

# ANALYSE PAR LC-MS/MS HAUTE RÉOLUTION DU COMPLEXE DE LA CASPASE 8 LORS DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE ANTIBACTÉRIENNE CHEZ LA DROSOPHILE

Yann Verdier<sup>1</sup>, Hidehiro Fukuyama<sup>2</sup>, Iman Haddad<sup>1</sup>, Jean Rossier<sup>3</sup>, Jules Hoffmann<sup>2</sup>, Joëlle Vinh<sup>1</sup>

1 - ESPCI-ParisTech, Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique, USR 3149 CNRS ParisTech, 10 rue Vauquelin 75231 Paris, France

2 - Centre National de La Recherche Scientifique, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue René Descartes, 67084Strasbourg

3 - ESPCI-ParisTech, Neurobiologie et Diversité Cellulaire, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris, France

La drosophile est un modèle intéressant pour l'étude de la réponse immunitaire innée. Les travaux, essentiellement génétiques, menés sur ce modèle ont montrés que deux voies de signalisation intracellulaires contrôlent l'expression des gènes après une infection bactérienne : (1) la voie Toll, activée après infection par des champignons ou des bactéries Gram-négatives, et (2) la voie Imd, en réponse aux infections par des bactéries négatives à la coloration de Gram<sup>[1]</sup>. Seule une douzaine de protéines ont été décrites comme étant impliquées dans cette voie, dont la protéine Dredd, orthologue de la caspase-8. Ce travail vise tout d'abord à décrire le complexe moléculaire associé à Dredd.

La description d'un complexe moléculaire nécessite sa purification dans un état physiologique reflétant la réalité, puis l'identification de ses différents composants. Les méthodes de purification d'affinité avec des systèmes streptavidine-biotine sont fréquemment utilisées dans ce but. Cependant, en raison de l'extraordinaire stabilité de l'interaction entre la streptavidine et la biotine, l'élution de protéines marquées à la biotine reste délicat. Les critères de validation des protéines identifiées sont également importants.

Dans ce travail, nous avons transfecté des cellules de drosophile avec un vecteur d'ADN contenant la protéine Dredd marquée à la biotine. Après purification d'affinité, différentes stratégies ont été testées, et les protéines identifiées par LC-MS/MS. Un protocole de protéolyse réalisée directement sur billes a permis l'identification du plus grand nombre de protéines associées à Dredd, comparé à des protocoles d'élution standards.

Un essai fonctionnel a montré qu'une large proportion des protéines spécifiquement identifiées dans l'échantillon Dredd est impliquée dans l'activation de la voie Imd. Ces protéines ont déjà été décrites comme ayant des fonctions dans la réponse immunitaire (BG4, Q9VP57), stress (HSP7C, Q9VXQ5), fonction structurale (TBB1, CP190), biosynthèse (Q9W1B9) et fonction redox (SODC)<sup>[2]</sup>.

Pour obtenir une description plus précise de la voie Imd, les dix autres acteurs canoniques de cette voie ont été clonés, et leurs protéines associées après un challenge bactérien identifiés par la même stratégie. De façon globale, l'analyse des composants de ces complexes permet une description beaucoup plus fine de cette cascade de signalisation et suggère de nouveaux mécanismes moléculaires d'activation de cette voie de signalisation.

---

<sup>1</sup> Lemaître B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* 2007;25:697–743.

<sup>2</sup> Fukuyama H, Ndiaye S, Hoffmann J, Rossier J, Liuu S, Vinh J, Verdier Y. On-bead tryptic proteolysis: An attractive procedure for LC-MS/MS analysis of the *Drosophila* caspase 8 protein complex during immune response against bacteria. *J Proteomics*. 2012 Mar 17.