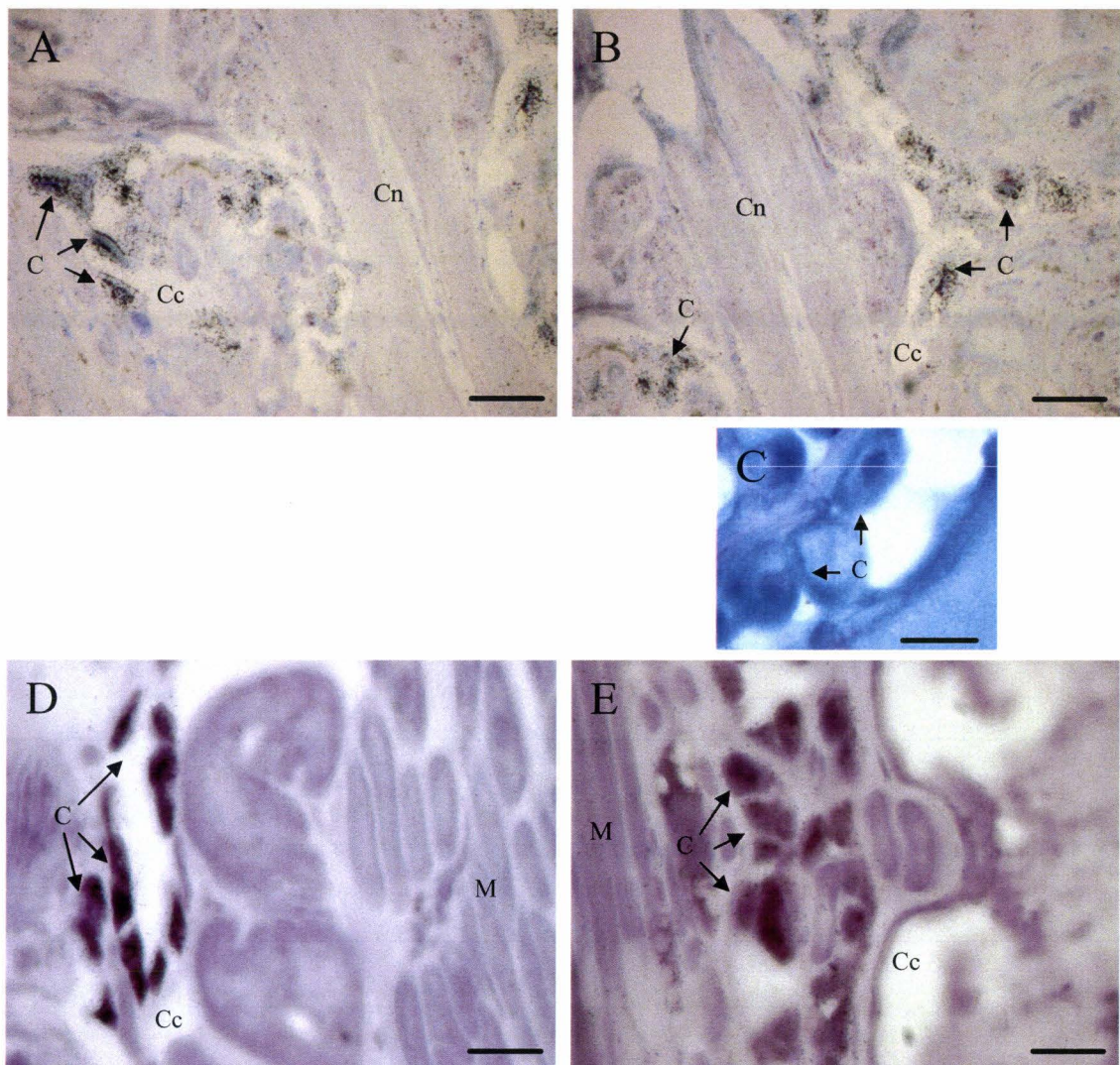


Figure 34 : Localisation tissulaire par Hybridation *in situ* des transcrits de *Tt-cpl* et double hybridation *in situ* de *Tt-cysB* et de *Tt-cpl*.

La localisation tissulaire du transcrite de *Tt-cpl* (A et B) a révélé que son gène est exprimé dans le même type cellulaire que celui de *Tt-cysB*, c'est-à-dire les grands coélomocytes (C) (Cc: Cavité coelomique; Cn: Chaîne nerveuse; M: Muscle). Un contrôle négatif est obtenu par hybridation de la sonde sens sur une coupe d'animal immunostimulé (C). L'absence de marquage confirme la spécificité de la sonde utilisée.

Des études de double Hybridation *in situ* (D et E) ont utilisé une sonde marquée à la digoxigénine spécifique du transcrite de *Tt-cpl* et une sonde radiomarquée au ^{35}S spécifique du transcrite de *Tt-cysB*. Elles ont confirmé que les deux transcrits sont présents dans les mêmes cellules. Les intensités de marquage entre les deux sondes sont relatives car elles dépendent directement de leur compétition au sein de chaque cellule, liée à la technique utilisée.

(Les barres d'échelle correspondent en A, B et D à 200 μm ; en C et E à 100 μm).

des sondes *Tt-cysB* et *Tt-cpl*. Pour cela, la sonde radiomarquée utilisée est spécifique du transcrit de *Tt-cysB* et la sonde marquée à la Digoxigénine est spécifique du transcrit de *Tt-cpl*. Cette double hybridation (figure 34, D et E page 122) permet de constater que les deux transcrits sont présents dans le même type cellulaire et surtout dans les mêmes cellules. La colocalisation des deux gènes exprimés laisse penser que les deux peptides seront présents dans les mêmes grands cœlomocytes.

Même si nous ne connaissons pas les compartiments intracellulaires dans lesquels sont distribuées les deux molécules, ces expériences suggèrent que l'enzyme et l'inhibiteur sont présents tous les deux spécifiquement dans les grands cœlomocytes.

Ces études de localisation apportent des informations intéressantes sur les expressions spécifiques de ces gènes dans un type exclusif de cellules coelomiques circulantes. Toutefois, comme cela est le cas chez les vertébrés, nous ne sommes pas sûrs que *Tt-CPL* soit la cible préférentielle de *Tt-CYSB*. C'est pourquoi, nous avons entrepris une démarche expérimentale en PCR avec des amorces dégénérées dans le but d'identifier d'autres cathepsines chez la sangsue.

2.3- Clonage moléculaire des cathepsines B et Z (*Tt-cpb* et *Tt-cpz*)

Nous avons vu que *Tt-CPL* est bien conservée sur le plan phylogénétique. Les homologies entre espèces sont importantes. En revanche, la comparaison chez l'homme des séquences de plusieurs cathepsines identifiées a montré que seuls quelques acides aminés sont conservés avec entre autre un motif de trois acides aminés vers l'extrémité carboxy-terminale. La caractérisation d'autres types de cathepsines chez la sangsue s'est donc appuyée sur l'utilisation d'une amorce dégénérée dessinée à partir de ce motif.

Une amplification par PCR a été réalisée avec l'oligonucléotide dégénéré et deux amorces du vecteur de la banque (5' Fw vecteur 1 et 5' Fw vecteur 2).

La PCR a montré un profil d'amplification composé de plusieurs bandes de taille variable. Le clonage et le séquençage des produits d'amplification ont mené à la caractérisation de deux fragments qui ont révélé des homologies de séquences avec les cathepsines Z et B de vertébrés. Les séquences des ADNc partiels sont présentées sur la figure 35 page 124. Le fragment de cathepsine Z est long de 318 paires de base et celui de la cathepsine B de 197 paires de base. Le séquençage d'environ 10 clones bactériens, après transformation de l'amplifiat ligué, n'a pas permis d'isoler d'autres types de cathepsines.

Des expériences supplémentaires ont consisté à amplifier les extrémités 5' et 3' des ADNc des cathepsines B et Z à l'aide d'amorces homologues (cathepsine Z Fw1, Fw2, Rv1, Rv2 et cathepsine B Fw1, Fw2, Rv1, Rv2). Pour cela, les PCR ont utilisé comme matrice les ADNc de la banque de sangsue. Les produits amplifiés se sont révélés tous de petite taille et correspondent après clonage et séquençage à des fragments d'ADNc de cathepsine B et Z déjà obtenus dans le clonage partiel. Cela peut s'expliquer par la présence majoritaire dans la banque d'ADNc de fragments de petite taille pour ces deux molécules. Une approche par 3' RACE-PCR sur une population d'ARN totaux n'a pas non plus permis d'allonger les fragments déjà obtenus. Cette caractérisation devra faire l'objet de travaux supplémentaires basés probablement sur de nouvelles amorces internes et homologues.

Par conséquent, l'amplification par PCR utilisant une amorce consensus spécifique d'un motif conservé de trois acides aminés a permis le clonage moléculaire partiel des ADNc de *Tt-cpz* et *Tt-cpb*. Il sera par ailleurs nécessaire de poursuivre ce clonage afin d'obtenir les ADNc complets. Cela permettra d'utiliser ces ADNc comme matrices pour la synthèse de sondes dans des expériences de localisation d'expression par Hybridation *in situ*.

Discussion

Les études présentées dans ce travail de thèse ont contribué par des approches comparatives inédites chez *T. tessulatum* à mettre en évidence de nouveaux effecteurs de l'immunité innée. Les analyses moléculaires et biochimiques ont mis en lumière des molécules répondant à l'infection bactérienne par l'induction de leur gène et/ou par leur libération au sein du liquide coelomique.

La nature de ce chapitre est de discuter l'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de l'immunité innée comparée, mais aussi des limites de notre modèle animal, ainsi que de nouvelles approches expérimentales que nous pourrions mettre en œuvre.

I- Choix des tissus étudiés, des stades de développement et des stimulations expérimentales pour les approches différentielles.

Lors de notre approche biochimique, dans la perspective de mettre en évidence la modulation de peptides au cours de la réponse immune, nous devons d'abord présumer les tissus impliqués dans cette réponse chez notre modèle.

Les Annélides sont généralement présentés comme le premier phylum coelomate. Cependant parmi ces derniers il est important de distinguer les phylums à grand coelome comme les Annélides ou les Vertébrés associé à un système cardiovasculaire fermé, et d'autres comme les Arthropodes ou les Mollusques où le coelome est très réduit et associé à un système cardiovasculaire ouvert et à l'hémocoèle [Chapron, 1999]. Chez les Hirudinées, les cavités coelomiques sont généralement oblitérées par un tissu à fonction excrétrice, le tissu botryoïdal. La particularité de notre modèle *T. tessulatum* parmi les hirudinées est d'être constitué d'un coelome dépourvu de tissu botryoïdal, mais rempli de liquide renfermant des molécules et des cellules circulantes et/ou adhérentes aux parois, appelées coelomocytes. La démonstration d'un rôle défensif des coelomocytes a été faite chez différents embranchements d'Invertébrés y compris les Annélides, où leurs facultés de phagocytose, de synthèse de molécules de reconnaissance, opsonisantes, antimicrobiennes ou lytiques ont été mises en évidence [Cooper *et al.*, 2002].

Le choix d'analyser par des techniques biochimiques le liquide coelomique était alors justifié chez la sangsue *Theromyzon tessulatum*. Cela est d'autant plus vrai que le prélèvement du liquide coelomique chez *T. tessulatum* est techniquement rapide et facile à réaliser au stade 3D (figure 8 page 36). A l'inverse, des limites techniques s'opposent à l'analyse des molécules en voie d'être sécrétées ou non sécrétées, contenues dans les cellules coelomiques.

En effet, pour des raisons liées à la faible quantité de coelomocytes circulants prélevés avec le liquide coelomique, il n'était pas possible d'étudier le contenu peptidique de ces cellules avec les outils biochimiques disponibles à cette date. Bon nombre de coelomocytes adhèrent à la paroi de la cavité coelomique. Ils ne sont donc pas prélevés avec le liquide. Le développement futur de cultures primaires, voire l'établissement de lignées cellulaires de coelomocytes circulants et/ou adhérents prendrait ici tout son sens, comme cela a été démontré chez d'autres modèles invertébrés [Cooper *et al.*, 2002; Weiske & Wiesner, 1999].

Les travaux de thèse d'A. Tasiemski ont mené à la caractérisation de deux peptides à activité antimicrobienne *in vitro*, la théromacine et la théromyzine [Tasiemski, 2001; Tasiemski *et al.*, 2002]. Ces peptides sont libérés dans le liquide coelomique à la suite d'une stimulation microbienne de l'animal par des cellules à gros granules lipidiques, appelées cellules graisseuses [Tasiemski *et al.*, 2002]. Bien qu'elles soient pour partie au contact du coelome, elles sont également présentes dans le mésenchyme environnant. D'autres travaux dans notre laboratoire ont également montré la présence de théromacine dans le mucus sécrété par l'animal. Cette présence de peptides antimicrobiens dans les sécrétions de divers épithélia a pu être mise en évidence aussi bien chez les invertébrés que chez les vertébrés et semble participer aux premières barrières de défense contre l'environnement extérieur à l'organisme [Brogden *et al.*, 1998; Diamond *et al.*, 1996; Ferrandon *et al.*, 1998; Tzou *et al.*, 2000]. D'autres sécrétions ou tissus que le liquide coelomique devraient s'avérer intéressants à étudier dans le cadre de molécules peptidiques produites au cours de la réponse immune. Hormis ce dernier ou le mucus, l'obtention de tissus particuliers (comme les cellules graisseuses) par dissection est cependant difficile à envisager pour de telles études biochimiques.

En ce qui concerne l'analyse transcriptomique par DDRT-PCR, la recherche de gènes dont l'expression est modulée par une infection expérimentale n'a pu se faire spécifiquement au niveau des coelomocytes en raison d'un nombre d'animaux insuffisant au stade 3D, pourtant riches en liquide coelomique et ayant complètement digéré leur repas de sang. Par ailleurs, nous ne pouvions présumer une modulation de l'expression génique que dans ces seuls coelomocytes. La localisation et la modulation d'expression de la théromacine et de la théromyzine en sont les meilleures preuves. C'est pourquoi nous avons entrepris notre approche en DDRT-PCR sur des ARN totaux d'animaux de stade 2 à jeun. En outre, ces ARN totaux sont extraits à partir d'animaux entiers. La découverte de *Tt-cysb*, qui est exprimé et modulé spécifiquement dans les grands coelomocytes (figure 31 page 117), valide à elle seule

notre approche expérimentale sur l'animal entier. La technique employée s'avère suffisamment sensible pour détecter une expression différentielle d'ARNm dans une population cellulaire numériquement minoritaire dans l'organisme. Les transcrits mis en évidence par cette approche peuvent constituer autant de marqueurs qui amèneront à la caractérisation progressive des cellules impliquées dans les mécanismes de défense chez *T. tessulatum*.

La grande sensibilité de la PCR, nous permet d'envisager dans l'avenir une même approche sur la population de cœlomocytes prélevés avec le liquide coelomique. Par ailleurs, il est envisageable d'accéder de manière spécifique à d'autres tissus ou cellules difficiles d'accès comme les cellules graisseuses, grâce à la technique de Microdissection Laser. Cette technique a déjà fait l'objet avec succès, d'applications en association avec la RT-PCR chez les Mammifères [Lehmann & Kreipe, 2001]. Des essais concluants, portant sur le prélèvement de cellules à partir de coupes histologiques paraffinées de *T. tessulatum*, ont montré la pertinence d'une telle approche dans un avenir proche. Il sera néanmoins nécessaire de privilégier la qualité et la quantité des ARN totaux recueillis.

Dans l'approche biochimique, l'étude des peptides libérés dans le liquide coelomique nécessite dans un premier temps de recueillir un volume important de liquide. Ceci est lié à des raisons techniques dans la purification biochimique. Or, la petite taille des individus de stade 0 et de stade 1 ne permet pas le prélèvement du liquide coelomique. En revanche, cela est réalisable chez les stades 2 et 3. La croissance après le troisième repas de sang de l'animal est telle que le volume coelomique du stade 3 de *T. tessulatum* se prête parfaitement aux conditions requises. Les changements considérables de la balance hydrique occasionnés par ce dernier repas provoquent une augmentation du volume coelomique [Malecha, 1979, 1983]. Il n'est pas prouvé que les peptides recherchés dans le liquide coelomique sont plus nombreux après le troisième repas. En revanche, il est plus aisé techniquement de prélever un grand volume de liquide coelomique au stade 3 plutôt qu'un très petit volume de liquide coelomique au stade 2 même si les quantités finales de peptides prépurifiés sont environ les mêmes. Par ailleurs, le prélèvement de volumes plus importants permet de réduire considérablement les variations de volume de récolte du liquide entre les animaux et donc entre les différents lots expérimentaux comparés.

A l'inverse de l'analyse biochimique, la recherche de gènes modulés par une infection bactérienne est réalisée sur des animaux entiers. Le stade 0 est constitué de jeunes individus

encore fixés à la mère. Cette dépendance ne permet pas de les utiliser pour une telle analyse. Le stade 1 est composé de sangsues libres mais encore très petites. Il serait donc nécessaire de sacrifier un nombre important d'individus pour obtenir un pool raisonnable d'ARN totaux nécessaire à toute l'étude. En revanche, le stade 2 s'y prête très favorablement car les animaux sont de taille suffisante. De plus, il est possible de laisser les individus digérer complètement le sang ingéré au deuxième repas. Ceci limite considérablement le risque de contamination des échantillons par les acides nucléiques du sang de canard. Cela n'est pas réalisable avec des individus de stade 3. En effet, la fin de la digestion du dernier repas de sang arrive bien trop tard dans le développement de l'animal puisqu'il est déjà en période de reproduction. Cette fonction physiologique peut interférer avec des mécanismes de défense. Le taux de transcrite de la théromacine par exemple est plus important dans les animaux de stade 3 par rapport à ceux de stade 2, en absence d'immunostimulation [Tasiemski *et al.*, 2002]. Cette induction d'expression pourrait être une conséquence du troisième repas de sang et des mécanismes physiologiques déclenchés pour la reproduction. Cette activation pourrait être liée également aux changements importants de la balance hydrique intervenant au stade 3 [Malecha, 1979, 1983]. De nombreux processus interviennent donc au dernier stade du développement et semblent influencer sur la réponse immunitaire. Bien qu'ils soient tout à fait intéressants, ils compliquent toutefois l'analyse comparative entre animaux présumés témoins et animaux immunostimulés. En outre, la disponibilité des individus de stade 3 tardifs (ayant totalement digéré) dans l'élevage est très réduite car ceux-ci sont plutôt réservés à la reproduction et donc au renouvellement des animaux.

Par conséquent, les individus de stade 2 ont été choisis pour analyser les modulations d'expression génique induites par une infection bactérienne et ce en raison de leur grande disponibilité dans l'élevage et de leurs caractéristiques physiologiques évoquées précédemment.

Nous avons choisi au cours de notre approche différentielle biochimique d'utiliser les Lipopolysaccharides (LPS) pour la stimulation des animaux, plutôt que des bactéries vivantes ou tuées. Ce choix avait pour but de simplifier l'analyse des profils chromatographiques qui aurait pu être perturbée par la présence de pics attribuables en fait à de nombreuses molécules d'origine bactérienne. De plus, notre analyse n'était pas complétée par des tests d'activité biologique. Les molécules d'intérêt ont été uniquement sélectionnées sur leur profil

différentiel. Cette stimulation par des LPS présente néanmoins l'inconvénient d'être très artificielle par rapport à toute interaction avec des pathogènes naturels de l'animal. Bien que les profils montrent de nombreux pics qui n'ont pu être analysés avec les outils alors disponibles, nous pouvons émettre l'hypothèse que des stimulations avec un mélange de bactéries Gram + et Gram – mèneraient à une production plus grande et plus intense de peptides dans le coelome, comme cela a été réalisé chez la Drosophile [Uttenweiler-Joseph *et al.*, 1998].

C'est ce dernier type de stimulation que nous avons entrepris dans notre approche transcriptomique. Cette stimulation ne pose pas de problèmes lors de l'analyse puisque la technique employée est basée sur une synthèse d'ADNc par des oligonucléotides poly(T). Les bactéries ne possédant pas de queue polyA dans la structure de leurs ARNm, l'analyse ne peut révéler que des transcrits spécifiques de la sangsue.

Le choix des souches bactériennes a été déterminé par les données existant déjà sur des modèles de référence comme la drosophile [Lemaitre *et al.*, 1996]. Il serait intéressant de réaliser des stimulations avec différents pathogènes comme cela a déjà été réalisé chez d'autres invertébrés [De Gregorio *et al.*, 2001; Irving *et al.*, 2001]. La comparaison des profils d'amplification des transcrits de sangsue pour chaque pathogène injecté, tout comme la comparaison de profils chromatographiques dans une analyse biochimique, permettrait le cas échéant de mettre en évidence des molécules spécifiques de la réponse immune contre tel ou tel microorganisme.

A ce jour, nous n'avons aucune connaissance des pathogènes naturels de *T. tessulatum*. Deux microorganismes, *Aeromonas hydrophyla* et *Micrococcus nishinomiyaensis* ont pu être identifiés dans l'eau des étangs où nous prélevons *T. tessulatum*. Nous ne savons pas s'ils peuvent être pathogènes pour la sangsue. Par ailleurs, plusieurs espèces d'*Aeromonas*, pathogènes pour l'Homme comme *A. hydrophila*, vivent apparemment en endosymbiose dans le tractus digestif d'*Hirudo medicinalis* [Graf, 1999]. Il serait intéressant de découvrir s'il existe également des bactéries pathogènes, endosymbiotes dans l'appareil digestif de *T. tessulatum*. Une meilleure connaissance des microorganismes pathogènes ou non de notre modèle nous permettrait d'étudier plus précisément chez cette espèce les bases moléculaires de ses mécanismes de défense.

Une réflexion très importante concerne la durée des stimulations expérimentales. En effet, l'étude des peptides libérés dans le liquide coelomique a été réalisée 30 minutes et 1

heure après l'injection des LPS. Ceci est en accord avec des mouvements physiologiques de molécules même si l'on peut envisager des actions encore plus rapides. En revanche, l'étude portant sur l'analyse des ARNm peut faire l'objet de travaux complémentaires. Celle-ci a eu lieu 24 heures après la stimulation bactérienne. Il fut en effet décidé, au regard du nombre d'animaux disponibles, d'étudier les modulations d'expression des ARNm après un délai unique de 24 heures. Ce temps de stimulation nous a permis de mettre en évidence certains gènes dont l'expression est encore induite à 24 heures, notamment *Tt-cysB* (figures 30 et 31 pages 115 et 117). Cependant la disponibilité d'un plus grand nombre d'animaux nous permettra d'entreprendre une même démarche en y intégrant une véritable cinétique comme cela a été réalisé par d'autres auteurs [De Gregorio *et al.*, 2001; Irving *et al.*, 2001]. De telles études différentielles du transcriptome associées à une cinétique ont montré chez les invertébrés mais aussi chez les vertébrés, qu'il existait différentes catégories de gènes dont l'expression pouvait être transitoirement modulée, qui plus est précocement ou tardivement, au cours d'une réponse immunitaire [Huang *et al.*, 2001; Nau *et al.*, 2002]. L'emploi de la DDRT-PCR dans ce type d'approche basée sur une cinétique est tout à fait envisageable.

II- Les approches différentielles.

En ce qui concerne l'analyse biochimique, les comparaisons de chromatogrammes ont abouti à la détection de nombreux pics différentiels. Malheureusement, la caractérisation de la plupart n'a pu avoir lieu. Ce problème fut en partie expliqué par la faible quantité de matériel purifié. Ces études n'ont en effet pas pu utiliser un grand nombre d'animaux en raison de leur faible disponibilité dans l'élevage. En outre, les peptides d'intérêt purifiés ont été déposés sur le séquenceur amino-terminal LF 3000 (Beckman Coulter). Ce dernier requiert une quantité de matériel assez élevée qui est au moins de 10 pmol de peptide. La totalité des produits a donc été utilisée. Or, le déblocage amino-terminal, nécessitant des traitements enzymatiques, n'a pu se faire par manque de peptides. Ces études néanmoins prometteuses se sont donc heurtées à diverses limites techniques qui n'ont pas permis le séquençage de tous les candidats différentiels.

Il serait aujourd'hui plus facile de réaliser cette analyse. D'une part, le nouveau séquenceur utilisé au sein du laboratoire est plus sensible (PROCISE 492 cLC N-Ter, Applied Biosystem) et requiert 2 pmol de peptide. De plus, il autorise les traitements

enzymatiques nécessaires directement sur les membranes de polyfluorure de vinylidène (PVDF) utilisées pour la dégradation d'Edman [Smith, 2002]. D'autre part, l'accès facilité à une plateforme de spectrométrie de masse (Voyager-DE-STR, Applied Biosystems) dans le cadre de la Génopôle de Lille facilite sans conteste l'utilisation de cet outil puissant pour confirmer et caractériser en partie les pics différentiels observés en chromatographie [Uttenweiler-Joseph *et al.*, 1998]. Il serait alors possible de coupler les deux techniques afin de comparer les populations de peptides de plusieurs lots expérimentaux.

Pour notre approche transcriptomique le choix de la DDRT-PCR s'explique par plusieurs raisons.

Tout d'abord, l'absence d'outils moléculaires chez la sangsue nous a contraint à utiliser un *système d'analyse ouvert* [Green *et al.*, 2001]. Par opposition aux *systèmes fermés* utilisant déjà des informations de séquences connues (Puces à ADN, PCR quantitative ou semi quantitative par exemple), les analyses par *systèmes ouverts* ne requièrent pas de données initiales car elles sont fondées sur le séquençage aléatoire de microfragments comme la technique SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) [Suzuki *et al.*, 2000] ou sur l'amplification par PCR non spécifique des ADNc d'un échantillon (DDRT-PCR, RNA *Fingerprinting*) [Diachenko *et al.*, 1996; Matz & Lukyanov, 1998; McClelland *et al.*, 1995].

La DDRT-PCR présente ici des avantages par rapport aux autres *systèmes ouverts* [Ali *et al.*, 2001; Matz & Lukyanov, 1998]. D'une part, elle est préférable à la technique SAGE car cette dernière génère des étiquettes de 14 pb en très grand nombre qui nécessitent une analyse bioinformatique ultérieure assez lourde. De plus ces courts fragments rendent très difficile le clonage ultérieur des ADNc complets correspondants. D'autre part, la DDRT-PCR a été préférée à la construction de banques soustractives d'ADNc. Celles-ci reposent sur une démarche relativement longue, qui nécessite plus d'ARN que la DDRT-PCR, et qui ne permet pas de réaliser plusieurs conditions expérimentales. Par ailleurs, cette technique a déjà été employée avec succès chez d'autres organismes invertébrés dans le cadre d'études de la réponse immunitaire ou de relations hôte-parasite [Asling *et al.*, 1995; Coppin *et al.*, 2002; Dimopoulos *et al.*, 1996; Dushay *et al.*, 1996; Montagnani *et al.*, 2001; Schneider & Zelck, 2001].

Notre analyse transcriptomique fondée sur la technique de *Differential Display* RT-PCR a mis en évidence de nombreuses modulations, bien que 72 combinaisons d'amorces H-AP/HT11M aient seulement été utilisées sur les 240 disponibles avec le système Genhunter. La plus grande partie du travail réside cependant dans l'excision, la réamplification, le clonage, le séquençage et le contrôle de la modulation des candidats [Matz & Lukyanov, 1998]. Il est nécessaire d'adopter un protocole standardisé pour tous les produits d'intérêt.

Notre démarche a consisté dans un premier temps à sélectionner uniquement les candidats de plus de 300 pb, ce qui représente une longueur moyenne pour les séquences 3' non traduites chez les invertébrés [Mignone *et al.*, 2002]. En effet, comme la DDRT-PCR génère des produits d'amplification de la partie 3' des ARNm, le plus souvent ces produits ne contiennent aucune séquence du cadre de lecture. L'absence de banques de données pour *T. tessulatum* et en général pour les hirudinées nous interdit toute comparaison de séquence nucléotidique. L'alternative est d'identifier nos candidats par homologie à des protéines d'autres organismes. Les banques de protéines, d'ADNc ou d'EST de vertébrés ou les projets de séquençage récemment terminés pour des modèles tels que *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans* [Adams *et al.*, 2000; Chalfie, 1998; Consortium, 1998] permettent de telles comparaisons. Il est évident qu'un certain nombre de candidats différentiels en deçà de 300 pb ne sont pas pris en compte et pourraient correspondre à des gènes importants dont l'expression est modulée au cours de la réponse immune. Dans l'avenir, il pourrait être envisagé de prendre en compte les candidats de petite taille, dans la mesure où notre approche reposerait sur une analyse cinétique. En effet, nous pourrions nous intéresser de préférence aux bandes différentielles sur plusieurs points de la cinétique. Cette dernière aurait l'avantage de diminuer le problème des faux positifs.

Dans un deuxième temps, nous avons entrepris d'éliminer les candidats « faux positifs » inhérents à la technique de DDRT-PCR. Pour ce faire nous avons décidé d'adapter à notre modèle l'emploi de Biopuces à ADN. Cette technique, ainsi que la PCR en temps réel, semblent être ces dernières années des outils de choix dans la validation des candidats issus d'expériences de DDRT-PCR [Rajeevan *et al.*, 2001]. Sur les 62 bandes excisées et réamplifiées, dans l'approche DDRT-PCR classique et les 17 dans l'approche DDRT-PCR ciblée, 11 candidats ont pu être validés par les expériences de Biopuces à ADN avec les corrections successives de Bonferroni (tableaux 8 et 9 pages 102 et 107). Les résultats obtenus pour les contrôles positifs comme la théromacine ou la théromyzine, ainsi que d'autres contrôles par des expériences de Northern-Blot et de comptage en Hybridation *in situ* (figures

30 et 31 pages 115 et 117) démontrent la validité de cette approche par Biopuces. Il est ainsi tout à fait envisageable de compenser le grand nombre de faux positifs générés par la DDRT-PCR par l'utilisation en aval des Biopuces à ADN capables de cribler un grand nombre de candidats. Il est toutefois important de relativiser ce taux de faux positifs. En effet, l'analyse statistique réalisée à l'issue des expériences de Biopuces à ADN élimine dans un premier temps environ la moitié des candidats. Toutes les valeurs chiffrées, inférieures à trois fois la valeur moyenne du bruit de fond, sont écartées de l'analyse. Les produits, dont l'ARNm est très minoritaire, ne sont donc pas traités. Or, il est probable qu'ils contiennent de vraies modulations. Celles-ci ne peuvent donc être prises en compte. Par conséquent, l'élaboration de Biopuces à ADN est une approche rapide et adaptée au criblage d'un très grand nombre de candidats mais ne permet pas un calcul sérieux du taux de faux positifs générés par la DDRT-PCR.

Par ailleurs, cette mise au point de Biopuces à ADN sur notre modèle ouvre de nombreuses perspectives en transcriptomique dans la mesure où sera entrepris prochainement le séquençage à haut débit d'ADNc, d'EST voire de génomes d'hirudinées.

L'approche en DDRT-PCR ciblée sur les récepteurs à 7 domaines membranaires que nous avons parallèlement entrepris ne nous a pas permis de mettre en évidence la modulation de tels récepteurs dans nos conditions expérimentales. Par ailleurs, nous avons séquencé plusieurs bandes qui n'étaient pas différentielles. Aucune de ces séquences ne présentait d'homologie significative à un récepteur 7TM. Il semble donc que les oligonucléotides dessinés pour l'approche *in silico* de Lopez et col. ne soient pas spécifiques dans nos conditions expérimentales *in vitro* [Lopez-Nieto & Nigam, 1996]. Néanmoins, une telle approche en DDRT-PCR ciblée sur notre modèle reste très intéressante à entreprendre comme cela a déjà été fait par certains auteurs pour la superfamille des petites protéines G [Liu *et al.*, 1999], les récepteurs à tyrosine kinase [Miettinen *et al.*, 2001], ou des domaines conservés dans les récepteurs nucléaires [Ishaq *et al.*, 1998]. Des techniques particulières ont été développées dans ce sens afin d'étudier les modulations transcriptionnelles d'une famille choisie de gènes. Une méthode consiste à combiner la technique de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) avec une version ciblée de *mRNA Differential Display* [Fischer *et al.*, 1995].

En ce qui nous concerne, les applications les plus intéressantes restent celles qui ont été employées pour mettre en évidence la modulation d'ARNm de cytokines, proto-oncogènes

et facteurs de transcription, qui possèdent dans leur région 3' non traduite des séquences consensus de type AUUUA [Dominguez *et al.*, 1998].

Cette approche élégante consisterait à détecter des gènes modulés codant des molécules impliquées dans l'initiation de la transcription et/ou de la traduction. Un exemple très intéressant est représenté par l'étude ciblée des facteurs de transcription. Les ARNm de tels facteurs possèdent dans leur extrémité 3' non traduite de séquences riches en domaines AU [Dominguez *et al.*, 1998; Utans-Schneitz *et al.*, 1998]. La confection d'amorces oligonucléotidiques spécifiques de ces domaines permettrait de rechercher des gènes de facteur de transcription modulés après une infection bactérienne. Il est probable que ce type de protéines soit spécifique d'un mécanisme moléculaire et non d'une famille de molécules. En d'autres termes, ce facteur de transcription serait un activateur spécifique des gènes impliqués dans le même processus. La recherche des acteurs impliqués dans un processus biologique serait donc d'isoler le facteur spécifique qui participe à l'initiation de la transcription de leur gène et ensuite de l'utiliser pour purifier les complexes facteur-ADN. Cela pourrait être réalisé à l'aide de la technique SNAAP (Specific Nucleic Acids Associated with Proteins) qui utilise sur la protéine de liaison à l'ADN une protéine de fusion GST (Glutathione-S-transferase), permettant son marquage [Trifillis *et al.*, 1999]. Après avoir incubé cette protéine de liaison marquée avec la population totale d'ADN, les complexes protéines-ADN spécifiques sont isolés sur colonne d'affinité glutathion-sépharose.

Cette approche différentielle ciblée sur les facteurs de transcription est alors une méthode élégante pour déterminer les différents gènes impliqués dans une même fonction biologique. On pourrait imaginer que l'induction transcriptionnelle observée chez la sangsue pour le gène codant la protéine de liaison à la queue poly(A) (PABP1) puisse déboucher sur ce type de purification. Les PABP sont des protéines qui sont connues pour initier la synthèse de protéines spécifiques. L'utilisation d'un tel protocole permettrait l'isolement des complexes PABP1-ARNm spécifiques et aboutirait à la mise en évidence de nouvelles molécules de l'immunité.

Par conséquent, des analyses comparatives ciblées sur les bouleversements transcriptionnels de familles de gènes sont envisageables. Il sera bien évidemment nécessaire de faire un choix judicieux concernant la ou les familles étudiées afin de maintenir un regard large sur les molécules recherchées.

III- Les peptides P7 et P9

La discussion portant sur les limites techniques a permis d'expliquer en partie l'impossibilité de caractériser les peptides correspondant aux pics différentiels. Concernant les deux peptides séquencés, P7 et P9, les comparaisons aux banques de données n'ont pas débouché sur un alignement avec des molécules déjà connues. En revanche, il est possible d'examiner les alignements et de discuter de quelques motifs composant le fragment de séquence connu pour le peptide P7 et la séquence complète du peptide P9.

Concernant le peptide P7, les molécules présentant une homologie après comparaison ne correspondent pas à la masse du P7 qui est de 12558 Da. En outre, les régions d'alignement ne correspondent pas à l'extrémité amino-terminale du peptide mature. Il est donc très difficile d'apparenter le peptide P7 à une famille de molécules.

Il est tout d'abord nécessaire de terminer la caractérisation moléculaire afin de pouvoir comparer dans les banques la séquence entière de la molécule. Ensuite, la séquence en acides aminés déduite permettra de faire synthétiser un ou plusieurs anticorps dirigés contre la région la plus immunogène. Les études immunocytochimiques qui en découleraient seraient un moyen de localiser le peptide au cours du temps. La modulation dans le liquide coelomique pourrait être mieux comprise ainsi que l'origine cellulaire du peptide s'il s'agit d'une libération. Le signal différentiel de cette molécule présenté après infection expérimentale devra donc faire l'objet de complément d'études. Au niveau transcriptionnel également, des études d'hybridation *in situ* seraient très utiles pour déterminer le ou les types cellulaires exprimant le gène codant le peptide P7. L'apport récent au laboratoire de la PCR en temps réel sera, lui aussi, un moyen intéressant pour étudier les modulations d'expression de ce dernier.

En ce qui concerne le peptide P9, il fut baptisé théromyzine en raison de la détection d'une activité antibactérienne. Les tests réalisés par le Dr. A. Tasiemski ont révélé que ce peptide est dirigé particulièrement vers les bactéries de type Gram+ et agirait sous forme de bactériostatisme. Le calcul de son point isoélectrique montre qu'il s'agit d'un peptide antibactérien anionique. Cela peut supposer une présence préférentielle active dans des tissus épithéliaux ou des sécrétions exposées à l'environnement extérieur [Brogden *et al.*, 1998; Schitteck *et al.*, 2001]. En outre, cette activité dirigée contre les bactéries Gram+ soulève de

nombreuses questions. Nous pouvons notamment nous interroger sur sa modulation observée après une injection de LPS (motif caractéristique des bactéries Gram-). Si l'activité spécifique est avérée, cela suggère que la reconnaissance d'un motif particulier peut déclencher des processus menant à une réponse plus large. Il serait donc intéressant de réaliser cette analyse après différentes infections afin de comparer les réponses moléculaires engendrées.

Une étude plus approfondie de sa séquence révèle une région riche en histidine et en acide aspartique formant ainsi un motif HDXXH. Des travaux antérieurs montrent que ce motif semble capable de lier des métaux comme le zinc [Omburo *et al.*, 1998]. Or, il apparaît tout à fait intéressant de relier cette observation à des études concernant l'activation de peptides antimicrobiens par des métaux. Ces peptides présentent un motif HEXXH, très proche de celui de la théromyzine, qui lie le zinc. Cette interaction semble avoir un rôle fondamental dans l'induction de l'activité antimicrobienne [Melino *et al.*, 1999; Sohnle *et al.*, 2000].

Les travaux exposés dans ce manuscrit présument une présence différentielle dans le liquide coelomique d'animaux immunostimulés par rapport à des animaux témoins. Ce travail a permis également de caractériser l'ADNc complet de ce peptide. Cette séquence complète sera très utile dans l'élaboration d'anticorps spécifiques afin de vérifier le déplacement physiologique de la molécule après injection de LPS.

Les expériences de Biopuces à ADN ont permis de démontrer l'induction du gène de la théromyzine à la suite de l'infection bactérienne expérimentale. Ces travaux ont confirmé les premières études de localisation d'expression de ce gène montrant une augmentation du taux de transcrits dans des animaux infectés. En outre, ces études ont montré que le gène est spécifiquement exprimé dans les cellules graisseuses.

Face à ces résultats issus de deux approches différentes (recherche de peptides à activité antimicrobienne effectuée par le Dr. A. Tasiemski et approche différentielle comparative présentée dans ce manuscrit), ce peptide semble présenter des caractéristiques intéressantes à la fois par sa localisation, par ses propriétés anioniques et par son motif putatif de liaison au métaux. Il fera, pour cela, l'objet de travaux complémentaires au sein du laboratoire concernant notamment l'induction et les caractéristiques spécifiques de son activité antimicrobienne.

IV- Les gènes dont l'expression est modulée après une infection expérimentale

La présente étude montre quelques modulations transcriptionnelles et/ou post-transcriptionnelles induites à la suite de l'infection expérimentale. Les gènes mis en lumière sont très divers et leur implication dans des phénomènes immunitaires n'est pas toujours étayée par des travaux de fond publiés antérieurement. L'analyse statistique effectuée après le contrôle par Biopuces à ADN montre donc des candidats (tableau 9 page 107) qui nous amènent à autant de points de discussion.

1- Le gène de la thréonine désaminase

Cette enzyme étudiée depuis longtemps grâce aux travaux de Changeux [Sanchez & Changeux, 1966] est connue pour transformer la thréonine en 2-cétobutyrate. Cette voie mène à la biosynthèse d'isoleucine qui exerce ensuite un rétrocontrôle inhibiteur sur l'enzyme. Certains travaux font état de l'induction d'expression du gène de la thréonine désaminase à la suite de stimulations. Chez la pomme de terre, ce gène est induit après une blessure ou par le jasmonate de méthyle [Hildmann *et al.*, 1992]. Chez la tomate, il est également induit par des stimulations au jasmonate de méthyle ou par blessure directe [Samach *et al.*, 1995; Samach *et al.*, 1991]. Le jasmonate de méthyle est un composé volatile produit par le végétal après blessure (blessure de la fleur par exemple par un insecte) qui peut avoir un effet informateur sur le développement et les défenses de l'organisme [Feys & Parker, 2000; Thomma *et al.*, 1999]. Il est assimilé à une molécule de signalisation chez les végétaux et induit des mécanismes de résistance. C'est pourquoi, il est utilisé très souvent comme agent stimulateur expérimental. Or, l'induction spécifique du gène de la thréonine désaminase par le jasmonate de méthyle chez les végétaux semble aller de paire avec l'induction observée chez la sangsue après infection expérimentale. Il apparaît donc tout à fait intéressant de poursuivre l'étude d'un tel candidat afin de déterminer son rôle dans l'immunité innée [Schaller & Frasson, 2001]. On peut dès maintenant penser que la voie de biosynthèse des acides aminés et notamment ici de l'isoleucine interviendrait de près ou de loin dans des mécanismes de défense innés. Les parallèles entre les plantes et les animaux sont donc dans l'immunité très intéressants [Zasloff, 2002]. Certaines familles de molécules ont déjà montré une grande

homologie entre les règnes, notamment les protéines à domaine LRR [Warren *et al.*, 1998; Whitham *et al.*, 1994; Young, 2000].

2- Le clone 24.1

Ce candidat révélé par l'analyse statistique n'a pas été identifié lors de son séquençage. Néanmoins, sa position privilégiée dans la liste le rend tout à fait intéressant. En outre, sa faible homologie avec les molécules connues suppose qu'il ne s'agit pas de gènes appartenant à une famille ubiquitaire de molécules. Ce candidat a fait, aussitôt après sa mise en évidence, l'objet d'une caractérisation plus complète de son ADNc. Les résultats ont permis d'obtenir un fragment supplémentaire de l'extrémité 5'. En revanche, il n'a pas été possible de l'identifier. Cette faible homologie avec les molécules constituant les différentes banques peut être expliquée par sa faible conservation sur le plan phylogénétique ou même son absence de conservation comme cela est le cas pour les différents peptides antimicrobiens de notre modèle. Des études complémentaires sont néanmoins envisagées et porteraient sur la caractérisation complète et la localisation de son transcrit.

3- Les gènes de l'actine et de l' α -tubuline

Lors de la préparation de l'approche par Biopuces à ADN, il nous est apparu intéressant de pouvoir déposer des contrôles positifs et des contrôles négatifs. Les contrôles positifs correspondent aux deux peptides antibactériens isolés à ce jour chez la sangsue que sont la théromacine et la théromyzine.

L'utilisation d'un contrôle négatif a requis le clonage complet d'un gène d'actine. Sa comparaison aux banques de données lui confère 83 % d'identité avec l'ARNm de l'actine IIb de la méduse *Podocoryne carnea* [Aerne *et al.*, 1993]. Ce transcrit complet, dont la taille fut vérifiée par Northern Blot (figure 27 page 104), a donc été déposé sur les lames. En revanche, il s'est avéré modulé après l'infection bactérienne.

Il est important de remarquer ici que le candidat 2.1 de DDRT-PCR fut également identifié à une actine. Il possède 88% d'identité avec l'actine 2 de l'huître *Crassostrea gigas* (miyamoto *et al.*, Annexe 2 page 183). Toutefois, celui-ci n'est pas sélectionné par le programme statistique. La comparaison des deux ADNc d'actine de sangsue montre qu'il s'agit de deux transcrits différents. Ils ne possèdent qu'une région homologue de 85

nucléotides correspondant au début de leur région 3' non codante. Une forme particulière d'actine est donc modulée par l'infection alors que l'autre ne le serait pas.

Il est intéressant d'associer à cette modulation de l'actine 1 de sangsue, celle détectée pour le candidat apparenté au gène de l' α -tubuline. En effet, l'actine et l' α -tubuline sont des protéines structurales déjà connues pour être modulées dans un contexte de réponse immunitaire [Fessler *et al.*, 2002]. L'induction de leurs gènes chez la sangsue peut signifier plusieurs choses sur le plan immunitaire. Il est possible de présumer un recrutement des cellules immunitaires au sein de l'organisme. La réorganisation du cytosquelette de certaines cellules peut suggérer une augmentation ou une diminution de la mobilité cellulaire [Fessler *et al.*, 2002]. Cette mobilité varie certainement au cours du temps avec chronologiquement un recrutement cellulaire qui la favorise et une concentration prolongée sur le site d'infection qui nécessite sa réduction.

La réorganisation du cytosquelette peut intervenir lors de prolifération ou de différenciation des cellules impliquées dans la réponse immunitaire. Les processus cellulaires de l'immunité font régulièrement appel à des phénomènes de ce type. Les modulations d'expression des gènes de l'actine et de l' α -tubuline peuvent donc s'intégrer logiquement dans un processus immunitaire et notamment dans les phénomènes de phagocytose [Ramet *et al.*, 2002].

Cette observation pourrait susciter des études ultérieures sur la localisation cellulaire de ces modulations transcriptionnelles. Comme les autres gènes régulés, il est en effet inévitable de déterminer les cellules concernées par ces bouleversements génétiques. Connaissant le caractère ubiquitaire des gènes codant les protéines du cytosquelette, il est d'autant plus nécessaire de localiser les variations d'expression des gènes de l'actine et de l' α -tubuline que celles-ci peuvent impliquer des augmentations et des diminutions locales de l'expression. L'observation globale à partir de l'animal entier nous livre une information provenant de l'ensemble de l'organisme. Il sera donc indispensable de préciser les différentes populations cellulaires concernées par cette probable réorganisation morphologique.

4- Le gène de la malate déshydrogénase

La malate déshydrogénase (MDH) catalyse l'interconversion (réaction équilibrée) du malate et de l'oxaloacétate liée à l'oxydoréduction du couple NAD/NADH. La MDH se trouve

dans toutes les cellules. Elle joue un rôle fondamental dans la gluconéogenèse, voie menant à la synthèse de glucose à partir des acides aminés.

Dans les hépatocytes par exemple, de nombreuses voies métaboliques de la mitochondrie transforment les acides aminés en malate. La forme mitochondriale de la MDH y participe en réduisant l'oxaloacétate en malate. Cette enzyme empêche le déroulement du cycle de KREBS et favorise l'accumulation du malate dans la matrice de la mitochondrie. Ensuite, le malate ressort des mitochondries en grande quantité et la MDH cytoplasmique fonctionne alors dans le sens inverse de la forme mitochondriale puisqu'elle oxyde le malate en oxaloacétate. Ce composé est directement impliqué dans la synthèse de glucose.

La malate déshydrogénase est donc impliquée dans un phénomène hyperglycémiant qui tend à remettre en circulation dans le sang une quantité de glucose libre afin de suffire aux besoins énergétiques des cellules de l'organisme.

Des études réalisées sur des monocytes et des macrophages humains ont montré par des approches comparatives que le gène codant la malate déshydrogénase est induit après une stimulation par des LPS [Hashimoto *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2000]. Ce contexte d'induction est comparable à celui observé chez la sangsue après une infection bactérienne. Connaissant la fonction de cette enzyme, il est vraisemblable que l'activation de son gène participe à l'initiation de la gluconéogenèse. Cela pourrait s'expliquer par le besoin énergétique de cellules agissant dans des mécanismes de défense après l'infection expérimentale. Il serait bien évidemment utile de le démontrer entre autre par la localisation cellulaire de cette induction puis par l'étude de la régulation de quelques autres effecteurs principaux intervenant dans les voies métaboliques de la gluconéogenèse.

5- Le gène de la cystatine B

Ce candidat fera l'objet d'une discussion particulière dans la suite du chapitre.

6- Le gène de la protéine de liaison au polyadénylate 1 (PABP 1)

Les protéines de liaison à la queue poly(A) des ARNm (PABP) se fixent à l'extrémité 3' non codante de la plupart des ARNm eucaryotiques. Ils sont présumés jouer un rôle dans la stabilité de ces ARN [Bernstein *et al.*, 1989] et dans le contrôle de leur traduction [Sachs &

Deardorff, 1992; Sachs *et al.*, 1997]. Ces travaux montrent entre autre que les protéines de liaison à la queue poly(A) participent à l'initiation de la traduction d'ARNm spécifiques dans un contexte physiologique particulier [Wormington *et al.*, 1996].

Par exemple, le gène d'une protéine de cette famille a été détecté dans une banque d'ADNc de lymphocytes T humains [Yang *et al.*, 1995]. Les études ont montré une induction de son expression après une stimulation notamment par l'acétate de myristate et l'ionomycine, utilisés couramment pour activer les lymphocytes T [Krasnow *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1997].

L'induction du gène d'une protéine de liaison à la queue poly(A) chez la sangsue (apparentée à PABP1) laisse penser que cette protéine jouerait un rôle dans la stabilité et/ou l'initiation de la traduction d'autres ARNm. On peut alors émettre l'hypothèse que ces derniers sont impliqués activement dans la réponse immunitaire de notre modèle. Ainsi, le profil d'expression de la famille des gènes codant les PABP peut alors représenter un outil dans l'étude de l'immunité chez la sangsue. A travers la mise en évidence de PABPs spécifiquement induites dans un contexte immunitaire, il serait en effet possible de rechercher les ARNm divers sur lesquels elles seraient liées. Tel que nous l'avons déjà abordé dans la discussion consacrée aux analyses ciblées, cet isolement des complexes ARNm-PABP permettrait la mise en évidence des différents transcrits impliqués dans la réponse face à l'infection bactérienne [Keene, 2001].

7- Le gène de la protéine ribosomale 60S L4

De tels résultats d'induction concernant des gènes codant des protéines ribosomales sont déjà connus à partir d'études du transcriptome d'*Anopheles gambiae* [Oduol *et al.*, 2000]. Les ARNm de cette famille ont également fait l'objet de modulations dans des monocytes humains après une stimulation par des LPS [Hashimoto *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2000]. Même s'il ne s'agit pas exactement du même type de protéines ribosomales, cette modulation peut résulter d'un besoin physiologique dans l'immunité innée. En effet, de récents travaux ont observé une activité antimicrobienne de fragments peptidiques dérivés de ces protéines [Lee *et al.*, 2002]. Cela peut suggérer que certains peptides antimicrobiens auraient évolué à partir de protéines ribosomales [Putsep *et al.*, 1999a; Putsep *et al.*, 1999b]. En revanche, des gènes d'autres protéines ribosomales sont connus pour ne pas être modulés

dans des phénomènes d'immunité rendant alors l'étude de la régulation de cette famille de gène particulièrement intéressante [Richman *et al.*, 1996].

Il sera bien évidemment très intéressant d'étudier ces gènes chez la sangsue. Par des approches biochimiques comparatives, il serait envisageable de rechercher les fragments générés à partir de ces protéines à la suite d'une infection expérimentale et de détecter leurs éventuelles activités antimicrobiennes.

8- Les clones 67.1 et 74.1

Au même titre que le clone 24.1, les modulations observées pour les clones 67.1 et 74.1 représentent des molécules qui n'ont pas été identifiées. Les expériences suscitées pour la suite de leur étude concerneront très logiquement la caractérisation moléculaire de leur ADNc complet et la localisation tissulaire de leur transcrit.

Cette difficulté à déterminer la nature des gènes induits par l'infection bactérienne peut apporter un frein à la compréhension physiologique des modulations. Toutefois, les stratégies comparatives développées depuis quelques années dans des problématiques d'immunité innée ont pour vocation de mettre en évidence des acteurs sans pour autant déterminer leur fonction biologique. Il apparaît donc primordial de préciser avant tout le véritable contexte de chaque modulation avec ou sans son identification préalable. En outre, lorsqu'un gène de sangsue apparaît significativement peu homologue avec des molécules connues, il soulève au moins un intérêt certain sur le plan phylogénétique.

La discussion développée autour de chaque gène induit après l'infection bactérienne tente de mettre en parallèle les travaux présentés avec d'autres observations antérieures (tableau 10 page 144). Nous avons vu que la modulation de certains gènes peut avoir une signification dans le contexte immunitaire déclenché par l'injection des bactéries.

Cette étude, par la mise en évidence de plusieurs candidats, apporte surtout de nombreuses perspectives de travail, nécessaires à l'évaluation du rôle de chacun dans la réponse immunitaire de la sangsue. Il est en effet préférable d'estimer les degrés d'importance et de spécificité de chaque modulation dans la réponse immunitaire de la sangsue.

Pour y répondre en partie, il serait d'abord entre autre nécessaire de localiser les modulations d'expression par Hybridation *in situ*. Il serait ensuite intéressant d'analyser ces modulations sur des cinétiques de stimulations et sur des pathogènes différents. Cela peut être

Tableau 10: Exemples de données et hypothèses fonctionnelles concernant chaque gène identifié induit après l'infection bactérienne.

Gènes induits :	Exemples de modulations connues	
Thréonine désaminase (enzyme de la biosynthèse de l'isoleucine)	Son gène est induit expérimentalement par blessure ou par le jasmonate de méthyle (molécule de signalisation induisant la réponse immunitaire des plantes) chez la tomate et la pomme de terre.	[Feys, 2000 #170; Hildmann, 1992 #167; Samach, 1995 #165; Samach, 1991 #166; Schaller, 2001 #168; Thomma, 1999 #169]
Actine et α-tubuline (protéines du cytosquelette)	Le gène ou la protéine sont régulés après une activation de neutrophiles humains par les LPS. Cela suggère une réorganisation du cytosquelette des cellules participant à la réponse immunitaire.	[Fessler, 2002 #173; Ramet, 2002 #109]
Malate déshydrogénase (enzyme participant à la gluconéogenèse)	Son gène est induit dans les macrophages et monocytes humains après activation par les LPS. Cela suppose une synthèse de glucose requise probablement dans les cellules activées dans la réponse immunitaire.	[Suzuki, 2000 #181; Hashimoto, 1999 #182]
Cystatine B (inhibiteur de cystéines protéases intracellulaires)	Sa déficience entraîne une accumulation toxique de cathepsines dans la maladie de Unverricht-Lundborg. La balance Cystatines-Cathepsines semble indispensable au métabolisme cellulaire. Cette interaction agit dans la résistance aux parasites.	[Pennacchio, 1996 #118; Pennacchio, 1996 #119; Mottram, 1998 #123; Manoury, 2001 #130; Lehesjoki, 1999 #120]
PABP1 (protéine de liaison à la queue poly(A) des ARNm)	Les gènes de cette famille sont induits dans des lymphocytes T activés. Cette induction peut aboutir à l'initiation de la traduction de certains acteurs de la réponse immunitaire.	[Krasnow, 1991 #191; Miller, 1997 #192; Sachs, 1992 #190; Sachs, 1997 #189; Yang, 1995 #184]
Protéine ribosomale 60S (protéine impliquée dans la machinerie traductionnelle)	Les gènes de cette famille sont induits chez <i>Anopheles gambiae</i> infecté par les LPS et dans les monocytes humains activés par les LPS. Certaines de ces protéines contiennent des peptides antibactériens.	[Suzuki, 2000 #181; Putsep, 1999 #176; Putsep, 1999 #175; Oduol, 2000 #91; Lee, 2002 #179; Hashimoto, 1999 #182]

fait par exemple par la technique de PCR quantitative en temps réel. La recherche des promoteurs de ces gènes est également une perspective intéressante afin d'étudier plus précisément leur régulation. Il serait alors possible de regarder si les séquences activatrices sont analogues pour les différents candidats et si leur régulation peut donc être influencée par les mêmes facteurs. Enfin, l'étude de leur régulation peut être abordée par les Biopuces à ADN. Il apparaît à ce jour tout à fait réalisable d'utiliser les Biopuces à ADN déjà disponibles afin de les hybrider avec des sondes issues d'ARN totaux de différents lots d'animaux. Ces lots peuvent être stimulés d'une manière différente à ce qui a été effectué jusqu'alors. Les analyses statistiques révéleraient peut-être des modulations différentes. Des sondes issues d'ARN totaux spécifiques de certains tissus de l'animal peuvent également faire l'objet d'hybridations sur les lames existantes. Des ratios plus importants entre les valeurs contrôles et les valeurs expérimentales seraient alors très probables montrant au passage l'implication de tissus ou types cellulaires préférentiels dans l'immunité de la sangsue.

Les perspectives soulevées par ce travail de thèse sont donc nombreuses et doivent incontestablement suivre un ordre de priorité. Il est essentiel dans un premier temps de localiser les modulations des candidats révélés par la DDRT-PCR et les Biopuces à ADN. Cela permettra tout d'abord de caractériser les populations cellulaires impliquées dans l'immunité de la sangsue. Ensuite, selon ces informations, des expériences de prélèvement par Microdissection Laser par exemple ou de culture primaire permettront de travailler directement sur les cellules intéressantes. Enfin, il sera primordial de favoriser des approches de masse sur ces cellules particulières telles que la DDRT-PCR couplée au contrôle par Biopuces à ADN. L'une présente l'avantage de générer rapidement un grand nombre de candidats et l'autre est capable de les analyser simultanément et d'en extraire les vrais des faux. Ensuite, avec un nombre plus restreint de gènes réellement modulés, il sera possible d'entreprendre leur caractérisation moléculaire plus complète.

V- La cystatine B et la cathepsine L de *T. tessulatum*

Après séquençage du clone 3.4, choisi pour l'identification du candidat différentiel n°3, l'alignement obtenu dans les banques de données a permis de l'identifier de manière fiable au gène de la cystatine B (stéfine B).

1- Les cystatines

D'abord nommés cystatines pour les inhibiteurs dont la masse molaire était inférieure à 20 000 Da et kininogènes pour ceux dont la masse molaire était supérieure à 60 000 Da, les inhibiteurs de cystéine protéases sont maintenant regroupés dans la superfamille des cystatines [Barrett *et al.*, 1986; Rawlings & Barrett, 1990]. Les gènes codant pour ces protéines présentent de fortes homologues de séquence et dériveraient d'un même gène ancestral par fusions, duplications et délétions. Cette superfamille est divisée en trois familles selon la structure des protéines inhibitrices: les stéfines (ne contenant aucun pont disulfure), les cystatines (contenant un pont disulfure) et les kininogènes (contenant une séquence proche des cystatines répétée trois fois)

La cystatine B est un inhibiteur spécifique de cystéine protéases de type cathepsines [Thiele *et al.*, 1988; Turk *et al.*, 1994]. Elle appartient à la première famille (les stéfines). Cette famille est constituée de cystatines intracellulaires dépourvues de peptide signal qui ne peuvent donc être sécrétées dans le milieu extracellulaire.

Une forme d'épilepsie chez l'Homme connue sous le nom d'Epilepsie de Unverricht-Lundborg (EPM1) est spécifiquement associée à une mutation perte de fonction dans le gène codant la cystatine B [Lehesjoki & Koskiniemi, 1999; Pennacchio *et al.*, 1996; Pennacchio & Myers, 1996]. Cette déficience déclenche des concentrations aberrantes de cathepsines au niveau intracellulaire ce qui entraîne une toxicité très dangereuse pour l'organisme. Les mécanismes moléculaires restent à ce jour peu connus mais il est clair que cette maladie est provoquée par le manque de contrôle des cathepsines par la cystatine B. Cette pathologie serait liée à une localisation uniquement nucléaire et donc une absence de la cystatine B dans le cytoplasme des cellules en prolifération [Riccio *et al.*, 2001]. Les cathepsines étant essentiellement cytoplasmiques ne sont pas contrôlées par la cystatine B au cours de la prolifération cellulaire. Un modèle expérimental de cette maladie épileptique humaine a été développé à travers l'utilisation de souris déficientes en cystatine B. Des études comparatives entre des souris saines et des souris déficientes ont révélé que la déficience en cystatine B aurait un rôle dans la perte neuronale médiée par des processus apoptotiques [Pennacchio *et al.*, 1998]. La présence de cystatine B permettrait donc d'inhiber l'apoptose [Pennacchio *et al.*, 1998]. En outre, cette comparaison par *Differential display* montre une augmentation d'expression de certains gènes dans les animaux n'exprimant plus l'inhibiteur. Les transcrits

dont le taux est augmenté dans les souris déficientes correspondent à des molécules connues dans l'activation des cellules gliales à la suite de la perte neuronale [Lieuallen *et al.*, 2001]. Le transcrit de la cathepsine S est également augmenté dans les souris n'exprimant plus le gène de la cystatine B, suggérant que les cascades apoptotiques menant à la perte neuronale pourraient être liées à cette protéase [Lieuallen *et al.*, 2001].

Dans un autre domaine, celui de l'agriculture, les cystatines se sont révélées très intéressantes. Des organismes végétaux génétiquement modifiés ont été élaborés afin d'améliorer le rendement de culture de certains végétaux. En effet, *Arabidopsis thaliana* fut choisi comme modèle expérimentale pour effectuer l'introduction et l'expression d'exogènes codant la cystatine de riz, dont le type exact ne fut pas déterminé. Ces organismes génétiquement modifiés ont été créés afin de tester leur résistance par rapport à deux types de vers nématodes, particulièrement dévastateurs pour de nombreuses cultures de végétaux, *Heterodera schachtii* et *Meloidogyne incognita* [Urwin *et al.*, 1997]. Il a été montré que cet inhibiteur de cystéine protéases, lorsqu'il est ingéré par les deux types de ver par consommation de la plante, affecte de façon irréversible leur développement puisqu'il empêche la production des œufs et élimine à long terme les deux nématodes.

De la même manière, les potyvirus affectent la culture de tabac. Le développement de ces virus implique des cystéines protéases. L'introduction d'une cystatine de riz, dans les plants de tabac leur a conféré une résistance accrue au virus en affectant de façon critique son cycle de développement [Gutierrez-Campos *et al.*, 1999].

Ces inhibiteurs de cystéine protéases sont également retrouvés, pour certaines formes sécrétées, dans de nombreux fluides tels que la salive ou les sécrétions nasales [Abe *et al.*, 1998; Babnik *et al.*, 1988; Lindahl *et al.*, 1999]. Ces facteurs solubles exerceraient alors des actions dirigées directement vers les organismes pathogènes [Blankenvoorde *et al.*, 1996]. L'inhibition de croissance observée par ailleurs sur la bactérie *Porphyromonas gingivalis* ne serait pas liée à l'inhibition de ses cystéines protéases. En effet, ces travaux montrent que des cystatines de type S et/ou C contiendraient des motifs antibactériens responsables de ce bactériostatisme [Blankenvoorde *et al.*, 1998].

Les cystatines sécrétées exerceraient par conséquent plusieurs actions dans un contexte d'immunité. En revanche, la première famille des cystatines à laquelle appartient la cystatine

B est peu connue. Ces inhibiteurs sont exclusivement intracellulaires et semblent avoir une action directe sur les cathepsines lysosomales.

2- Les cathepsines

Les interactions entre ces cystéines protéases et leurs inhibiteurs spécifiques jouent un rôle important dans la modulation de la réponse immunitaire chez les Vertébrés supérieurs. Les cathepsines sont impliquées dans les processus de maturation du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II dans les cellules présentatrices d'antigène [Barrera *et al.*, 2001; Riese & Chapman, 2000]. Ces enzymes permettent la formation du complexe CMH II-antigène par la dégradation de la molécule chaperone Ii dans le complexe initial CMH II-Ii [Riese & Chapman, 2000; Watts, 2001]. Un contrôle de ces enzymes par des cystatines représente alors un système de régulation directe pour la réponse immunitaire. En outre, les cathepsines mises en jeu dans ces processus sont entre autre de type B, H, S et L. Ces cystéines protéases sont inhibées spécifiquement *in vitro* par la cystatine de type B.

Certains parasites intracellulaires auraient développé à travers cette famille d'enzymes des mécanismes destinés à favoriser leur invasion au sein de l'organisme hôte. Ils utilisent leurs propres cathepsines pour élaborer un système de leurres moléculaires qui va altérer le complexe CMH II-Ii des macrophages de l'hôte [De Souza Leao *et al.*, 1995; Mottram *et al.*, 1998]. Les stades amastigotes de *Leishmania amazonensis* se développent dans les macrophages de mammifères au sein de vacuoles parasitophores. Ces organites contiennent des molécules de CMH de classe II dépourvues de chaîne invariante Ii. Il a été montré que l'état non fonctionnel des molécules de classe II est dû spécifiquement à l'action des cathepsines L et B du parasite [De Souza Leao *et al.*, 1995]. Des traitements expérimentaux par des inhibiteurs commerciaux de cystéine protéases (antipaine ou leupeptine entre autre) semblent restaurer la présence de molécules de classe II fonctionnelle. Ces travaux montrent que les cathepsines du parasite exercent un contrôle sur le système immunitaire de l'hôte en l'empêchant de présenter les fragments antigéniques potentiels.

En outre, les cathepsines des parasites pourraient moduler la production de cytokines de l'hôte vers une expression préférentielle des interleukines 1 et 4. Cette différenciation des lymphocytes T CD4+ précurseurs vers un phénotype lymphocyte T Helper 2 (Th2) favoriserait la prolifération du parasite [Mottram *et al.*, 1998].

Des expériences réalisées *in vitro* montrent donc que les cathepsines sont au centre des mécanismes d'interactions entre les parasites et les cellules hôtes [Bart *et al.*, 1997].

Au regard de leurs fonctions, il apparaît réaliste de supposer que les inhibiteurs de ces enzymes, les cystatines, ont une fonction très importante dans la régulation de plusieurs processus de défense, au même titre que d'autres inhibiteurs enzymatiques tels que les serpins ou l' α_2 -macroglobuline [Armstrong, 2001; Zang & Maizels, 2001].

Pour preuve, les interactions entre les cathepsines et les cystatines peuvent être utilisées par l'organisme pathogène. Par exemple, un homologue des cystatines de type C chez le parasite *Brugia malayi* est sécrété afin de contrôler les cellules présentatrices d'antigène de l'hôte à travers l'inhibition de leurs cathepsines [Maizels *et al.*, 2001; Manoury *et al.*, 2001].

Hormis les interactions hôte-parasite, les cathepsines interviennent également dans des processus de mort cellulaire de type II, c'est-à-dire l'apoptose réalisée par autophagie. Il semble que la cathepsine de type B et peut-être d'autres formes soient impliquées dans la mort cellulaire des lymphocytes B immatures WEHI-231 formant un lymphome [Gauld *et al.*, 2002; Katz *et al.*, 2001]. De tels mécanismes existent dans le centre germinatif des lymphocytes B, lieu de prolifération et de différenciation engendré par la migration du lymphocyte B activé dans un follicule lymphoïde primaire [van Eijk & de Groot, 1999]. Durant cette prolifération, les cellules B sont sélectionnées pour leur spécificité antigénique. La non reconnaissance de certaines cellules B différenciées pour l'antigène indique une mauvaise spécificité de leur récepteur. Ceci déclenche leur élimination par apoptose. Les processus engendrés font appel à la caspase-3 mais aussi à certaines cathepsines produites par les cellules folliculaires dendritiques qui assurent la sélection clonale.

Par conséquent, ces quelques exemples apportent des informations intéressantes sur l'implication de la balance cathepsines-cystatines dans un contexte d'immunité.

Ainsi, ces nombreux travaux ont contribué à nous encourager à étudier avec plus de détails le candidat différentiel qu'est le gène *Tt-cysB* afin de voir s'il correspond à un acteur de la réponse immunitaire de *T. tessulatum*.

3- Les cystatines et les cathepsines de *T. tessulatum*

L'analyse par DDRT-PCR a permis de mettre en évidence le gène de la cystatine B chez notre modèle (*Tt-cysB*). Le clonage moléculaire complet a donné une séquence qui après alignement en acides aminés présente 54% d'identité avec la cystatine B humaine, première homologie alignée. L'induction, détectée 24 heures après une infection bactérienne, a été vérifiée par Northern Blot, par Hybridation *in situ* et par Biopuces à ADN (figures 30 et 31 pages 115 et 117 et tableaux 8 et 9 pages 102 et 107). Ces contrôles ont été réalisés avec les mêmes conditions expérimentales que l'analyse par DDRT-PCR. En outre, ils utilisent deux lots contrôles. Le premier lot est représenté par des animaux intacts et le second est constitué d'animaux injectés par du PBS ou piqués simplement. Le lot expérimental est quant à lui le résultat de l'injection d'un mélange de bactéries Gram+ et Gram- (50:50). A la suite des Northern Blot et de l'Hybridation *in situ*, nous avons montré que la piqûre simple ne provoque pas d'augmentation significative du taux de transcrite de *Tt-cysB* (figures 30 et 31 pages 115 et 117). En revanche, la modulation est significative seulement après l'injection bactérienne. Cela montre que le gène *Tt-cysB* est induit spécifiquement par les bactéries et non par la piqûre. Cette observation doit néanmoins être tempérée car notre approche est réalisée sur l'animal entier. L'information est donc « diluée » car elle ne concerne qu'un type cellulaire numériquement minoritaire dans l'ensemble de l'organisme. De tels travaux effectués directement sur les ARNm des cœlomocytes permettraient une étude plus fine et pourraient même indiquer une induction du gène *Tt-cysB* à la suite d'une piqûre simple.

Cette cystatine B de sangsue est la première de ce type chez les invertébrés à présenter une homologie aussi importante avec celles des modèles mammaliens. On y retrouve les domaines nécessaires aux interactions avec les cathepsines, à savoir la glycine à l'extrémité amino-terminale et le motif consensus QXVXG (figure 29 page 111). En outre, en plus de sa grande conservation avec les cystatines B de vertébrés, elle possède comme ces dernières une cystéine amino-terminale qui lui attribue son appartenance au type B [Pol & Bjork, 2001].

Cette absence de caractérisation de cystatine B invertébrée, en tout cas non publiée, peut s'expliquer déjà par l'étude très large d'autres cystatines. En effet, plusieurs cystatines sécrétées ont fait l'objet de travaux dans le domaine de l'immunité et la plupart d'entre eux sont réalisés sur des modèles vertébrés *in vitro*. La cystatine C, par exemple, s'est avérée par

des études *in vitro* être un facteur soluble capable d'inhiber directement dans le milieu de culture de macrophages murins les cystéines protéases de *Trypanosoma cruzi* et cet inhibiteur favoriserait la production de NO impliqué dans la réponse immunitaire [Verdot *et al.*, 1996; Verdot *et al.*, 1999]. Le combat du pathogène contre l'hôte repose donc en partie sur les interactions de certaines molécules. L'intérêt pour de tels inhibiteurs apparaît alors plus évident que des cystatines intracellulaires comme le type B.

L'absence d'étude de la cystatine B chez les invertébrés est expliquée aussi par la recherche systématique de molécules de reconnaissance qui vont au contact direct du pathogène. Autrement dit, les travaux de mise en évidence d'effecteurs immunitaires se sont largement intéressés aux conséquences immédiates ou relativement précoces de l'infection expérimentale. Même si statistiquement le contrôle par Northern Blot après une infection rapide de 3 heures n'est pas rigoureux puisque unique, la modulation observée est néanmoins très faible (figure 30 page 115). On peut donc supposer que cette induction génique atteint un seuil critique à partir d'un délai plus long que 3 heures. Cet inhibiteur ne semble donc pas à priori participer à l'initiation d'une réponse immunitaire mais plutôt à sa régulation. Cela nécessitera d'autres études afin de le montrer. Par ailleurs, 24 heures après l'infection expérimentale, la modulation observée est peut-être déjà en déclin ou au contraire n'a pas encore atteint son sommet. Il est donc sans conteste nécessaire de réaliser des analyses cinétiques afin de donner un sens plus juste aux modulations observées. De cette manière, il sera possible de déterminer les différentes molécules intervenant dans les étapes successives de la réponse immunitaire. Tel est le cas des nouvelles approches comparatives développées chez quelques modèles invertébrés qui ont d'ailleurs montré l'implication à des temps très variables cette fois-ci d'autres inhibiteurs tels que les serpinines [De Gregorio *et al.*, 2001].

Ces inhibiteurs de sérine protéases que sont les serpinines ont été largement étudiés [Armstrong, 2001; Maizels *et al.*, 2001]. Leurs gènes présentent des modulations très importantes dans le cadre d'une infection expérimentale [De Gregorio *et al.*, 2001; Irving *et al.*, 2001]. Leur intérêt a peut-être masqué le rôle potentiel d'autres familles peu abordées. Les implications des serpinines dans les mécanismes immunitaires développeront probablement les études de tous les inhibiteurs de protéases, à plus forte raison lorsque ces dites protéases sont importantes dans la réponse immunitaire.

Dans un premier temps, nous avons donc montré l'induction spécifique du gène *Tt-cysB*, 24 heures après l'infection par les bactéries. Des études cinétiques nous permettraient

d'établir la régulation fine de cette expression au cours du temps afin d'attribuer à cet inhibiteur un niveau d'action dans l'immunité. Ces expériences seraient réalisables rapidement par l'utilisation de la PCR en temps réel par exemple. Il est néanmoins vraisemblable de supposer que cet inhibiteur agirait sur les cathepsines lysosomales dans les cellules immunitaires de la sangsue pour réguler leur activité catalytique sur la dégradation d'éléments pathogènes. Cette hypothèse de travail nous a orienté vers deux voies :

Il était tout d'abord primordial de vérifier physiologiquement cette modulation en la localisant par Hybridation *in situ*. En outre, la localisation de l'expression basale serait dans un premier temps un élément d'information sur l'importance de cette molécule dans l'immunité de la sangsue. Il était ensuite nécessaire de caractériser les cathepsines de sangsue, si elles existent.

Ce que nous apporte la localisation de l'expression basale, est fondamental. Le gène *Tt-cysB* est détecté dans un type cellulaire unique de l'animal entier (figure 31 page 117). Il semble donc que seules ces cellules coelomiques de grande taille contiennent cet inhibiteur de cystéines protéases. A ce stade de l'étude, l'exclusivité de ce transcrite pour les grands coelomocytes est très intéressante car elle répond parfaitement à notre volonté de caractériser les types cellulaires impliqués dans l'immunité. En outre, ces cellules ont des propriétés circulantes dans le liquide coelomique, ce qui présente un intérêt certain dans les stratégies de défense déjà connues chez les Annélides [Cooper *et al.*, 2002; de Eguileor *et al.*, 2001]. Il est donc raisonnable de penser que ces cellules puissent jouer un rôle dans la réponse immunitaire déclenchée contre les bactéries injectées, à l'image des cellules circulantes d'autres embranchements [Mitta *et al.*, 2000; Ramet *et al.*, 2002].

Les travaux de clonage moléculaire ont permis d'isoler le gène complet *Tt-cpl* ainsi que les gènes partiels *Tt-cpb* et *Tt-cpz*. Dans le but de rechercher les enzymes pouvant interagir avec *Tt-CYSB*, des expériences d'hybridation *in situ* ont été réalisées avec une sonde spécifique du transcrite de *Tt-cpl*. Les résultats obtenus montrent qu'elle est essentiellement située dans les grands coelomocytes tout comme *Tt-cysB* (figure 34 page 122). Les comparaisons par hybridation *in situ* des lots contrôles avec les lots d'animaux infectés n'ont pas montré d'induction de l'expression du gène *Tt-cpl*. Dans un contexte de réponse immunitaire, ce gène ne semble donc pas régulé, 24 heures après l'infection. Les notions de temps et de mode de stimulation sont encore ici très importantes car d'autres études montrent des modulations de gènes codant des cathepsines et particulièrement la cathepsine L [De

Gregorio *et al.*, 2001; Irving *et al.*, 2001] Cela apporte un argument supplémentaire, s'il en fallait un, que les études cinétiques et orientées vers plusieurs pathogènes sont fondamentales dans toute analyse comparative. Ces expériences pourraient une fois encore utiliser la PCR en temps réel afin d'observer le niveau d'expression du gène *Tt-cpl* au cours du temps.

Les expériences de double hybridation *in situ* ont montré que les transcrits des deux molécules sont exprimés dans les mêmes cellules (figure 34 page 122). Il n'y a donc pas de doute possible sur leur colocalisation cellulaire. Ces résultats présentent donc un intérêt certain chez notre modèle car ils mettent en évidence l'importance probable des grands cœlomocytes circulants dans la réponse immunitaire de la sangsue.

Des expériences ultérieures étudiant l'interaction entre *Tt-CYSB* et les cathepsines permettraient de déterminer le type d'enzyme inhibée par *Tt-CYSB*. Cette dernière, induite dans une étape tardive de l'immunité, pourrait alors exercer un contrôle sur la cathepsine L ou sur une autre cathepsine afin de réguler son activité enzymatique dans la dégradation de pathogènes.

Ces hypothèses doivent être confirmées par des travaux complémentaires. Elles suscitent surtout des perspectives de travail assez importantes.

Tout d'abord, il est envisagé d'étudier les interactions entre *Tt-CYSB* et *Tt-CPL* et de voir à travers des études enzymologiques *in vitro* et des tests d'inhibition si la première inhibe la seconde. Dans le cadre de l'étude de ces interactions, des anticorps dirigés contre des parties spécifiques de *Tt-CYSB* et de *Tt-CPL* sont en cours de synthèse. Leur utilisation dans des études immunocytochimiques permettra de localiser en microscopie électronique les deux molécules et de visualiser les compartiments dans lesquels ils pourraient interagir. Les anticorps seront tout à fait utiles pour étudier le devenir des deux molécules dans l'organisme. Nous savons que la cystatine B ne peut être sécrétée. En revanche, la cathepsine L pourrait agir dans le milieu extracellulaire ou dans les sécrétions de l'animal. Il apparaît donc intéressant d'observer son déplacement au cours du temps. Nous savons par ailleurs que la théromacine, peptide antibactérien, est retrouvée dans le mucus de l'animal après une infection expérimentale. Ce type de sécrétion pourrait jouer un rôle de première barrière de protection contre les organismes étrangers en renfermant des molécules actives agissant directement contre les pathogènes.

Par la suite, la caractérisation plus complète des autres cathepsines et cystatines de la sangsue permettrait de localiser leurs transcrits et d'observer leur distribution dans l'organisme. C'est pourquoi, il est envisagé de poursuivre le clonage moléculaire de *Tt-cpb* et *Tt-cpz* par des RACE-PCR et/ou des clonages dans les banques d'ADNc de sangsue. Il est possible également de rechercher d'autres types de cathepsines par de premières approches de PCR utilisant des amorces dégénérées puis avec les supports moléculaires tels que les banques d'ADNc d'animaux témoins et immunostimulés. Ensuite, par la même analyse d'hybridation *in situ*, les gènes des cathepsines supplémentaires seront localisés afin de les comparer à la cathepsine L. Des travaux parallèles menés au sein du laboratoire par le Dr. C. Cocquerelle ont mené à la caractérisation partiel d'un ADNc apparenté à la cystatine C de sangsue. Son clonage plus complet permettrait de comparer la localisation cellulaire de cet autre inhibiteur par rapport à la cystatine B. L'étude fine de la régulation des gènes codant enzymes et inhibiteurs pourrait être entreprise rapidement par PCR en temps réel à la suite de stimulations diverses mélangeant cinétique et différents pathogènes. Cette approche permettrait d'apprécier le rôle d'une telle balance entre cathepsines et cystatines dans l'immunité innée.

Les travaux réalisés sur des souris déficientes en cystatine B ont montré que cet inhibiteur pouvait exercer un contrôle sur l'apoptose des neurones dans certaines régions du cerveau [Lieuallen *et al.*, 2001; Pennacchio *et al.*, 1998; Riccio *et al.*, 2001]. Sachant que le gène de cet inhibiteur est induit 24 heures après une infection bactérienne, il serait très intéressant de pouvoir associer la régulation de processus apoptotiques avec la réponse immunitaire. Le rôle des cathepsines lysosomales dans l'apoptose de type II par autophagie est avéré [Uchiyama, 2001]. Par des techniques d'observation *in situ*, il serait possible d'étudier l'apoptose dans les différents types de cœlomocytes d'animaux immunostimulés par rapport à des animaux témoins. Nous pourrions peut-être ainsi attribuer un sens biologique à la présence exclusive de *Tt-CYSB* dans les grands cœlomocytes.

Enfin, il est envisagé d'observer les différents types de cœlomocytes en microscopie électronique. La caractérisation morphologique des compartiments intracellulaires pourrait associer un ou plusieurs types à une fonction immunitaire. Il serait en effet nécessaire de rechercher par observation microscopique les cellules capables de phagocyter les organismes pathogènes. La découverte dans les grands cœlomocytes de *Tt-CYSB* et de *Tt-CPL* suggère un tel rôle. En effet, certains arguments tendent à orienter les grands cœlomocytes vers une fonction dans l'immunité de la sangsue. Ils peuvent alors susciter de nouvelles analyses globales comparatives. A condition de récolter les cœlomocytes en question et/ou de les

maintenir en survie suffisamment longtemps par culture primaire, il serait alors possible de les étudier plus en détail au moyen d'analyses différentielles biochimiques et moléculaires. Ces cellules présenteraient certainement des modulations plus intenses, à l'image de la cystatine B qui cette fois ne serait plus analysée au milieu des ARNm du reste de l'organisme.

Conclusion

A l'image de la Drosophile, quelques modèles invertébrés ont apporté un renouveau dans l'étude de l'immunité innée [Hoffmann, 1995; Lemaitre *et al.*, 1996; Muta & Iwanaga, 1996]. Cette dernière présente un intérêt fondamental chez les vertébrés puisqu'en plus d'une première défense, elle assure un rôle informatif sur la réponse immunitaire acquise [Fearon & Locksley, 1996; Medzhitov & Janeway, 1997]. Les modèles invertébrés contribuent à élucider les mécanismes innés chez les vertébrés [Medzhitov *et al.*, 1997]. En effet, ils ont beaucoup à nous apprendre, principalement en raison de leur résistance au cours de l'évolution et de leur grande diversité concernant leur environnement et leur cycle de vie. En outre, l'immunité innée des vertébrés est aujourd'hui considérée comme le résultat évolutif d'une mosaïque de processus de défense invertébrés [Salzet, 2001]. C'est pourquoi, sa compréhension doit reposer sur l'étude d'une grande variété d'invertébrés, ecdysozoaires et lophotrochozoaires [Adoutte *et al.*, 2000; Cooper *et al.*, 2002].

Les études présentées dans ce travail de thèse se sont intégrées à cette volonté de découvrir de nouveaux acteurs de l'immunité innée chez les invertébrés. Elles se sont appuyées sur des approches différentielles, tant au niveau biochimique que moléculaire.

Dans un premier temps, l'analyse biochimique par chromatographie liquide (CLHP comparative) aura permis la mise en évidence de nombreuses modulations peptidiques dans le liquide coelomique après une infection par des LPS. A ce jour, un peptide portant une activité antibactérienne, la théromyzine (P9), fait l'objet de travaux plus approfondis parmi lesquels l'étude de son activité et sa régulation après une infection expérimentale. Ce peptide antibactérien est néanmoins déjà connu pour être spécifiquement exprimé dans les cellules coelomiques grasses, impliquées également dans la production d'un autre peptide antibactérien, la théromacine [Tasiemski *et al.*, 2002].

Le second peptide modulé (P7) n'a pu faire l'objet d'une caractérisation complète. Cependant, il suscite des travaux supplémentaires de clonage moléculaire, de localisation d'expression génique et de localisation immunocytochimique pour isoler le ou les types cellulaires dont il est issu. Cette molécule n'a pu être identifiée dans aucune base de données d'autres espèces animales. L'étude plus approfondie de ce peptide original s'avère très intéressante.

Sur la base des nombreuses modulations observées et des enseignements techniques tirés de ce travail, des études comparatives supplémentaires du contenu peptidique du liquide

coelomique et d'autres tissus sont d'ores et déjà entreprises afin de déterminer les molécules impliquées dans des processus immunitaires.

Dans un second temps, l'analyse s'est orientée vers les modulations d'expression génique induites après une infection bactérienne au sein de l'organisme complet. La mise au point de l'approche par *Differential Display RT-PCR* au sein du laboratoire a permis la détection de plusieurs signaux différentiels après une infection bactérienne. Elle a débouché sur l'élaboration inédite de Biopuces à ADN confectionnées à façon avec les candidats différentiels. Les gènes dont l'expression est modulée physiologiquement méritent d'être étudiés plus en détail. Ils doivent être caractérisés complètement et localisés dans l'organisme. Au regard de leurs fonctions déjà connues, les gènes identifiés codent tous des molécules potentiellement impliquées dans l'immunité et ce quelque soit leur niveau d'intervention.

La découverte de l'induction du gène de la cystatine B a abouti à la caractérisation de plusieurs cathepsines chez *T. tessulatum*. La localisation spécifique des gènes de la cystatine B et de la cathepsine L dans les grands cœlomocytes ne peut qu'inspirer de nouvelles études pour déterminer leurs véritables rôles dans l'immunité de la sangsue. En effet, leur concentration exclusive dans les grands cœlomocytes circulants et l'induction spécifique du gène de l'inhibiteur apportent de précieux indices dans la recherche des cellules immunitaires chez notre modèle. Les perspectives sont diverses et contribueront à mieux comprendre l'intervention des cystéine protéases et de leurs inhibiteurs spécifiques dans la réponse immunitaire innée de la sangsue, et au delà chez d'autres organismes.

Bon nombre de modèles invertébrés ou vertébrés ne verront pas leur génome séquencé avant longtemps. Qui plus est, dans bien des cas un autre facteur limitant est la quantité d'ARN disponible. L'association de techniques comme la DDRT-PCR et les Biopuces à ADN, voire la PCR en temps réel, permettront néanmoins d'entreprendre des études transcriptomiques comme nous l'avons fait chez la sangsue *Theromyzon tessulatum*.

Bibliographie

- Aballay, A., & Ausubel, F. M.** (2002). *Caenorhabditis elegans* as a host for the study of host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol*, 5(1), 97-101.
- Abe, K., Okina, A., Yano, T., Gao, C., Ohmori, H., Ishibashi, K., Nishiura, T., & Letic-Gavrilovic, A.** (1998). Abnormally high levels of cystatin S in submandibular glands, saliva, and gingiva of plaque-resistant rats. *J Dent Res*, 77(11), 1913-1919.
- Adams, M. et coll.** (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461), 2185-2195.
- Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot, N., Lespinet, O., Prud'homme, B., & de Rosa, R.** (2000). The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(9), 4453-4456.
- Aerne, B. L., Schmid, V., & Schuchert, P.** (1993). Actin-encoding genes of the hydrozoan *Podocoryne carnea*. *Gene*, 131(2), 183-192.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., & Flavell, R. A.** (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857), 732-738.
- Ali, M., Markham, A. F., & Isaacs, J. D.** (2001). Application of differential display to immunological research. *J Immunol Methods*, 250(1-2), 29-43.
- Allison, M. E., & Fearon, D. T.** (2000). Enhanced immunogenicity of aldehyde-bearing antigens: a possible link between innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol*, 30(10), 2881-2887.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25(17), 3389-3402.
- Anastasi, A., Brown, M. A., Kembhavi, A. A., Nicklin, M. J., Sayers, C. A., Sunter, D. C., & Barrett, A. J.** (1983). Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. Improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum. *Biochem J*, 211(1), 129-138.
- Armstrong, P. B.** (2001). The contribution of proteinase inhibitors to immune defense. *Trends Immunol*, 22(1), 47-52.
- Asling, B., Dushay, M. S., & Hultmark, D.** (1995). Identification of early genes in the *Drosophila* immune response by PCR-based differential display: the Attacin A gene and the evolution of attacin-like proteins. *Insect Biochem Mol Biol*, 25(4), 511-518.
- Babnik, J., Curin, V., Lah, T., Turk, V., & Skaleric, U.** (1988). Cysteine proteinase inhibitors in inflamed human gingiva. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 369 Suppl, 271-276.

- Baert, J. L., Britel, M., Sautiere, P., & Malecha, J.** (1992). Ovohemerythrin, a major 14-kDa yolk protein distinct from vitellogenin in leech. *Eur J Biochem*, 209(2), 563-569.
- Bals, R., Wang, X., Wu, Z., Freeman, T., Bafna, V., Zasloff, M., & Wilson, J. M.** (1998). Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest*, 102(5), 874-880.
- Barrera, C., Ye, G., Espejo, R., Gunasena, S., Almanza, R., Leary, J., Crowe, S., Ernst, P., & Reyes, V. E.** (2001). Expression of cathepsins B, L, S, and D by gastric epithelial cells implicates them as antigen presenting cells in local immune responses. *Hum Immunol*, 62(10), 1081-1091.
- Barrett, A. J., Fritz, H., Grubb, A., Isemura, S., Jarvinen, M., Katunuma, N., Machleidt, W., Muller-Esterl, W., Sasaki, M., & Turk, V.** (1986). Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. *Biochem J*, 236(1), 312.
- Bart, G., Frame, M. J., Carter, R., Coombs, G. H., & Mottram, J. C.** (1997). Cathepsin B-like cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*, 88(1-2), 53-61.
- Belvin, M. P., & Anderson, K. V.** (1996). A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12, 393-416.
- Benton, H. P., Jackson, T. R., & Hanley, M. R.** (1989). Identification of a novel inflammatory stimulant of chondrocytes. Early events in cell activation by bradykinin receptors on pig articular chondrocytes. *Biochem J*, 258(3), 861-867.
- Bernstein, P., Peltz, S. W., & Ross, J.** (1989). The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Mol Cell Biol*, 9(2), 659-670.
- Blankenvoorde, M. F., Henskens, Y. M., van't Hof, W., Veerman, E. C., & Nieuw Amerongen, A. V.** (1996). Inhibition of the growth and cysteine proteinase activity of *Porphyromonas gingivalis* by human salivary cystatin S and chicken cystatin. *Biol Chem*, 377(12), 847-850.
- Blankenvoorde, M. F., van't Hof, W., Walgreen-Weterings, E., van Steenberg, T. J., Brand, H. S., Veerman, E. C., & Nieuw Amerongen, A. V.** (1998). Cystatin and cystatin-derived peptides have antibacterial activity against the pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Biol Chem*, 379(11), 1371-1375.
- Brezillon, S., Detheux, M., Parmentier, M., Hokfelt, T., & Hurd, Y. L.** (2001). Distribution of an orphan G-protein coupled receptor (JP05) mRNA in the human brain. *Brain Res*, 921(1-2), 21-30.

- Brogden, K. A., Ackermann, M., & Huttner, K. M.** (1998). Detection of anionic antimicrobial peptides in ovine bronchoalveolar lavage fluid and respiratory epithelium. *Infect Immun*, *66*(12), 5948-5954.
- Callard, D., Lescure, B., & Mazzolini, L.** (1994). A method for the elimination of false positives generated by the mRNA differential display technique. *Biotechniques*, *16*(6), 1096-1097, 1100-1093.
- Caulfield, J., Fernandez, M., Snetkov, V., Lee, T., & Hawrylowicz, C.** (2002). CXCR4 expression on monocytes is up-regulated by dexamethasone and is modulated by autologous CD3+ T cells. *Immunology*, *105*(2), 155-162.
- Chalfie, M.** (1998). Genome sequencing. The worm revealed. *Nature*, *396*(6712), 620-621.
- Chapron, C.** (1999). Principes de zoologie. Structures-fonctions et évolution., 272.
- Chertov, O., Michiel, D. F., Xu, L., Wang, J. M., Tani, K., Murphy, W. J., Longo, D. L., Taub, D. D., & Oppenheim, J. J.** (1996). Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T- cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem*, *271*(6), 2935-2940.
- Chopin, V., Salzet, M., Baert, J., Vandenbulcke, F., Sautiere, P. E., Kerckaert, J. P., & Malecha, J.** (2000). Therostasin, a novel clotting factor Xa inhibitor from the rhynchobdellid leech, *Theromyzon tessulatum*. *J Biol Chem*, *275*(42), 32701-32707.
- Consortium, T. C. e. S.** (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. The *C. elegans* Sequencing Consortium. *Science*, *282*(5396), 2012-2018.
- Conti, P., Dempsey, R. A., Reale, M., Barbacane, R. C., Panara, M. R., Bongrazio, M., & Mier, J. W.** (1991). Activation of human natural killer cells by lipopolysaccharide and generation of interleukin-1 alpha, beta, tumour necrosis factor and interleukin-6. Effect of IL-1 receptor antagonist. *Immunology*, *73*(4), 450-456.
- Cooper, E. L., Kauschke, E., & Cossarizza, A.** (2002). Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff. *Bioessays*, *24*(4), 319-333.
- Coppin, J. F., Lefebvre, C., Caby, S., Cocquerelle, C., Vicogne, J., Coustau, C., & Dissous, C.** (2002). Gene expression changes in *Schistosoma mansoni* sporocysts induced by *Biomphalaria glabrata* embryonic cells. *Parasitology Research*, *sous presse*.
- Corpet, F.** (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*, *16*(22), 10881-10890.

- Corton, J. C., & Gustafsson, J. A.** (1997). Increased efficiency in screening large numbers of cDNA fragments generated by differential display. *Biotechniques*, 22(5), 802-804, 806, 808 passim.
- Coutte, L., Slomianny, M. C., Malecha, J., & Baert, J. L.** (2001). Cloning and expression analysis of a cDNA that encodes a leech hemerythrin. *Biochim Biophys Acta*, 1518(3), 282-286.
- de Eguileor, M., Grimaldi, A., Tettamanti, G., Congiu, T., Protasoni, M., Reguzzoni, M., Valvassori, R., & Lanzavecchia, G.** (2001). Ultrastructure and functional versatility of hirudinean botryoidal tissue. *Tissue Cell*, 33(4), 332-341.
- De Gregorio, E., Spellman, P. T., Rubin, G. M., & Lemaitre, B.** (2001). Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(22), 12590-12595.
- De Souza Leao, S., Lang, T., Prina, E., Hellio, R., & Antoine, J. C.** (1995). Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J Cell Sci*, 108(Pt 10), 3219-3231.
- Diachenko, L. B., Ledesma, J., Chenchik, A. A., & Siebert, P. D.** (1996). Combining the technique of RNA fingerprinting and differential display to obtain differentially expressed mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 219(3), 824-828.
- Diamond, G., Russell, J. P., & Bevins, C. L.** (1996). Inducible expression of an antibiotic peptide gene in lipopolysaccharide-challenged tracheal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(10), 5156-5160.
- Dimopoulos, G., Casavant, T. L., Chang, S., Scheetz, T., Roberts, C., Donohue, M., Schultz, J., Benes, V., Bork, P., Ansorge, W., Soares, M. B., & Kafatos, F. C.** (2000). *Anopheles gambiae* pilot gene discovery project: identification of mosquito innate immunity genes from expressed sequence tags generated from immune-competent cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(12), 6619-6624.
- Dimopoulos, G., Richman, A., della Torre, A., Kafatos, F. C., & Louis, C.** (1996). Identification and characterization of differentially expressed cDNAs of the vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(23), 13066-13071.
- Dimopoulos, G., Richman, A., Muller, H. M., & Kafatos, F. C.** (1997). Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(21), 11508-11513.

- Dominguez, O., Ashhab, Y., Sabater, L., Belloso, E., Caro, P., & Pujol-Borrell, R.** (1998). Cloning of ARE-containing genes by AU-motif-directed display. *Genomics*, *54*(2), 278-286.
- Dushay, M. S., Asling, B., & Hultmark, D.** (1996). Origins of immunity: Relish, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(19), 10343-10347.
- Eguchi, M.** (1993). Protein protease inhibitors in insects and comparison with mammalian inhibitors. *Comp Biochem Physiol B*, *105*(3-4), 449-456.
- Ellison, R. T., 3rd, & Giehl, T. J.** (1991). Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J Clin Invest*, *88*(4), 1080-1091.
- Ewbank, J. J.** (2002). Tackling both sides of the host--pathogen equation with *Caenorhabditis elegans*. *Microbes Infect*, *4*(2), 247-256.
- Fearon, D. T., & Locksley, R. M.** (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, *272*(5258), 50-53.
- Fehlbaum, P., Bulet, P., Michaut, L., Lagueux, M., Broekaert, W. F., Hetru, C., & Hoffmann, J. A.** (1994). Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *J Biol Chem*, *269*(52), 33159-33163.
- Fernandes, K. V., Sabelli, P. A., Barratt, D. H., Richardson, M., Xavier-Filho, J., & Shewry, P. R.** (1993). The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is not related to levels of cysteine proteinase inhibitors. *Plant Mol Biol*, *23*(1), 215-219.
- Ferrandon, D., Jung, A. C., Criqui, M., Lemaitre, B., Uttenweiler-Joseph, S., Michaut, L., Reichhart, J., & Hoffmann, J. A.** (1998). A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *Embo J*, *17*(5), 1217-1227.
- Fessler, M. B., Malcolm, K. C., Duncan, M. W., & Worthen, G. S.** (2002). A genomic and proteomic analysis of activation of the human neutrophil by lipopolysaccharide and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, *9*, 9.
- Feys, B. J., & Parker, J. E.** (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet*, *16*(10), 449-455.
- Fischer, A., Saedler, H., & Theissen, G.** (1995). Restriction fragment length polymorphism-coupled domain-directed differential display: a highly efficient technique for expression analysis of multigene families. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(12), 5331-5335.

- Flad, H. D., Goldmann, S. F., von Loringhoven, K., & Schnappauf, H.** (1974). Cell-mediated lympholysis: studies on the identification of the killer cell. *Boll Ist Sieroter Milan*, 53(1), 185.
- Franchini, A., Conte, A., & Ottaviani, E.** (1995). Nitric oxide: an ancestral immunocyte effector molecule. *Adv Neuroimmunol*, 5(4), 463-478.
- Gal, S., & Gottesman, M. M.** (1988). Isolation and sequence of a cDNA for human pro-(cathepsin L). *Biochem J*, 253(1), 303-306.
- Gauld, S. B., Blair, D., Moss, C. A., Reid, S. D., & Harnett, M. M.** (2002). Differential Roles for Extracellularly Regulated Kinase-Mitogen- Activated Protein Kinase in B Cell Antigen Receptor-Induced Apoptosis and CD40-Mediated Rescue of WEHI-231 Immature B Cells. *J Immunol*, 168(8), 3855-3864.
- Goldman, M. J., Anderson, G. M., Stolzenberg, E. D., Kari, U. P., Zasloff, M., & Wilson, J. M.** (1997). Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*, 88(4), 553-560.
- Gottar, M., Gobert, V., Michel, T., Belvin, M., Duyk, G., Hoffmann, J. A., Ferrandon, D., & Royet, J.** (2002). The Drosophila immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature*, 416(6881), 640-644.
- Graf, J.** (1999). Symbiosis of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* and *Hirudo medicinalis*, the medicinal leech: a novel model for digestive tract associations. *Infect Immun*, 67(1), 1-7.
- Grams, R., Vichasri-Grams, S., Sobhon, P., Upatham, E. S., & Viyanant, V.** (2001). Molecular cloning and characterization of cathepsin L encoding genes from *Fasciola gigantica*. *Parasitol Int*, 50(2), 105-114.
- Gray, Y. H., Sved, J. A., Preston, C. R., & Engels, W. R.** (1998). Structure and associated mutational effects of the cysteine proteinase (CP1) gene of *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol Biol*, 7(3), 291-293.
- Green, C. D., Simons, J. F., Taillon, B. E., & Lewin, D. A.** (2001). Open systems: panoramic views of gene expression. *J Immunol Methods*, 250(1-2), 67-79.
- Greenberg, S., & Grinstein, S.** (2002). Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol*, 14(1), 136-145.
- Gross, P. S., Al-Sharif, W. Z., Clow, L. A., & Smith, L. C.** (1999). Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. *Dev Comp Immunol*, 23(4-5), 429-442.
- Gross, P. S., Bartlett, T.C.** (2001). *Crassostrea virginica* Hemocyte EST Library (CvHEM). *unpublished*.

- Gryglewski, R. J.** (1981). Molecular mechanisms of inflammation. *Eur J Rheumatol Inflamm*, 4(2), 153-159.
- Gutierrez-Campos, R., Torres-Acosta, J. A., Saucedo-Arias, L. J., & Gomez-Lim, M. A.** (1999). The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. *Nat Biotechnol*, 17(12), 1223-1226.
- Han, Y. S., Chun, J., Schwartz, A., Nelson, S., & Paskewitz, S. M.** (1999). Induction of mosquito hemolymph proteins in response to immune challenge and wounding. *Dev Comp Immunol*, 23(7-8), 553-562.
- Hashimoto, S., Suzuki, T., Dong, H. Y., Yamazaki, N., & Matsushima, K.** (1999). Serial analysis of gene expression in human monocytes and macrophages. *Blood*, 94(3), 837-844.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., & Aderem, A.** (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410(6832), 1099-1103.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., & Akira, S.** (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408(6813), 740-745.
- Hildmann, T., Ebnet, M., Pena-Cortes, H., Sanchez-Serrano, J. J., Willmitzer, L., & Prat, S.** (1992). General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell*, 4(9), 1157-1170.
- Hoek, R. M., Smit, A. B., Frings, H., Vink, J. M., de Jong-Brink, M., & Geraerts, W. P.** (1996). A new Ig-superfamily member, molluscan defence molecule (MDM) from *Lymnaea stagnalis*, is down-regulated during parasitosis. *Eur J Immunol*, 26(4), 939-944.
- Hoffmann, J. A.** (1995). Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol*, 7(1), 4-10.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., & Ezekowitz, R. A.** (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 284(5418), 1313-1318.
- Hoffmann, J. A., & Reichhart, J. M.** (2002). *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol*, 3(2), 121-126.
- Hoffmann, J. A., Reichhart, J. M., & Hetru, C.** (1996). Innate immunity in higher insects. *Curr Opin Immunol*, 8(1), 8-13.
- Hori, K., Mihich, E., & Ehrke, M. J.** (1989). Role of tumor necrosis factor and interleukin 1 in gamma-interferon-promoted activation of mouse tumoricidal macrophages. *Cancer Res*, 49(10), 2606-2614.

- Huang, Q., Liu, D., Majewski, P., Schulte, L. C., Korn, J. M., Young, R. A., Lander, E. S., & Hacohen, N.** (2001). The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science*, 294(5543), 870-875.
- Hultmark, D.** (1994). Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. *Biochem Biophys Res Commun*, 199(1), 144-146.
- Inamori, K., Saito, T., Iwaki, D., Nagira, T., Iwanaga, S., Arisaka, F., & Kawabata, S.** (1999). A newly identified horseshoe crab lectin with specificity for blood group A antigen recognizes specific O-antigens of bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem*, 274(6), 3272-3278.
- Irving, P., Troxler, L., Heuer, T. S., Belvin, M., Kopczynski, C., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A., & Hetru, C.** (2001). A genome-wide analysis of immune responses in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(26), 15119-15124.
- Ishaq, M., Zhang, Y. M., & Natarajan, V.** (1998). Activation-induced down-regulation of retinoid receptor RXRalpha expression in human T lymphocytes. Role of cell cycle regulation. *J Biol Chem*, 273(33), 21210-21216.
- Iwaki, D., Osaki, T., Mizunoe, Y., Wai, S. N., Iwanaga, S., & Kawabata, S.** (1999). Functional and structural diversities of C-reactive proteins present in horseshoe crab hemolymph plasma. *Eur J Biochem*, 264(2), 314-326.
- Iwanaga, S.** (2002). The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab. *Curr Opin Immunol*, 14(1), 87-95.
- Iwanaga, S., Kawabata, S., & Muta, T.** (1998). New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions. *J Biochem (Tokyo)*, 123(1), 1-15.
- Janeway, C. A., Jr.** (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 54(Pt 1), 1-13.
- Janeway, C. A., Jr.** (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today*, 13(1), 11-16.
- Jones, D. E., & Bevins, C. L.** (1993). Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Lett*, 315(2), 187-192.
- Kang, D., Liu, G., Lundstrom, A., Gelius, E., & Steiner, H.** (1998). A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(17), 10078-10082.

- Kanost, M. R.** (1999). Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Dev Comp Immunol*, 23(4-5), 291-301.
- Karlin, S., & Altschul, S. F.** (1990). Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(6), 2264-2268.
- Kato, T., & Minagawa, T.** (1981). Enhancement of cytotoxicity of human peripheral blood lymphocytes by interferon. *Microbiol Immunol*, 25(8), 837-845.
- Katz, E., Deehan, M. R., Seatter, S., Lord, C., Sturrock, R. D., & Harnett, M. M.** (2001). B cell receptor-stimulated mitochondrial phospholipase A2 activation and resultant disruption of mitochondrial membrane potential correlate with the induction of apoptosis in WEHI-231 B cells. *J Immunol*, 166(1), 137-147.
- Kawabata, S., & Iwanaga, S.** (1999). Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab. *Dev Comp Immunol*, 23(4-5), 391-400.
- Keene, J. D.** (2001). Ribonucleoprotein infrastructure regulating the flow of genetic information between the genome and the proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(13), 7018-7024.
- Khush, R. S., Leulier, F., & Lemaitre, B.** (2001). Drosophila immunity: two paths to NF-kappaB. *Trends Immunol*, 22(5), 260-264.
- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., & Wigzell, H.** (1975a). "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol*, 5(2), 117-121.
- Kiessling, R., Klein, E., & Wigzell, H.** (1975b). "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*, 5(2), 112-117.
- Krasnow, S. W., Zhang, L. Q., Leung, K. Y., Osborn, L., Kunkel, S., & Nabel, G. J.** (1991). Tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1, and phorbol myristate acetate are independent activators of NF-kappa B which differentially activate T cells. *Cytokine*, 3(5), 372-379.
- Lacoste, A., Malham, S. K., Gelebart, F., Cueff, A., & Poulet, S. A.** (2002). Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol*, 26(1), 1-9.
- Lagueux, M., Perrodou, E., Levashina, E. A., Capovilla, M., & Hoffmann, J. A.** (2000). Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(21), 11427-11432.

- Lee, D. G., Park, Y., Kim, H. N., Kim, H. K., Kim, P. I., Choi, B. H., & Hahm, K. S.** (2002). Antifungal mechanism of an antimicrobial peptide, HP (2--20), derived from N-terminus of Helicobacter pylori ribosomal protein L1 against Candida albicans. *Biochem Biophys Res Commun*, 291(4), 1006-1013.
- Lee, W. J., Lee, J. D., Kravchenko, V. V., Ulevitch, R. J., & Brey, P. T.** (1996). Purification and molecular cloning of an inducible gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, Bombyx mori. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(15), 7888-7893.
- Lehesjoki, A. E., & Koskiniemi, M.** (1999). Progressive myoclonus epilepsy of Unverricht-Lundborg type. *Epilepsia*, 40(Suppl 3), 23-28.
- Lehmann, U., & Kreipe, H.** (2001). Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods*, 25(4), 409-418.
- Lehrer, R. I., & Ganz, T.** (1999). Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol*, 11(1), 23-27.
- Lehrer, R. I., & Ganz, T.** (2002). Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol*, 14(1), 96-102.
- Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A.** (1995). A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the Drosophila host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(21), 9465-9469.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A.** (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell*, 86(6), 973-983.
- Lencer, W. I., Cheung, G., Strohmeier, G. R., Currie, M. G., Ouellette, A. J., Selsted, M. E., & Madara, J. L.** (1997). Induction of epithelial chloride secretion by channel-forming cryptidins 2 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(16), 8585-8589.
- Leonard, L. A., Strandberg, J. D., & Winkelstein, J. A.** (1990). Complement-like activity in the sea star, Asterias forbesi. *Dev Comp Immunol*, 14(1), 19-30.
- Leonardi, A., Turk, B., & Turk, V.** (1996). Inhibition of bovine cathepsins L and S by stefins and cystatins. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 377(5), 319-321.
- Levashina, E. A., Langley, E., Green, C., Gubb, D., Ashburner, M., Hoffmann, J. A., & Reichhart, J. M.** (1999). Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient Drosophila. *Science*, 285(5435), 1917-1919.

- Levashina, E. A., Moita, L. F., Blandin, S., Vriend, G., Lagueux, M., & Kafatos, F. C.** (2001). Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell*, *104*(5), 709-718.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., & Lamb, C.** (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, *79*(4), 583-593.
- Li, F., Barnathan, E. S., & Kariko, K.** (1994). Rapid method for screening and cloning cDNAs generated in differential mRNA display: application of northern blot for affinity capturing of cDNAs. *Nucleic Acids Res*, *22*(9), 1764-1765.
- Li, Y., Tian, S., Douglas, S. D., & Ho, W. Z.** (2000). Morphine Up-regulates expression of substance P and its receptor in human blood mononuclear phagocytes and lymphocytes. *Cell Immunol*, *205*(2), 120-127.
- Liang, P., & Pardee, A. B.** (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, *257*(5072), 967-971.
- Liang, P., Zhu, W., Zhang, X., Guo, Z., O'Connell, R. P., Averboukh, L., Wang, F., & Pardee, A. B.** (1994). Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Res*, *22*(25), 5763-5764.
- Lieuallen, K., Pennacchio, L. A., Park, M., Myers, R. M., & Lennon, G. G.** (2001). Cystatin B-deficient mice have increased expression of apoptosis and glial activation genes. *Hum Mol Genet*, *10*(18), 1867-1871.
- Lindahl, M., Stahlbom, B., & Tagesson, C.** (1999). Newly identified proteins in human nasal and bronchoalveolar lavage fluids: potential biomedical and clinical applications. *Electrophoresis*, *20*(18), 3670-3676. [pii].
- Liu, G., Takano, T., Matsuzuka, F., Higashiyama, T., Kuma, K., & Amino, N.** (1999). Screening of specific changes in mRNAs in thyroid tumors by sequence specific differential display: decreased expression of c-fos mRNA in papillary carcinoma. *Endocr J*, *46*(3), 459-466.
- Lopez-Nieto, C. E., & Nigam, S. K.** (1996). Selective amplification of protein-coding regions of large sets of genes using statistically designed primer sets. *Nat Biotechnol*, *14*(7), 857-861.
- Loukas, A., Selzer, P. M., & Maizels, R. M.** (1998). Characterisation of Tc-cpl-1, a cathepsin L-like cysteine protease from *Toxocara canis* infective larvae. *Mol Biochem Parasitol*, *92*(2), 275-289.
- Lowenberger, C.** (2001). Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*, *31*(3), 219-229.

- Maizels, R. M., Gomez-Escobar, N., Gregory, W. F., Murray, J., & Zang, X.** (2001). Immune evasion genes from filarial nematodes. *Int J Parasitol*, 31(9), 889-898.
- Malawista, S. E., Montgomery, R. R., & van Blaricom, G.** (1992). Evidence for reactive nitrogen intermediates in killing of staphylococci by human neutrophil cytoplasts. A new microbicidal pathway for polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest*, 90(2), 631-636.
- Malecha, J.** (1979). Mise en évidence d'une action du système nerveux central sur les échanges d'eau chez l'Hirudinée Rynchobdelle *Theromyzon tessulatum* (O.F.M). *C. R. Acad. Sc. Paris, série D*, 693-696.
- Malecha, J.** (1983). [Osmoregulation in Hirudinea Rynchobdellida *Theromyzon tessulatum* (O.F.M.). Experimental localization of the secretory zone of a regulation factor of water balance]. *Gen Comp Endocrinol*, 49(3), 344-351.
- Malhotra, R., & Sim, R. B.** (1995). Collectins and viral infection. *Trends Microbiol*, 3(6), 240-244.
- Manoury, B., Gregory, W. F., Maizels, R. M., & Watts, C.** (2001). Bm-CPI-2, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite *Brugia malayi*, inhibits class II MHC-restricted antigen processing. *Curr Biol*, 11(6), 447-451.
- Martin, K. J., Kwan, C. P., O'Hare, M. J., Pardee, A. B., & Sager, R.** (1998). Identification and verification of differential display cDNAs using gene-specific primers and hybridization arrays. *Biotechniques*, 24(6), 1018-1026.
- Mathieu-Daude, F., Cheng, R., Welsh, J., & McClelland, M.** (1996). Screening of differentially amplified cDNA products from RNA arbitrarily primed PCR fingerprints using single strand conformation polymorphism (SSCP) gels. *Nucleic Acids Res*, 24(8), 1504-1507.
- Matsushita, M., & Fujita, T.** (1992). Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med*, 176(6), 1497-1502.
- Matz, M. V., & Lukyanov, S. A.** (1998). Different strategies of differential display: areas of application. *Nucleic Acids Res*, 26(24), 5537-5543.
- McClelland, M., Mathieu-Daude, F., & Welsh, J.** (1995). RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *Trends Genet*, 11(6), 242-246.
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A., Jr.** (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*, 9(1), 4-9.

- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C. A., Jr.** (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640), 394-397.
- Melino, S., Rufini, S., Sette, M., Morero, R., Grottesi, A., Paci, M., & Petruzzelli, R.** (1999). Zn(2+) ions selectively induce antimicrobial salivary peptide histatin- 5 to fuse negatively charged vesicles. Identification and characterization of a zinc-binding motif present in the functional domain. *Biochemistry*, 38(30), 9626-9633.
- Meng, X., Khanuja, B. S., & Ip, Y. T.** (1999). Toll receptor-mediated Drosophila immune response requires Dif, an NF- kappaB factor. *Genes Dev*, 13(7), 792-797.
- Michel, T., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A., & Royet, J.** (2001). Drosophila Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature*, 414(6865), 756-759.
- Miettinen, M., Sareneva, T., Julkunen, I., & Matikainen, S.** (2001). IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes Immun*, 2(6), 349-355.
- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S., & Pesole, G.** (2002). Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol*, 3(3).
- Miller, R. A., Garcia, G., Kirk, C. J., & Witkowski, J. M.** (1997). Early activation defects in T lymphocytes from aged mice. *Immunol Rev*, 160, 79-90.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., & Roch, P.** (1999). Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *J Cell Sci*, 112(Pt 23), 4233-4242.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzet, M., & Roch, P.** (2000a). Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *J Biol Chem*, 275(17), 12954-12962.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Noel, T., Romestand, B., Beauvillain, J. C., Salzet, M., & Roch, P.** (2000b). Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel. *J Cell Sci*, 113(Pt 15), 2759-2769.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., & Roch, P.** (2000c). Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett*, 486(3), 185-190.
- Miura, Y., Kawabata, S., & Iwanaga, S.** (1994). A Limulus intracellular coagulation inhibitor with characteristics of the serpin superfamily. Purification, characterization, and cDNA cloning. *J Biol Chem*, 269(1), 542-547.
- Miyake, K., Yamashita, Y., Ogata, M., Sudo, T., & Kimoto, M.** (1995). RP105, a novel B cell surface molecule implicated in B cell activation, is a member of the leucine-rich repeat protein family. *J Immunol*, 154(7), 3333-3340.

- Montagnani, C., Le Roux, F., Berthe, F., & Escoubas, J. M.** (2001). Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms(1). *FEBS Lett*, 500(1-2), 64-70.
- Mottram, J. C., Brooks, D. R., & Coombs, G. H.** (1998). Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host- parasite interactions. *Curr Opin Microbiol*, 1(4), 455-460.
- Muta, T., & Iwanaga, S.** (1996). The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Curr Opin Immunol*, 8(1), 41-47.
- Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L. P., Allavena, P., & Mantovani, A.** (2000). Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol*, 164(11), 5998-6004.
- Muzio, M., Ni, J., Feng, P., & Dixit, V. M.** (1997). IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL- 1 signaling. *Science*, 278(5343), 1612-1615.
- Nabholz, M., Vives, J., Young, H. M., Meo, T., Miggiano, V., Rijnbeek, A., & Shreffler, D. C.** (1974). Cell-mediated cell lysis in vitro: genetic control of killer cell production and target specificities in the mouse. *Eur J Immunol*, 4(5), 378-387.
- Nakamura, M., Mori, K., Inooka, S., & Nomura, T.** (1985). In vitro production of hydrogen peroxide by the amoebocytes of the scallop, *Patinopecten yessoensis* (Jay). *Dev Comp Immunol*, 9(3), 407-417.
- Nappi, A. J., & Vass, E.** (1998). Hydrogen peroxide production in immune-reactive *Drosophila melanogaster*. *J Parasitol*, 84(6), 1150-1157.
- Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F., & Carton, Y.** (2000). Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide*, 4(4), 423-430.
- Nau, G. J., Richmond, J. F., Schlesinger, A., Jennings, E. G., Lander, E. S., & Young, R. A.** (2002). Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(3), 1503-1508.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., & von Heijne, G.** (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng*, 10(1), 1-6.
- Nonaka, M.** (2001). Evolution of the complement system. *Curr Opin Immunol*, 13(1), 69-73.
- Oduol, F., Xu, J., Niare, O., Natarajan, R., & Vernick, K. D.** (2000). Genes identified by an expression screen of the vector mosquito *Anopheles gambiae* display differential

- molecular immune response to malaria parasites and bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(21), 11397-11402.
- Okamura, N., Tamba, M., Uchiyama, Y., Sugita, Y., Dacheux, F., Syntin, P., & Dacheux, J. L.** (1995). Direct evidence for the elevated synthesis and secretion of procathepsin L in the distal caput epididymis of boar. *Biochim Biophys Acta*, 1245(2), 221-226.
- Olivares Fontt, E., Beschin, A., Van Dijck, E., Vercruyse, V., Bilej, M., Lucas, R., De Baetselier, P., & Vray, B.** (2002). Trypanosoma cruzi is lysed by coelomic cytolytic factor-1, an invertebrate analogue of tumor necrosis factor, and induces phenoloxidase activity in the coelomic fluid of Eisenia foetida foetida. *Dev Comp Immunol*, 26(1), 27-34.
- Omburo, G. A., Jacobitz, S., Torphy, T. J., & Colman, R. W.** (1998). Critical role of conserved histidine pairs HNXXH and HDXXH in recombinant human phosphodiesterase 4A. *Cell Signal*, 10(7), 491-497.
- Ouellette, A. J., Hsieh, M. M., Nosek, M. T., Cano-Gauci, D. F., Huttner, K. M., Buick, R. N., & Selsted, M. E.** (1994). Mouse Paneth cell defensins: primary structures and antibacterial activities of numerous cryptdin isoforms. *Infect Immun*, 62(11), 5040-5047.
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., & Aderem, A.** (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(25), 13766-13771.
- Panyutich, A., Shi, J., Boutz, P. L., Zhao, C., & Ganz, T.** (1997). Porcine polymorphonuclear leukocytes generate extracellular microbicidal activity by elastase-mediated activation of secreted propeptidases. *Infect Immun*, 65(3), 978-985.
- Pennacchio, L. A., Bouley, D. M., Higgins, K. M., Scott, M. P., Noebels, J. L., & Myers, R. M.** (1998). Progressive ataxia, myoclonic epilepsy and cerebellar apoptosis in cystatin B-deficient mice. *Nat Genet*, 20(3), 251-258.
- Pennacchio, L. A., Lehesjoki, A. E., Stone, N. E., Willour, V. L., Virtaneva, K., Miao, J., D'Amato, E., Ramirez, L., Faham, M., Koskiniemi, M., Warrington, J. A., Norio, R., de la Chapelle, A., Cox, D. R., & Myers, R. M.** (1996). Mutations in the gene encoding cystatin B in progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Science*, 271(5256), 1731-1734.
- Pennacchio, L. A., & Myers, R. M.** (1996). Isolation and characterization of the mouse cystatin B gene. *Genome Res*, 6(11), 1103-1109.
- Perregaux, D. G., Bhavsar, K., Contillo, L., Shi, J., & Gabel, C. A.** (2002). Antimicrobial Peptides Initiate IL-1beta Posttranslational Processing: A Novel Role Beyond Innate Immunity. *J Immunol*, 168(6), 3024-3032.

- Petersen, U. M., Bjorklund, G., Ip, Y. T., & Engstrom, Y.** (1995). The dorsal-related immunity factor, Dif, is a sequence-specific trans- activator of Drosophila Cecropin gene expression. *Embo J*, 14(13), 3146-3158.
- Pol, E., & Bjork, I.** (2001). Role of the single cysteine residue, Cys 3, of human and bovine cystatin B (stefin B) in the inhibition of cysteine proteinases. *Protein Sci*, 10(9), 1729-1738.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Huffel, C. V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., & Beutler, B.** (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282(5396), 2085-2088.
- Potempa, J., Korzus, E., & Travis, J.** (1994). The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem*, 269(23), 15957-15960.
- Pujol, N., Link, E. M., Liu, L. X., Kurz, C. L., Alloing, G., Tan, M. W., Ray, K. P., Solari, R., Johnson, C. D., & Ewbank, J. J.** (2001). A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in Caenorhabditis elegans. *Curr Biol*, 11(11), 809-821.
- Pulendran, B., Banchereau, J., Maraskovsky, E., & Maliszewski, C.** (2001). Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol*, 22(1), 41-47.
- Putsep, K., Branden, C. I., Boman, H. G., & Normark, S.** (1999a). Antibacterial peptide from H. pylori. *Nature*, 398(6729), 671-672.
- Putsep, K., Normark, S., & Boman, H. G.** (1999b). The origin of cecropins; implications from synthetic peptides derived from ribosomal protein L1. *FEBS Lett*, 451(3), 249-252.
- Rajeevan, M. S., Ranamukhaarachchi, D. G., Vernon, S. D., & Unger, E. R.** (2001). Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods*, 25(4), 443-451.
- Ramet, M., Manfrulli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B., & Ezekowitz, R. A.** (2002). Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a Drosophila receptor for E. coli. *Nature*, 24, 24.
- Rawlings, N. D., & Barrett, A. J.** (1990). Evolution of proteins of the cystatin superfamily. *J Mol Evol*, 30(1), 60-71.
- Riccio, M., Di Giaimo, R., Pianetti, S., Palmieri, P. P., Melli, M., & Santi, S.** (2001). Nuclear localization of cystatin B, the cathepsin inhibitor implicated in myoclonus epilepsy (EPM1). *Exp Cell Res*, 262(2), 84-94.

- Richman, A. M., Bulet, P., Hetru, C., Barillas-Mury, C., Hoffmann, J. A., & Kafalos, F. C.** (1996). Inducible immune factors of the vector mosquito *Anopheles gambiae*: biochemical purification of a defensin antibacterial peptide and molecular cloning of preprodefensin cDNA. *Insect Mol Biol*, 5(3), 203-210.
- Riese, R. J., & Chapman, H. A.** (2000). Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr Opin Immunol*, 12(1), 107-113.
- Ritonja, A., Coetzer, T. H., Pike, R. N., & Dennison, C.** (1996). The amino acid sequences, structure comparisons and inhibition kinetics of sheep cathepsin L and sheep stefin B. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 114(2), 193-198.
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., & Bazan, J. F.** (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(2), 588-593.
- Sachs, A. B., & Deardorff, J. A.** (1992). Translation initiation requires the PAB-dependent poly(A) ribonuclease in yeast. *Cell*, 70(6), 961-973.
- Sachs, A. B., Sarnow, P., & Hentze, M. W.** (1997). Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell*, 89(6), 831-838.
- Salzet, M.** (2001a). Anticoagulants and inhibitors of platelet aggregation derived from leeches. *FEBS Lett*, 492(3), 187-192.
- Salzet, M.** (2001b). Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. *Trends Immunol*, 22(6), 285-288.
- Samach, A., Broday, L., Hareven, D., & Lifschitz, E.** (1995). Expression of an amino acid biosynthesis gene in tomato flowers: developmental upregulation and MeJa response are parenchyma-specific and mutually compatible. *Plant J*, 8(3), 391-406.
- Samach, A., Hareven, D., Gutfinger, T., Ken-Dror, S., & Lifschitz, E.** (1991). Biosynthetic threonine deaminase gene of tomato: isolation, structure, and upregulation in floral organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(7), 2678-2682.
- Sanchez, C., & Changeux, J. P.** (1966). [On the properties of biosynthetic L-threonine desaminase of a mutant of *E. coli* K 12]. *Bull Soc Chim Biol*, 48(5), 705-713.
- Sato, S., Nomura, F., Kawai, T., Takeuchi, O., Muhlradt, P. F., Takeda, K., & Akira, S.** (2000). Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol*, 165(12), 7096-7101.
- Sawyer, R. T.** (1986). *Leech Biology and Behaviour*.
- Schaller, A., & Frasson, D.** (2001). Induction of wound response gene expression in tomato leaves by ionophores. *Planta*, 212(3), 431-435.

- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., & Brown, P. O.** (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270(5235), 467-470.
- Schittek, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Schirle, M., Schroeder, K., Blin, N., Meier, F., Rassner, G., & Garbe, C.** (2001). Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol*, 2(12), 1133-1137.
- Schneider, O., & Zelck, U. E.** (2001). Differential display analysis of hemocytes from schistosome-resistant and schistosome-susceptible intermediate hosts. *Parasitol Res*, 87(6), 489-491.
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., & Kirschning, C. J.** (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem*, 274(25), 17406-17409.
- Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y., & Shinozaki, K.** (2001). Monitoring the Expression Pattern of 1300 Arabidopsis Genes under Drought and Cold Stresses by Using a Full-Length cDNA Microarray. *Plant Cell*, 13(1), 61-72.
- Shankland, M., & Seaver, E. C.** (2000). Evolution of the bilaterian body plan: What have we learned from annelids? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(9), 4434-4437.
- Smith, A. M., Dalton, J. P., Clough, K. A., Kilbane, C. L., Harrop, S. A., Hole, N., & Brindley, P. J.** (1994). Adult *Schistosoma mansoni* express cathepsin L proteinase activity. *Mol Biochem Parasitol*, 67(1), 11-19.
- Smith, A. M., Dowd, A. J., McGonigle, S., Keegan, P. S., Brennan, G., Trudgett, A., & Dalton, J. P.** (1993). Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol*, 62(1), 1-8.
- Smith, B., J.** (2002). Protein Sequencing Protocols (2nd edition), 211.
- Smith, T. F., & Waterman, M. S.** (1981). Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol*, 147(1), 195-197.
- Soderhall, K., & Cerenius, L.** (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol*, 10(1), 23-28.
- Sohnle, P. G., Hunter, M. J., Hahn, B., & Chazin, W. J.** (2000). Zinc-reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14). *J Infect Dis*, 182(4), 1272-1275.

- Song, Y. L., & Hsieh, Y. T.** (1994). Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Dev Comp Immunol*, 18(3), 201-209.
- Sorensen, O., Arnljots, K., Cowland, J. B., Bainton, D. F., & Borregaard, N.** (1997). The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. *Blood*, 90(7), 2796-2803.
- Stubbs, M. T., Laber, B., Bode, W., Huber, R., Jerala, R., Lenarcic, B., & Turk, V.** (1990). The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction. *Embo J*, 9(6), 1939-1947.
- Suzuki, T., Hashimoto, S., Toyoda, N., Nagai, S., Yamazaki, N., Dong, H. Y., Sakai, J., Yamashita, T., Nukiwa, T., & Matsushima, K.** (2000). Comprehensive gene expression profile of LPS-stimulated human monocytes by SAGE. *Blood*, 96(7), 2584-2591.
- Tarver, A. P., Clark, D. P., Diamond, G., Russell, J. P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Cohen, K. S., Jones, D. E., Sweeney, R. W., Wines, M., Hwang, S., & Bevens, C. L.** (1998). Enteric beta-defensin: molecular cloning and characterization of a gene with inducible intestinal epithelial cell expression associated with *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun*, 66(3), 1045-1056.
- Tasiemski, A.** (2001). Caractérisation et rôle des peptides antimicrobiens dans l'immunité de la sangsue *Theromyzon tessulatum*. Thèse soutenue en décembre 2001 à l'Université des Sciences et Technologies de Lille.
- Tasiemski, A., Vandenbulcke, F., Mitta, G., Sautiere, P. E., & Salzet, M.** (2002). Inducible expression of Theromacin, a novel cystein rich antibacterial peptide in bacteria challenged leech, *Theromyzon tessulatum*. article en préparation.
- Tauber, A. I., & Chernyak, L.** (1989). The birth of immunology. II. Metchnikoff and his critics. *Cell Immunol*, 121(2), 447-473.
- Territo, M. C., Ganz, T., Selsted, M. E., & Lehrer, R.** (1989). Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J Clin Invest*, 84(6), 2017-2020.
- Thiel, S.** (1992). Mannan-binding protein, a complement activating animal lectin. *Immunopharmacology*, 24(2), 91-99.
- Thiele, U., Auerswald, E. A., Gebhard, W., Assfalg-Machleidt, I., Popovic, T., & Machleidt, W.** (1988). Inhibitorily active recombinant human stefin B. Gene synthesis,

- expression and isolation of an inhibitory active MS-2 pol-stefin B fusion protein and preparation of Des[Met1,2(2)]stefin B. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 369(10), 1167-1178.
- Thoma-Uszynski, S., Stenger, S., Takeuchi, O., Ochoa, M. T., Engele, M., Sieling, P. A., Barnes, P. F., Rollinghoff, M., Bolcskei, P. L., Wagner, M., Akira, S., Norgard, M. V., Belisle, J. T., Godowski, P. J., Bloom, B. R., & Modlin, R. L.** (2001). Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science*, 291(5508), 1544-1547.
- Thomma, B. P., Eggermont, K., Tierens, K. F., & Broekaert, W. F.** (1999). Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of Arabidopsis to infection by Botrytis cinerea. *Plant Physiol*, 121(4), 1093-1102.
- Tobias, P. S., Soldau, K., & Ulevitch, R. J.** (1986). Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med*, 164(3), 777-793.
- Trifillis, P., Day, N., & Kiledjian, M.** (1999). Finding the right RNA: identification of cellular mRNA substrates for RNA-binding proteins. *Rna*, 5(8), 1071-1082.
- Tryselius, Y., & Hultmark, D.** (1997). Cysteine proteinase 1 (CP1), a cathepsin L-like enzyme expressed in the Drosophila melanogaster haemocyte cell line mbn-2. *Insect Mol Biol*, 6(2), 173-181.
- Turk, B., Colic, A., Stoka, V., & Turk, V.** (1994). Kinetics of inhibition of bovine cathepsin S by bovine stefin B. *FEBS Lett*, 339(1-2), 155-159.
- Turk, V., & Bode, W.** (1991). The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett*, 285(2), 213-219.
- Tzou, P., De Gregorio, E., & Lemaitre, B.** (2002). How Drosophila combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol*, 5(1), 102-110.
- Tzou, P., Ohresser, S., Ferrandon, D., Capovilla, M., Reichhart, J. M., Lemaitre, B., Hoffmann, J. A., & Imler, J. L.** (2000). Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in Drosophila surface epithelia. *Immunity*, 13(5), 737-748.
- Uchiyama, Y.** (2001). Autophagic cell death and its execution by lysosomal cathepsins. *Arch Histol Cytol*, 64(3), 233-246.
- Ulevitch, R. J., & Tobias, P. S.** (1999). Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol*, 11(1), 19-22.
- Underhill, D. M., & Ozinsky, A.** (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol*, 14(1), 103-110.

- Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M., & Aderem, A.** (1999). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*, *401*(6755), 811-815.
- Urwin, P. E., Lilley, C. J., McPherson, M. J., & Atkinson, H. J.** (1997). Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic Arabidopsis expressing a modified plant cystatin. *Plant J*, *12*(2), 455-461.
- Utans-Schneitz, U., Lorez, H., Klinkert, W. E., da Silva, J., & Lesslauer, W.** (1998). A novel rat CC chemokine, identified by targeted differential display, is upregulated in brain inflammation. *J Neuroimmunol*, *92*(1-2), 179-190.
- Uttenweiler-Joseph, S., Moniatte, M., Lagueux, M., Van Dorsselaer, A., Hoffmann, J. A., & Bulet, P.** (1998). Differential display of peptides induced during the immune response of Drosophila: a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(19), 11342-11347.
- Valore, E. V., Martin, E., Harwig, S. S., & Ganz, T.** (1996). Intramolecular inhibition of human defensin HNP-1 by its propiece. *J Clin Invest*, *97*(7), 1624-1629.
- Valore, E. V., Park, C. H., Quayle, A. J., Wiles, K. R., McCray, P. B., Jr., & Ganz, T.** (1998). Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest*, *101*(8), 1633-1642.
- van Eijk, M., & de Groot, C.** (1999). Germinal center B cell apoptosis requires both caspase and cathepsin activity. *J Immunol*, *163*(5), 2478-2482.
- Verbanac, D., Zanetti, M., & Romeo, D.** (1993). Chemotactic and protease-inhibiting activities of antibiotic peptide precursors. *FEBS Lett*, *317*(3), 255-258.
- Verdot, L., Lalmanach, G., Vercruyse, V., Hartmann, S., Lucius, R., Hoebeke, J., Gauthier, F., & Vray, B.** (1996). Cystatins up-regulate nitric oxide release from interferon-gamma-activated mouse peritoneal macrophages. *J Biol Chem*, *271*(45), 28077-28081.
- Verdot, L., Lalmanach, G., Vercruyse, V., Hoebeke, J., Gauthier, F., & Vray, B.** (1999). Chicken cystatin stimulates nitric oxide release from interferon-gamma-activated mouse peritoneal macrophages via cytokine synthesis. *Eur J Biochem*, *266*(3), 1111-1117.
- Vizioli, J., Bulet, P., Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Muller, H. M., & Dimopoulos, G.** (2001). Gambicin: a novel immune responsive antimicrobial peptide from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(22), 12630-12635.
- Warren, R. F., Henk, A., Mowery, P., Holub, E., & Innes, R. W.** (1998). A mutation within the leucine-rich repeat domain of the Arabidopsis disease resistance gene RPS5

- partially suppresses multiple bacterial and downy mildew resistance genes. *Plant Cell*, 10(9), 1439-1452.
- Watts, C.** (2001). Antigen processing in the endocytic compartment. *Curr Opin Immunol*, 13(1), 26-31.
- Weck, P. K., Apperson, S., May, L., & Stebbing, N.** (1981). Comparison of the antiviral activities of various cloned human interferon-alpha subtypes in mammalian cell cultures. *J Gen Virol*, 57(Pt 1), 233-237.
- Weiske, J., & Wiesner, A.** (1999). Stimulation of NO synthase activity in the immune-competent lepidopteran *Estigmene acraea* hemocyte line. *Nitric Oxide*, 3(2), 123-131.
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S. P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., & Baker, B.** (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*, 78(6), 1101-1115.
- Wormington, M., Searfoss, A. M., & Hurney, C. A.** (1996). Overexpression of poly(A) binding protein prevents maturation-specific deadenylation and translational inactivation in *Xenopus* oocytes. *Embo J*, 15(4), 900-909.
- Wrigley, D. M., & Saluk, P. H.** (1981). Induction of C3b-mediated phagocytosis in macrophages by distinct populations of lipopolysaccharide-stimulated lymphocytes. *Infect Immun*, 34(3), 780-786.
- Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., Chen, Q., Buffo, M. J., Shogan, J., Anderson, M., Schroder, J. M., Wang, J. M., Howard, O. M., & Oppenheim, J. J.** (1999). Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*, 286(5439), 525-528.
- Yang, H., Duckett, C. S., & Lindsten, T.** (1995). iPABP, an inducible poly(A)-binding protein detected in activated human T cells. *Mol Cell Biol*, 15(12), 6770-6776.
- Yoshida, H., Kinoshita, K., & Ashida, M.** (1996). Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem*, 271(23), 13854-13860.
- Young, N. D.** (2000). The genetic architecture of resistance. *Curr Opin Plant Biol*, 3(4), 285-290.
- Zang, X., & Maizels, R. M.** (2001). Serine proteinase inhibitors from nematodes and the arms race between host and pathogen. *Trends Biochem Sci*, 26(3), 191-197.
- Zasloff, M.** (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389-395.

- Zhao, C., Wang, I., & Lehrer, R. I.** (1996). Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett*, 396(2-3), 319-322.
- Zigheboim, J., Bonavida, B., & Fahey, J. L.** (1973). Evidence for several cell populations active in antibody dependent cellular cytotoxicity. *J Immunol*, 111(6), 1737-1742.
- Zigheboim, J., Gale, R. P., Chiu, A., Bonavida, B., Ossorio, R. C., & Fahey, J. L.** (1974). Antibody dependent cellular cytotoxicity: cytotoxicity mediated by non t-lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol*, 3(2), 193-200.

Présentations scientifiques

Lefebvre C, Cocquerelle C, Salzet M et Malecha J. Recherche des modulations transcriptionnelles, traductionnelles et post-traductionnelles au cours de la réponse immune chez la sangsue *Theromyzon tessulatum*. (octobre 1998) Réseau LARC Neurosciences, Caen France (communication affichée).

Lefebvre C, Czeszak X, Cocquerelle C, Lemoine J et Salzet M. Recherche des modulations transcriptionnelles par DDRT-PCR au cours de la réponse immune chez la sangsue *Theromyzon tessulatum*. (septembre 1999) Congrès d'immunologie des Invertébrés, Mont Sainte Odile-Strasbourg France (communication affichée).

Cocquerelle C, **Lefebvre C** et Salzet M. *Differential Display* RT-PCR et cytokines : Application aux modèles Vertébrés et Invertébrés. (novembre 1999) Organisation du 18eme atelier technologique de la Société Française d'Immunologie (18 th technical workshop). Lille France (communication orale).

Lefebvre C, Czeszak X, Cocquerelle C, Lemoine J, Rolando C et Salzet M. Utilisation des techniques de *Differential Display* RT-PCR (DDRT-PCR) et de DD-HPLC couplé à l'analyse MALDI-TOF pour l'étude des molécules impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire. (juillet 2000) 17emes Journées de Société Française de Spectrométrie de Masse, Villeneuve d'ascq France (communication affichée).

Lefebvre C, Cocquerelle C et Salzet M. Recherche des modulations d'expression génique au cours de la réponse immune chez la sangsue *Theromyzon tessulatum*. (septembre 2001) Forum des jeunes chercheurs, Strasbourg France (communication orale).

Lefebvre C, Cocquerelle C et Salzet M. Up-regulation of Cystatin B after a bacterial challenge in the Leech *Theromyzon tessulatum*. (septembre 2001) Réunion d'immunologie des Invertébrés, Villeneuve d'ascq France (communication orale).

ANNEXE 1

	T	C	A	G	
T	TTT Phe F	TCT Ser S	TAT Tyr Y	TGT Cys C	T
	TTC Phe F	TCC Ser S	TAC Tyr Y	TGC Cys C	C
	TTA Leu L	TCA Ser S	TAA Stop	TGA Stop	A
	TTG Leu L	TCG Ser S	TAG Stop	TGG Trp W	G
C	CTT Leu L	CCT Pro P	CAT His H	CGT Arg R	T
	CTC Leu L	CCC Pro P	CAC His H	CGC Arg R	C
	CTA Leu L	CCA Pro P	CAA Gln Q	CGA Arg R	A
	CTG Leu L	CCG Pro P	CAG Gln Q	CGG Arg R	G
A	ATT Ile I	ACT Thr T	AAT Asn N	AGT Ser S	T
	ATC Ile I	ACC Thr T	AAC Asn N	AGC Ser S	C
	ATA Ile I	ACA Thr T	AAA Lys K	AGA Arg R	A
	AUG Met M	ACG Thr T	AAG Lys K	AGG Arg R	G
G	GTT Val V	GCT Ala A	GAT Asp D	GGT Gly G	T
	GTC Val V	GCC Ala A	GAC Asp D	GGC Gly G	C
	GTA Val V	GCA Ala A	GAA Glu E	GGA Gly G	A
	GTG Val V	GCG Ala A	GAG Glu E	GGG Gly G	G

A	Ala	Alanine
C	Cys	Cystéine
D	Asp	Acide aspartique
E	Glu	Acide glutamique
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
M	Met	Méthionine
N	Asn	Asparagine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Sérine
T	Thr	Thréonine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

ANNEXE 2

Algorithme statistique CyberT (National Center for Genome Resources, Santa Fe, NM, USA)
<http://genomics.biochem.uci.edu/cgi-bin/genex/cybert/CyberT-7.0.form.pl?DATATYPE=Pen>

BLAST P 2.2.2, BLAST X 2.1.2, BLAST N 2.2.2 (NCBI, NLM, NIH, Bethesda, MD, USA)
www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

Bic 2 (EMBL, EBI, Heidelberg, Allemagne)
www.ebi.ac.uk/bic_sw/

SignalP V1.1 (Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark)
<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

Primer3 (WI, Whitehead Institute/MIT, USA)
http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi/

MWG-Biotech AG (Ebersberg, Allemagne)
<http://www.mwg-biotech.com/html/index.shtml>

Multalin (Multiple sequence alignment, INRA, Toulouse, France)
<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

Genscan (The New GENSCAN, MIT, USA)
<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>

DOMAINES Cystatines (PFAM, Sanger Institute, Cambridge, UK)
<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF00031>
<http://www.expasy.ch/cgi-bin/niceprot.pl?Q9FXN6> (*Arabidopsis thaliana*)
<http://www.expasy.ch/cgi-bin/niceprot.pl?O24462> (*Pyrus communis*)
<http://www.expasy.ch/cgi-bin/niceprot.pl?Q9M4Q4> (*Manihot esculenta*)
<http://www.expasy.ch/cgi-bin/niceprot.pl?Q06445> (*Vigna unguiculata*)
<http://www.expasy.ch/cgi-bin/niceprot.pl?Q9VFI3> (*Drosophila melanogaster*)

Cystatine *Crassostrea virginica*
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=nucleotide&list_uids=14581004&dopt=GenBank

DOMAINES Cystéines protéases (PFAM, Sanger Institute, Cambridge, UK)
<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF00112>

Actine 2 *Crassostrea gigas*
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Nucleotide&list_uids=18565103&dopt=GenBank

