




Open Archive Toulouse Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 25298

To cite this version:

Bessière, Pierre . *Inhibition de la signalisation des TLR par les phospholipides oxydés*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2017, 86 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

INHIBITION DE LA SIGNALISATION DES TLR PAR LES PHOSPHOLIPIDES OXYDES

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

BESSIERE Pierre

Né, le 14 décembre 1992 à Pau (64)

Directeur de thèse : M. Romain VOLMER

JURY

PRESIDENT :
M. Bruno SEGUI

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Romain VOLMER
Mme Séverine BOULLIER

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.

Mise à jour : 03/11/2017

DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN

| ELEVAGE ET PRODUITS/SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRAIRE | SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES | SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS |
|--|--|---|
| <p>Responsable : M. SANS</p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>ÉPIDÉMIOLOGIE :</u> Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIÈNE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGERE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIÈRE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, PR M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMÉLIORATION GÉNÉTIQUE ÉCONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p> | <p>Responsable : Mme GAYRARD</p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, PR Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR M. GAIDE Nicolas, AERC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Héléne, MC</p> <p><u>BIOSTATISTIQUES :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE –PHARMACOLOGIE THÉRAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p> | <p>Responsable : Mme CADIERGUES</p> <p><u>ANESTHÉSIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MÉDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MÉDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE. :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES ÉQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p> |

Remerciements

À Monsieur le Professeur Bruno Ségui,
Professeur de la faculté de Pharmacie, Université de Toulouse III
Biologie cellulaire

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse. Veuillez accepter mes hommages respectueux.

À Monsieur le Docteur Romain Volmer,
Maître de conférences de l'École Nationale vétérinaire de Toulouse
Virologie, infectiologie

Pour m'avoir confié ce sujet, pour sa gentillesse, sa disponibilité, son aide et sa patience, pour m'avoir fait aimer la recherche et pour me donner la chance de continuer dans cette voie, car sans ses efforts, je n'en serais pas là. Mes remerciements les plus sincères et toute ma reconnaissance.

À Madame la Docteur Séverine Boullier,
Maître de conférences de l'École Nationale vétérinaire de Toulouse
Immunologie

*Qui me fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.
Veuillez accepter mes plus sincères remerciements.*

Table des Matières

| | |
|---|----|
| Listes des figures | 9 |
| Listes des abréviations | 10 |
| Introduction | 12 |
| Première partie : étude bibliographique | 15 |
| I. Les TLR, sentinelles de l'immunité | 15 |
| A. La découverte des TLR..... | 15 |
| B. Les cascades de signalisation | 17 |
| 1. Différents TLR, différents PAMP | 17 |
| 2. Dimérisation des TLR | 21 |
| 3. Les voies de signalisation des TLR | 21 |
| II. Lipides et inflammation | 26 |
| A. Implication des lipides dans les maladies inflammatoires | 26 |
| B. Les lipides membranaires comme modulateurs des voies de signalisation inflammatoires | 28 |
| 1. Effet proinflammatoire des lipides | 28 |
| 2. Effet anti-inflammatoire des lipides..... | 30 |
| 3. Implication des dérivés de l'acide arachidonique dans les voies de signalisation inflammatoires | 32 |
| C. Rôle des TLR dans le développement de l'obésité et du diabète..... | 33 |
| E. Les TLR comme modulateurs du métabolisme lipidique | 34 |
| III. Mécanismes impliqués dans la régulation de l'inflammation par les lipides | 35 |
| A. Homologie de structure entre les lipides et les ligands des TLR | 35 |
| B. Action sur les voies de signalisation intracellulaires des TLR..... | 36 |
| C. Modifications de la composition et de la fluidité membranaires..... | 37 |
| 1. Les TLR, des protéines en constante interaction avec les lipides | 37 |
| 2. Impact des perturbations de la composition lipidique sur la signalisation TLR | 39 |
| Deuxième partie : étude expérimentale | 42 |
| I. Matériels et méthodes | 42 |
| A. Traitement à l'oxPAPC de cellules THP1 | 42 |
| 1. Culture des cellules THP1 | 42 |
| 2. Détermination des concentrations optimales en ligands des TLR..... | 42 |
| 3. Préparation de l'oxPAPC | 43 |
| 4. Stimulation à l'oxPAPC et aux différents ligands des TLR | 43 |
| B. Obtention d'une lignée Fip-In avec le TLR4 tronqué et pNiFty2-SEAP | 43 |
| 1. Création d'un plasmide avec la séquence du TLR4 tronqué | 43 |
| 2. Obtention de cellules Fip-In TRex exprimant le TLR4 tronqué | 44 |
| 2. Réalisation d'une deuxième transfection avec pNiFty2-SEAP | 48 |
| 3. Stimulation à l'oxPAPC..... | 50 |

| | | |
|------|---|----|
| C. | Co-immunoprécipitation de cellules BAF3 | 50 |
| 1. | Culture des cellules | 50 |
| 2. | Préparation des tampons | 51 |
| 3. | Stimulation des cellules | 51 |
| 4. | Protocole de lyse cellulaire | 51 |
| 5. | Protocole de d'immunoprécipitation GFP | 51 |
| 6. | Utilisation de GFP-Trap® | 52 |
| 7. | Protocole de western blot GFP | 52 |
| D. | Traitement à l'oxPAPC de macrophages et FRET | 53 |
| 1. | Culture des cellules | 53 |
| 2. | Préparation des cellules pour le FRET | 53 |
| 3. | Analyse par cytométrie en flux et FRET | 54 |
| II. | Résultats | 55 |
| A. | L'oxPAPC est un inhibiteur de la signalisation des TLR | 55 |
| B. | Choix de clones Flp-In TRex | 57 |
| C. | L'oxPAPC est anti-inflammatoire chez les cellules Flp-In TRex | 59 |
| D. | Co-immunoprécipitations sur des cellules Ba/F3 | 60 |
| E. | Réalisation de FRET sur des macrophages | 63 |
| III. | Discussion | 65 |
| | Conclusion | 71 |
| | Bibliographie | 75 |

Listes des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : génération d'oxPAPC | 14 |
| Figure 2 : structure du complexe TLR4-MD2-LPS en vue latérale | 19 |
| Figure 3 : représentation des ligands des TLR étudiés dans le cadre de ces travaux | 20 |
| Figure 4 : vue d'ensemble des voies de signalisation des TLR | 26 |
| Figure 5 : synthèse des médiateurs inflammatoires dérivés de l'acide arachidonique | 32 |
| Figure 6 : interactions membranaires avec les TLR et leurs protéines associées..... | 39 |
| Figure 7 : exemples des conséquences que peuvent avoir les modifications de la composition lipidique membranaire. | 40 |
| Figure 8 : schéma du gène codant pour le TLR4 tronqué, l'étiquette FLAG et le peptide signal | 43 |
| Figure 9 : schémas du TLR4 sauvage et du TLR4 tronqué | 44 |
| Figure 10 : insertion du plasmide pcDNA5/FRT/TO | 45 |
| Figure 11 : représentation des principales étapes de la sélection antibiotique..... | 46 |
| Figure 12 : carte du plasmide pNiFty2-SEAP (InvivoGen)..... | 49 |
| Figure 13 : résumé des différentes étapes réalisées sur les cellules Flp-In Trex..... | 50 |
| Figure 14 : expression du gène rapporteur de NF- κ B suite aux stimulations des TLR en présence d'oxPAPC..... | 56 |
| Figure 15 : conformations possibles du TLR4 tronqué | 57 |
| Figure 16 : résultats des tests de sensibilité à la zéocine et des western blot FLAG faisant suite à l'immunoprécipitation FLAG chez les clones Flp-In TRex ayant été transfectés avec le plasmide contenant le gène du TLR4 tronqué..... | 58 |
| Figure 17 : expression du gène rapporteur de NF- κ B chez les cellules Flp-In TRex doublement transfectés suite au traitement à l'oxPAPC..... | 59 |
| Figure 18 : western blot GFP suite à une immunoprécipitation GFP avec tampon de lyse n°1 | 60 |
| Figure 19 : western blot GFP, utilisation du tampon de lyse n°2 | 61 |
| Figure 20 : western blot GFP et FLAG, utilisation du tampon de lyse n°2 et d'un nouvel anticorps | 61 |
| Figure 21 : western blot anti GFP et anti FLAG suite à l'utilisation de GFP-Trap® ... | 62 |
| Figure 22 : vérification de l'efficacité des marquages des macrophages BEI par les anticorps Alexa Fluor® 405 et 488 | 63 |
| Figure 23 : résultats des analyses de cytométrie en flux et de FRET sur des macrophages..... | 64 |
| Figure 24 : exemple de co-immunoprécipitation sur le TLR4 | 66 |
| Figure 25 : conformations possibles des TLR..... | 67 |
| Figure 26 : fluorescence par transfert d'énergie chez le TLR4 | 67 |
| Figure 27 : spectres d'excitation et d'émission des anticorps Alexa Fluor® utilisés.. | 68 |

Listes des abréviations

| | |
|---------------|--|
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ARN | Acide ribonucléique |
| BP | Boîte de Pétri |
| BSA | Bovine serum albumine |
| CD | Cluster de différenciation |
| CMH | Complexe majeur d'histocompatibilité |
| COX | Cyclo-oxygénase |
| DAMP | Danger associated molecular pattern |
| DMEM | Dulbecco's modified eagle medium |
| EDTA | Éthylène-diamine-tétra-acétique acide édétique |
| EFGR | Epidermal growth factor receptor |
| FACS | Fluorescence-activated cell sorting |
| FRET | Fluorescence resonance energy transfert |
| GFP | Green fluorescent protein |
| IKK | I κ B kinase |
| IL | Interleukine |
| INF | Interféron |
| IRAK | IL-1R-associated kinase |
| IRF3 | IFN regulatory factor 3 |
| LBP | LPS binding protein |
| LDL | Low density lipo-protein |
| LPS | Lipo-polysaccharide |
| LRR | Leucin rich repeat |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase |
| MCP1 | Monocyte chimoattractant protein 1 |
| MD2 | Myeloid differentiation protein 2 |
| Myd88 | Myeloid differentiation primary response gene 88 |
| NADPH | Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite |
| NEMO | NF κ B essential modulator |
| NF κ B | Nuclear factor kappa B |
| NLR | NOD-like receptor |
| Nrf2 | NF E2-related factor 2 |
| oxPAPC | 1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine oxydé |
| PAMP | Pathogen-associated molecular pattern |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PEIPC | 1-palmitoyl-2-(5,6)-epoxyisoprostane E ₂ -sn-glycero-3-phosphocholine |
| PLA2 | Phospholipase A |
| POVPC | 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphocoline |

| | |
|---------|--|
| PRR | Pattern recognition receptor |
| RIP | Receptor-interacting serine/threonine-protein |
| RLR | RIG-1-like receptor |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute Medium |
| SMPDL3B | Sphingomyelin phosphodiesterase acide like 3B |
| TAB | TAK1 binding protein |
| TAK1 | Transforming growth factor beta-activated kinase 1 |
| TBS | Tris buffered saline |
| TBST | Tris buffered saline with tween |
| TGS | Triglycine sulfate |
| TIR | Toll IL-1 receptor |
| TIRAP | Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptator protein |
| TLR | Toll-like receptor |
| TNF | Tumor necrosis factor |
| TRADD | Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein |
| TRAF | TNF receptor-associated factor |
| TRAM | TRIF-related adaptator molecule |
| TRIF | Toll-interleukin 1 receptor -domain-containing adaptater-inducing interferon β |
| UPR | Unfolded protein response |

Introduction

Les Toll-like receptors (TLR) sont des protéines transmembranaires exprimées notamment par les cellules de l'immunité, comme les macrophages, les lymphocytes ou encore les cellules dendritiques, mais également par d'autres types cellulaires, comme les fibroblastes ou les cellules épithéliales en contact avec le milieu extérieur — par exemple les cellules épithéliales pulmonaires (McClure, Massari 2014). Ils jouent un rôle de sentinelle du système immunitaire, du fait de leur capacité à reconnaître des motifs microbiens conservés, autrement appelés les PAMP (pathogen-associated molecular pattern), et d'entraîner ensuite une réponse immunitaire, via une cascade de signalisation menant à la production d'interféron de type 1 et/ou de cytokines inflammatoires. Ces motifs sont des lipides, des lipoprotéines, des protéines et des acides nucléiques, qu'ils proviennent de bactéries, de virus, de parasites, de champignons ou de l'hôte lui-même. On distingue deux catégories de TLR : ceux présents à la surface cellulaire, dans la membrane plasmique, et ceux présents à l'intérieur des cellules, dans des endosomes, des lysosomes ou des endolysosomes.

Il s'agit plus exactement de récepteurs transmembranaires de type I, comprenant un domaine de liaison extracellulaire avec des leucin-rich repeats (LRR), un seul domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire dénommé TIR pour Toll-Interleukin-1 Receptor. Ce domaine présente des similitudes avec la protéine Toll de *Drosophila melanogaster*, activée par des ligands endogènes et impliquée dans le développement ainsi que dans l'immunité innée de cet insecte.

On dénombre dix TLR différents chez l'homme et douze chez la souris. Les TLR 1 à 9 sont conservés chez ces deux espèces et les TLR 11, 12 et 13 ont disparu du génome humain. Ces récepteurs appartiennent à la grande famille des Pattern Recognition Receptors (PRR), qui comprend également les RIG-1-Like Receptors (RLR) et les NOD-Like Receptors (NLR) (Kawai, Akira 2010).

Si les TLR sont absolument indispensables à la survie, ils peuvent avoir des effets délétères en contribuant à des maladies telles que l'inflammation chronique et à des maladies auto-immunes. Les sociétés modernes ont vu l'émergence de

nouvelles maladies et l'obésité est un problème auquel elles doivent faire face. Selon l'organisation mondiale de la santé, environ 700 millions de personnes étaient obèses en 2015 (*WHO / Obesity and overweight*). L'obésité est associée à divers troubles de la santé et ces derniers ont vu leur prévalence augmenter en parallèle de celle de l'obésité, les principaux étant les maladies cardiovasculaires, le diabète sucré de type 2, la stéatose hépatique et certains cancers.

Concernant le diabète sucré de type 2, l'inflammation est un des principaux mécanismes menant à la résistance à l'insuline, ce processus étant exacerbé lorsque le régime alimentaire est riche en matières grasses (Ferreira et al. 2011). Or, il s'avère que l'obésité est un état d'inflammation chronique à bas bruit, caractérisé notamment par une augmentation de l'expression et de la libération de cytokines comme le TNF-alpha et l'IL6, par l'activation de voies de signalisation inflammatoires — comme la réponse de stress du réticulum endoplasmique — suite aux perturbations de l'homéostasie cellulaire et par des taux sanguins en acides gras augmentés, menant également à l'activation de voies pro-inflammatoires. Ces effets seraient en partie dus à l'activation des TLR (Könner, Brüning 2011). De plus, un régime riche en matières grasses induirait de l'inflammation dans des régions neuronales clés contrôlant l'homéostasie énergétique, un processus qui impliquerait également les TLR (Plum, Schubert, Brüning 2005).

Étant des protéines transmembranaires, les TLR sont dans des membranes composées de protéines et de lipides. La composition de ces membranes est particulièrement complexe, les lipides pouvant par exemple varier en terme de longueur de chaîne carbonée, de niveau de saturation et de groupe polaire. De nombreuses études ont montré l'influence de la composition lipidique sur le comportement des TLR (Köberlin et al. 2015) et cette composition peut varier *in vitro*, si des lipides sont ajoutés au milieu de culture, et *in vivo* selon l'alimentation consommée (Zhu et al. 2010; Kim et al. 2007). De nombreuses zones d'ombre persistent en ce qui concerne les mécanismes régissant les interactions entre les TLR et les composés lipidiques environnants, notamment en cas de maladie perturbant le métabolisme lipidique, comme l'obésité, ce qui rend l'étude du rôle des lipides sur la signalisation des TLR particulièrement intéressante (Wong et al. 2009).

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés au 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholine oxydé (oxPAPC), couramment utilisé comme modèle de phospholipide oxydé. L'obtention de l'oxPAPC se fait à partir de l'oxydation des groupes arachidoniques contenus dans la structure du PAPC et donne divers composés (figure 1) (Mauerhofer et al. 2016). L'oxPAPC est décrit comme un inhibiteur de la signalisation des TLR (Erridge et al. 2008; Ke et al. 2017) et est couramment rencontré *in vivo* lors de processus d'oxydation (Watson et al. 1997). Nous avons testé l'hypothèse que l'inhibition de la signalisation des TLR par l'oxPAPC impliquerait des perturbations de la fluidité membranaire et de la dimérisation des TLR.

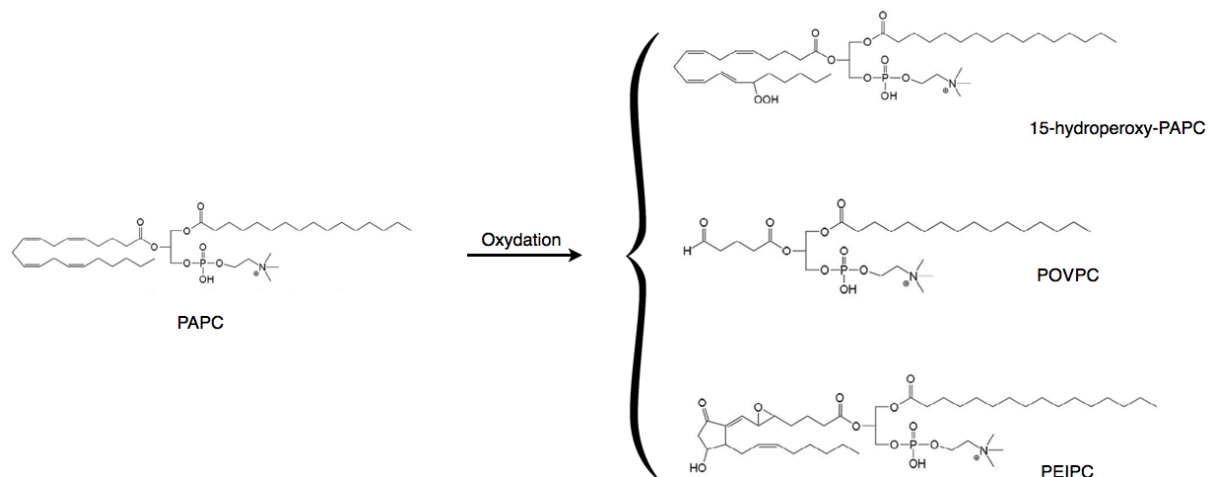


Figure 1 : génération d'oxPAPC

D'après Mauerhofer et.al 2016. POVPC : 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleryl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine.
 PEIPC : 1-palmitoyl-2-(5,6)-epoxyisoprostane E₂-*sn*-glycero-3-phosphocholine

Première partie : étude bibliographique

I. Les TLR, sentinelles de l'immunité

A. La découverte des TLR

Avant la découverte des TLR, l'immunité innée était conçue comme quelque chose de basique et peu complexe, reconnaissant de manière non spécifique les agents pathogènes. On suspectait toutefois que des récepteurs aptes à reconnaître les PAMP ou les danger associated molecular pattern (DAMP) existaient et on les appelait les PRR.

L'idée que de telles molécules puissent exister remonte seulement à une trentaine d'années. En 1989, Charles Janeway prédit que ces récepteurs reconnaissant des motifs microbiens faisaient le lien entre l'immunité innée et l'immunité acquise, cette dernière étant considérée comme beaucoup plus développée (Janeway 1989).

La première molécule d'intérêt découverte fut le récepteur de type 1 à l'interleukine 1. En 1980, l'on découvrit que l'interleukine 1 (IL-1) était impliquée dans l'activation des lymphocytes T et dans des processus tels que l'apparition de la fièvre (Dinarello 1991), sans pour autant savoir comment sa synthèse était provoquée. Le gène du récepteur de cette molécule (IL-1R1) fut identifié et cloné en 1988, mais aucun motif reconnaissable ne fut alors trouvé dans sa séquence protéique (Sims et al. 1988).

Suite à des recherches sur le développement de *Drosophila melanogaster* (Gay, Keith 1991), il s'avéra que l'interleukine 1 avait un domaine cytosolique similaire à celui de la protéine Toll — ce qui fut une surprise, car la seule fonction connue de cette protéine était la polarisation dorso-ventrale de la larve de l'insecte (Anderson, Jürgens, Nüsslein-Volhard 1985). L'on réalisa également qu'au cours de cette polarisation dorso-ventrale, une protéine (nommée Dorsal) intervenait et partageait un domaine d'homologie Rel avec les facteurs de transcription de la famille Nuclear factor kappa B (NF- κ B) (Steward 1987). NF- κ B régulant de nombreux gènes de l'immunité et de l'inflammation, et étant activé par l'IL-1, il fut logique de penser qu'un mécanisme similaire était présent lors du développement de *Drosophila*

melanogaster et lors des réactions pro-inflammatoires des mammifères. En d'autres termes, dans deux contextes complètement différents, les protéines Toll et IL-1R1 entraînaient la signalisation de NF- κ B.

Une autre découverte importante eut lieu en 1994, lorsque l'existence de la protéine N (conférant la résistance au virus de la mosaïque du tabac) fut mise en évidence. Le domaine amino-terminal de cette protéine était similaire aux domaines cytoplasmiques de Toll et de IL-1R1, montrant là qu'il s'agissait d'un domaine conservé et impliqué dans l'immunité, que ce soit dans le règne animal ou dans le règne végétal (Whitham et al. 1994). Ces domaines furent alors appelés TIR pour Toll-IL-1-Receptor.

L'on découvrit à peu près au même moment que la protéine Dif, un autre membre de la famille NF- κ B chez *D. melanogaster*, passait du cytoplasme au noyau en cas d'infection bactérienne ou de blessure chez la larve. Il fut également démontré que Dif se liait à une séquence κ B-like du promoteur du gène codant pour la cécropine — un peptide antimicrobien —, suite à son activation par un mutant constitutif de Toll, appelé Toll^{10b} (Ip et al. 1993).

L'association de ce mutant de Toll à la production d'un peptide antimicrobien, combinée aux travaux précédents ayant montré un lien entre Toll et Dorsal, a mené le laboratoire de Jules Hoffmann à émettre l'hypothèse que Toll ne régulait pas seulement le développement, mais aussi l'expression des gènes de l'immunité. La preuve définitive de ce postulat fut apportée en 1996 par un membre de ce laboratoire, Bruno Lemaitre, qui montra que suite à une infection microbienne, l'expression de drosomycine — un peptide antifongique — était sur-réglée consécutivement à l'activation de Toll (Lemaitre et al. 1996; Lemaitre 2004).

Le premier de ces homologues de Toll chez les mammifères fut cloné et étudié par Ruslan Medzhitov et Janeway en 1997. Leurs travaux montrèrent qu'en transfectant des monocytes humains avec une chimère CD4-hToll (hToll pour human Toll), il y avait activation de NF- κ B et des gènes sous sa dépendance, dont CD80 qui était connu pour stimuler les cellules T, montrant là un lien entre l'immunité innée et l'immunité acquise (Medzhitov, Preston-Hurlburt, Janeway 1997).

En 1998, cinq homologues de Toll étaient connus ; ils furent nommés les Toll like receptors (TLR). Leur fonction exacte restait à déterminer, mais ils étaient les

candidats parfaits pour les PRR. La même année, l'équipe de Ruey-Bing Yang réalisa que si des cellules exprimaient un TLR, elles étaient capables de répondre à la stimulation au LPS (Yang et al. 1998). Ces résultats furent décisifs, car ils révélèrent que les TLR étaient bel et bien les PRR. Cependant, ils crurent que le récepteur du LPS était le TLR2, et non pas le TLR4, car leurs préparations de LPS étaient contaminées par de faibles quantités de lipoprotéines bactériennes, qui sont en réalité de puissants agonistes du TLR2 (Hirschfeld et al. 2000, p. 2).

Pour comprendre la découverte capitale qui fut faite par la suite, il est nécessaire de remonter un peu le temps. Entre 1960 et 1965, une mutation spontanée apparut dans une colonie de souris C3H/HeJ du Jackson Laboratory, aux États-Unis, ce qui les rendit résistantes à la toxicité du LPS. Il fut déterminé que cette résistance était sous le contrôle d'un seul gène autosomal qui fut nommé *Lps^d*. Ainsi, suite aux travaux de Ruey-Bing Yang et de ses collègues, le gène *Lps^d* était suspecté de coder pour le TLR4 (Gerard 1998). C'est le groupe de Bruce Beutler qui clona ce gène et détermina qu'il s'agissait bien du gène du TLR4 (Poltorak et al. 1998). En 1999, ceci fut confirmé par l'équipe de Shizuo Akira, qui montra qu'une lignée de souris avec un knockout de ce gène devenait insensible au LPS (Hoshino et al. 1999). En 2011, le prix Nobel de médecine fut partagé entre Bruce Beutler, Jules Hoffmann et Ralph Steinman (ce dernier ayant découvert en 1973 les cellules dendritiques) pour les progrès majeurs qu'ils ont apporté en immunologie.

Suite à cela, de nombreux motifs microbiens furent testés pour déterminer quels étaient les autres ligands des TLR. De 1999 à aujourd'hui, les travaux de l'équipe d'Akira en particulier ont été d'une importance capitale pour déterminer de manière spécifique les ligands des TLR.

B. Les cascades de signalisation

1. Différents TLR, différents PAMP

Comme dit précédemment, on peut diviser les TLR en deux grandes catégories : ceux présents dans la membrane plasmique, reconnaissant principalement les composants bactériens, à savoir les TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10 et 11, et les TLR présents à l'intérieur de la cellule, reconnaissant les acides nucléiques

microbiens, à savoir les TLR 3, 7, 8, 9 12 et 13. Le TLR3 peut également être rencontré à la surface des cellules (Akira, Uematsu, Takeuchi 2006).

Nous allons présenter ici le fonctionnement des TLR étudiés dans le cadre de cette thèse, soit les TLR 2, 4, 5, 7 et 8.

Le TLR2 reconnaît des PAMP provenant de bactéries, parasites, virus et champignons. Il reconnaît notamment les lipopeptides bactériens, le peptidoglycan, l'acide lipoteichoïque, le lipoarabinomannan des mycobactéries, le zymosan des champignons, la protéine d'enveloppe du virus de la rougeole etc. Les lipopeptides sont reconnus par un hétérodimère formé avec le TLR1, liant les lipopeptides triacétylés, deux des chaînes lipidiques allant interagir avec le TLR2 et la troisième chaîne avec le canal hydrophobe du TLR1. Les lipopeptides diacétylés sont quant à eux reconnus par le complexe hétérodimérique constitué du TLR2 et du TLR6, ce dernier n'ayant pas de canal hydrophobe (Jin et al. 2007).

Le TLR4 — le plus étudié de tous les TLR — reconnaît le LPS, mais aussi d'autres motifs, comme la protéine de fusion du virus respiratoire syncytial, la protéine d'enveloppe du virus de la tumeur mammaire de la souris ou la pneumolysine de *Streptococcus pneumoniae* (Akira, Uematsu, Takeuchi 2006). La liaison du LPS induit la formation d'un complexe multimérique en forme de M, composé de deux copies du complexe TLR4-MD2-LPS, disposées symétriquement (figure 2). La formation de ce complexe a été très étudiée, notamment grâce à la cristallographie (Park et al. 2009). Cette dernière a montré que le LPS interagissait avec une poche hydrophobe de MD2 et liait directement les deux parties du multimère. Cinq des six chaînes du LPS interagissent avec cette poche, tandis que la sixième reste exposée à la surface de MD2, formant une interaction hydrophobe avec les phénylalanines du TLR4. Les groupes phosphates des deux molécules de LPS contribuent également à la formation du multimère en formant des interactions ioniques avec les résidus chargés positivement du TLR4 et de MD2. D'autres molécules interviennent, notamment la LPS Binding Protein (LBP) qui va lier les molécules de LPS libres, et le CD14 qui va amener le complexe LPS-LBP à MD2, sans pour autant interagir durablement avec le multimère (Akashi et al. 2003). Les

interactions du TLR4 avec ses autres ligands restent à ce jour à étudier plus en détails.

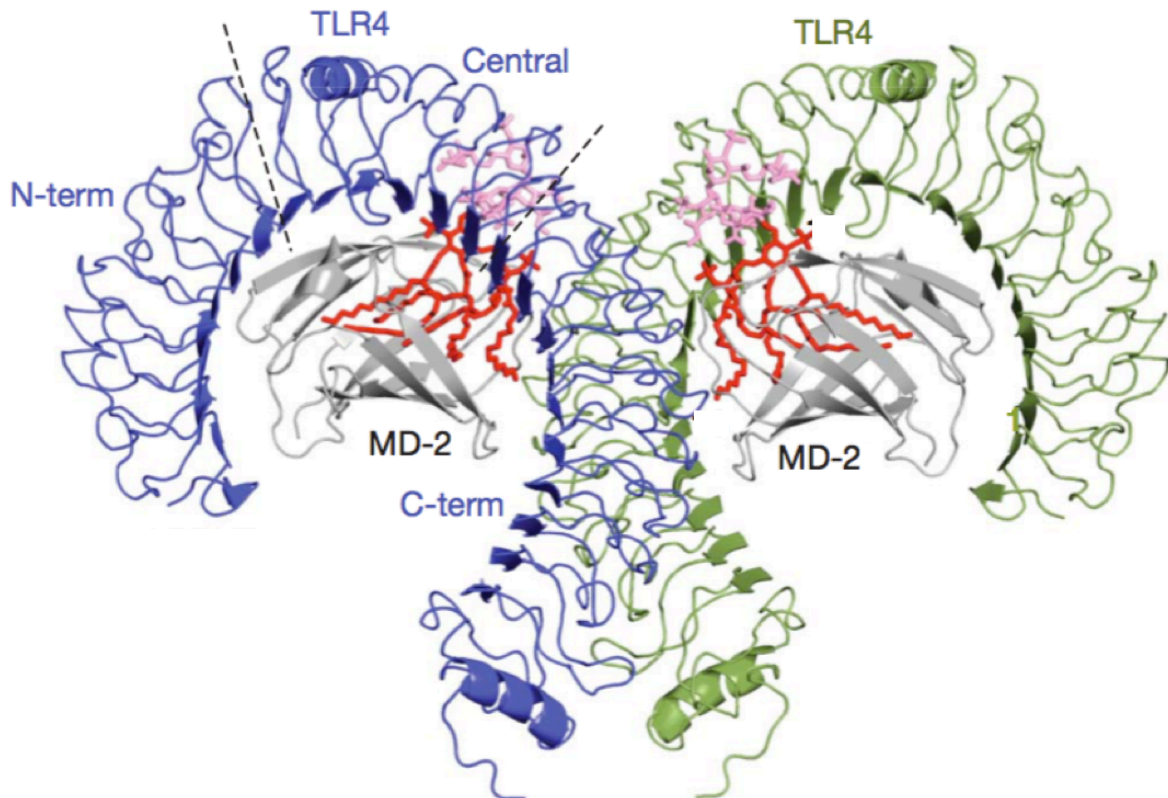


Figure 2 : structure du complexe TLR4-MD2-LPS en vue latérale

D'après Park et al. 2009. Le lipide A du LPS est représenté en rouge, le reste de la molécule en rose. Les TLR4 sont en bleu et vert, MD2 est en gris. Le complexe est symétrique et en forme de M.

Le ligand du TLR5 est la flagelline (Kawai, Akira 2010). Le gène de ce TLR est très exprimé dans les cellules dendritiques CD11c⁺ et CD11b⁺ de la lamina propria de l'intestin grêle, qui, en réponse à la fixation de la flagelline, entraînent la différenciation des cellules T helper productrices d'IL-17, des cellules T helper de type 1, et la différenciation des cellules B naïves en cellules productrices d'immunoglobulines de type A (Uematsu et al. 2008).

Le TLR7 reconnaît les ARN simple brin des virus à ARN (comme les virus Influenza A ou le VIH par exemple), les ARN polyU et certains petits ARN interférents (Hornung et al. 2005). Il est très exprimé chez les cellules dendritiques plasmacytoïdes et son activation peut entraîner la formation de cytokines par ces

dernières. Ce TLR est également capable de détecter des ARN bactériens, comme ceux des streptocoques du groupe B (Mancuso et al. 2009).

Enfin, le TLR8 est très similaire au TLR7. Il est exprimé dans de nombreux tissus, principalement dans les monocytes. Il reconnaît les ARN simple brin viraux, mais est également surexprimé après une infection bactérienne (Kawai, Akira 2006).

La localisation et les ligands des TLR étudiés dans le cadre de ces travaux de thèse sont représentés par la figure 3.

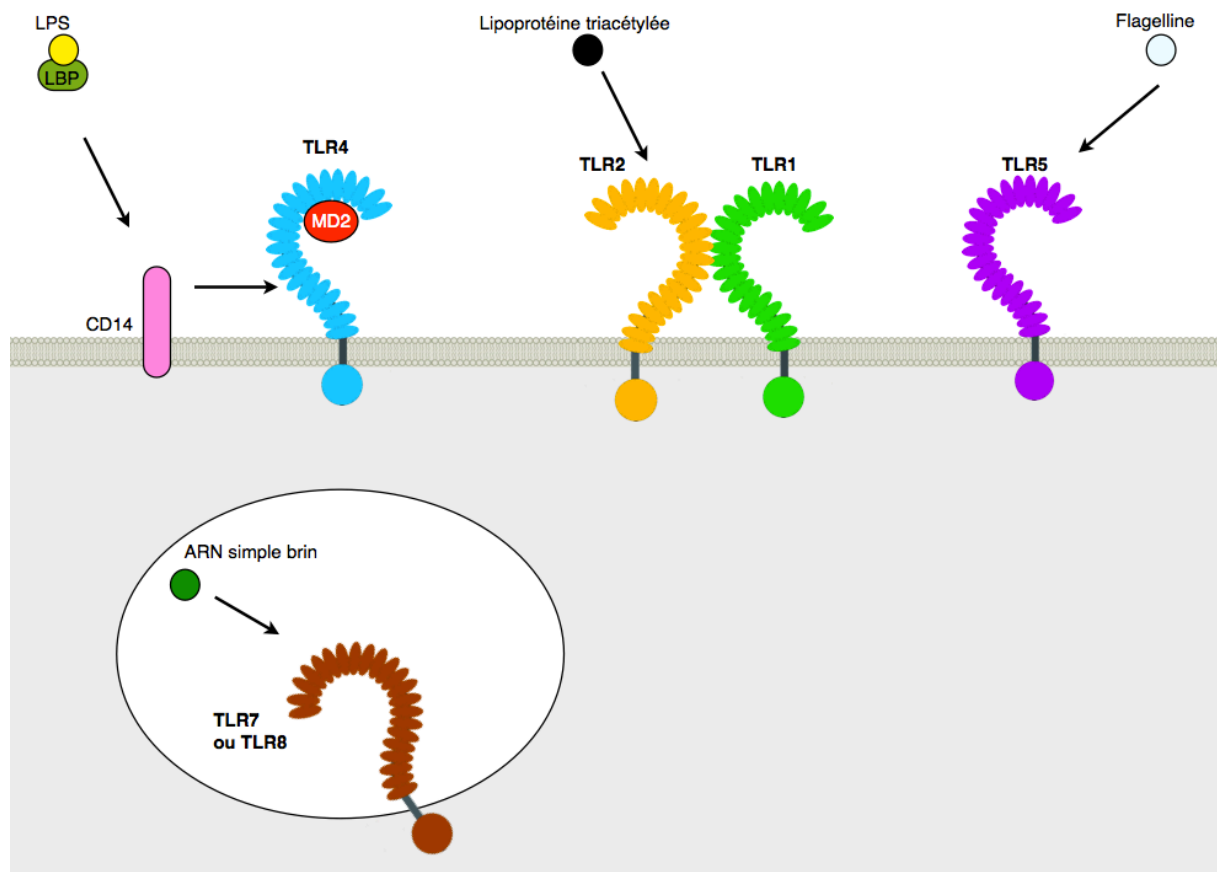


Figure 3 : représentation des ligands des TLR étudiés dans le cadre de ces travaux

Le TLR4 (en bleu) reconnaît le LPS lié à la LPB grâce à CD14 et MD2, le TLR1 (en vert) et le TLR2 (en jaune), les lipoprotéines triacétylées, le TLR5 (en violet), la flagelline, le TLR7 et le TLR8 (en marron), les ARN simple brin.

2. Dimérisation des TLR

La reconnaissance d'un PAMP par un TLR entraîne la dimérisation de ce dernier, sous la forme d'hétérodimère ou d'homodimère selon le TLR impliqué. Les parties juxtamembranaires des ectodomains du récepteur, constituées d'un feuillet bêta relié à l'hélice transmembranaire par environ trois acides aminés seulement, vont se rapprocher (Gay, Gangloff 2008). La délétion des ectodomains provoque une activation constitutive du TLR4, ce qui suggère que ces domaines ont une action auto-inhibitrice qui n'est levée que par la reconnaissance d'un ligand. Autrement dit, les domaines transmembranaires et juxtamembranaires auraient la capacité intrinsèque de se dimériser, mais la dimérisation est empêchée par les ectodomains en l'absence de ligand (Panter, Jerala 2011).

En ce qui concerne les changements conformationnels ayant lieu au niveau des hélices alpha transmembranaires et provoquant la dimérisation des domaines TIR, peu est connu. Il est probable que les mécanismes ayant lieu soient similaires à ceux impliqués avec les autres récepteurs transmembranaires de type 1, comme le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR, pour epidermal growth factor receptor). Suite à l'activation de ce dernier, les hélices alpha transmembranaires sont repositionnées et viennent former un angle d'environ 45°, ce qui rapproche les extrémités C-terminales qui ne sont alors séparées que d'approximativement 20Å (Endres et al. 2013).

Les régions juxtamembranaires cytosoliques lient les hélices alpha transmembranaires aux domaines TIR et sont plutôt variables. Elles comptent 17 acides aminés chez le TLR4 et 28 acides aminés chez le TLR1, le TLR6 et le TLR10 par exemple. Chez l'EGFR, les séquences correspondantes sont séquestrées dans la membrane plasmique par des interactions anioniques avec les phospholipides. Suite à l'activation du récepteur, elles sont expulsées de la membrane et vont s'assembler selon des hélices alpha antiparallèles et il est très probable qu'un phénomène similaire ait lieu chez les TLR (Gay, Gangloff 2008).

3. Les voies de signalisation des TLR

Les TLR entraînent des réponses biologiques spécifiques. Par exemple, le TLR3 et le TLR4 provoquent la production d'interféron de type 1 et de cytokines

inflammatoires, tandis que le TLR2 et le TLR5 provoquent surtout la production de cytokines inflammatoires. Ces différences s'expliquent par l'existence de molécules adaptatrices ayant un domaine TIR qui sont recrutées par les TLR et activent des voies de signalisation distinctes : il s'agit de MyD88, TIRAP, TRIF et TRAM. MyD88 est la première molécule adaptatrice à avoir été découverte ; elle est utilisée par tous les TLR à l'exception du TLR3 et active NF- κ B et les protéines kinases activées par les agents mitogènes (MAPK), ce qui induit la production de cytokines inflammatoires. TRIF n'est utilisé que par le TLR3 et le TLR4 et active une autre voie de signalisation, cette dernière menant à l'activation des facteurs de transcription IRF3 et NF- κ B, puis à la production d'interféron de type 1 et de cytokines inflammatoires. TRAM et TIRAP permettent au TLR4 de recruter TRIF et MyD88 et au TLR2 de recruter MyD88.

Ainsi, les voies de signalisation des TLR peuvent être divisées grossièrement en deux : d'une part, les voies impliquant MyD88, donnant lieu à la production de cytokines inflammatoires, et d'autre part, les voies impliquant TRIF, donnant lieu à la production d'interféron de type 1 et de cytokines inflammatoires. Le détail de ces voies est représenté par la figure 4.

Le TLR4 est le seul à utiliser les deux voies ainsi que toutes les protéines adaptatrices du domaine TIR. Suite à son activation, TIRAP va être recruté à la membrane plasmique et va faciliter le recrutement de MyD88, permettant une activation précoce de NF- κ B et MAPK. Le TLR va être endocyté, passer dans un endosome, former un complexe avec TRAM et TRIF. La voie TRIF est ainsi activée, donnant lieu à l'activation de IRF3 et l'activation tardive de NF- κ B et MAPK. On constate donc que la voie MyD88 est activée avant celle de TRIF. Pour ce TLR, l'activation des deux voies est nécessaire à la production de cytokines inflammatoires, ce qui n'est pas le cas des autres TLR, pour lesquels l'une ou l'autre des voies seules suffisent à produire des cytokines inflammatoires. L'explication de ce mécanisme reste à ce jour inconnue.

Voici le déroulement de la voie MyD88 (Kawai, Akira 2010) :

Suite à la détection d'un PAMP, MyD88 va recruter des IL-1 receptor associated kinases (IRAK), à savoir IRAK1, IRAK2, IRAK4 et IRAK-M. IRAK4 est activée précocement et a un rôle majeur dans l'activation de NF- κ B et des MAPK.

Par ailleurs, IRAK1 et IRAK2 sont activées séquentiellement et l'activation de ces deux kinases est indispensable à l'obtention d'une forte activation de NF- κ B et des MAPK.

Cette activation va conduire à une interaction des kinases avec TRAF6, qui est une ligase E3 catalysant la synthèse de polyubiquitine via la lysine 63 (K63) sur ses protéines cibles. Ces dernières sont notamment TRAF6 elle-même et IRAK1. Les chaînes polyubiquitines se lient ensuite à des domaines en doigt de zinc liant les ubiquitines de TAB2 et TAB3, qui sont des régulateurs du complexe TAK1 (transforming growth factor beta-activated kinase 1), activant ainsi TAK1. Elles vont également se lier à NEMO (NF- κ B essential modulator) qui est un régulateur essentiel du complexe IKK (I κ B kinase, constitué de NEMO, d'IKK α et d'IKK β) requis pour activer NF- κ B. Ainsi, les chaînes polyubiquitines K63 recruteront TAK1 pour former un complexe avec IKK, lui permettant ainsi de phosphoryler IKK β du fait de sa proximité au complexe IKK, menant ainsi à l'activation de NF- κ B par la phosphorylation suivie de la dégradation des protéines I κ B. TRAF6 active également IRF5, qui contrôle l'induction de l'IL-6 et de l'IL-12p40.

TAK1 va activer simultanément les MAPK, Erk1, Erk2, p38 et Jnk, ce qui va activer plusieurs facteurs de transcription. On aura ainsi l'induction de nombreux gènes, certains ayant des rôles majeurs dans la régulation de la transcription sous dépendance de NF- κ B. Parmi ces gènes, on trouve ceux codant pour la protéine I κ B ζ , qui est un coactivateur inductible de la sous unité NF- κ B p50, qui facilite la production d'IL-6 (Yamamoto et al. 2004) ; C/EBP δ , qui maximise également la production de cette dernière ; I κ B-NS, qui supprime l'induction à la fois de l'IL-6 et du TNF-alpha ; et ATF3, qui diminue l'activité de NF- κ B.

Voici le déroulement de la voie TRIF :

Cette voie de signalisation entraîne l'activation de IRF3 et de NF- κ B.

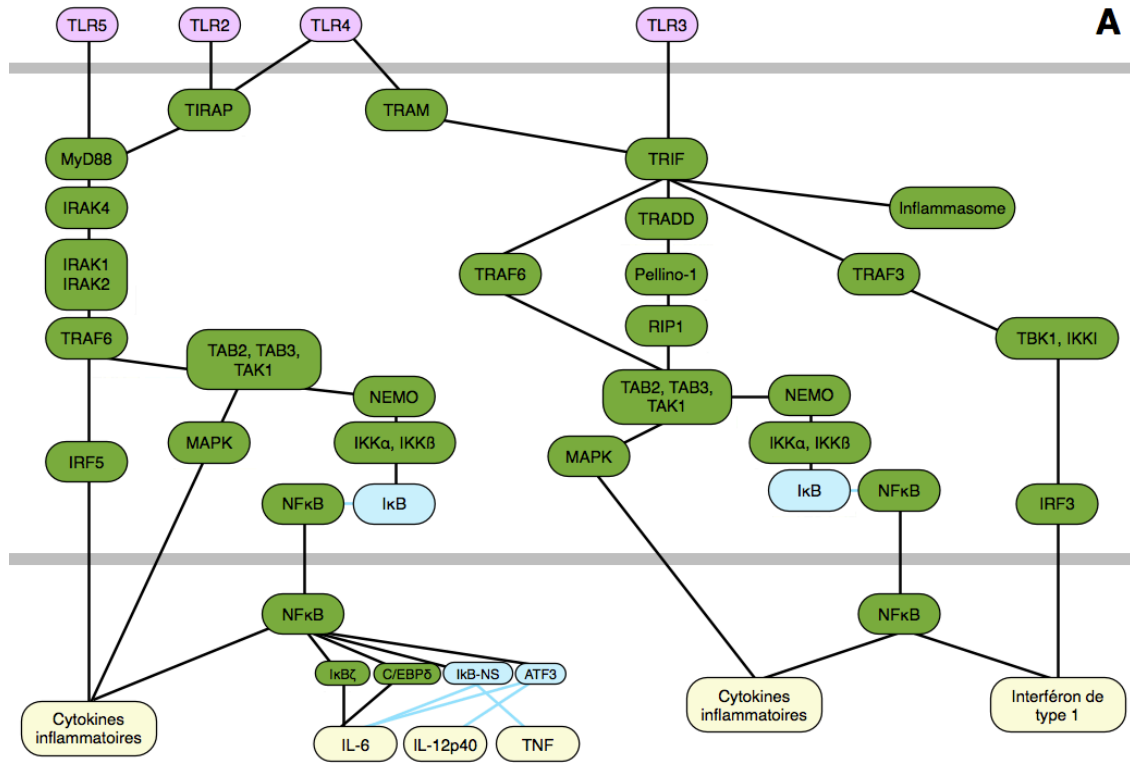
TRIF recrute TRAF6 et active TAK1, activant ainsi NF- κ B, très probablement avec des mécanismes d'ubiquitination similaires à ceux de la voie MyD88. TRIF recrute également l'adaptateur RIP1, qui va être poly-ubiquitiné via la lysine 63 après stimulation du TLR3 ou du TLR4. L'adaptateur TRADD lie RIP1 et dans la mesure où des cellules sans TRADD ont une très faible ubiquitination de RIP1 (et une faible

activation de NF- κ B), il semblerait que TRADD soit nécessaire à l'activation de RIP1. Le même phénomène est observé chez des cellules privées de Pellino-1, qui présente un domaine RING-like avec une ligase de l'ubiquitine E3. Ainsi, TRIF forme un complexe de signalisation multiprotéique avec TFAF6, TRADD, Pellino-1 et RIP1, nécessaire à l'activation de TAK1 qui va ensuite activer les voies de signalisation NF- κ B et MAPK.

En plus de cela, la voie TRIF mène à l'activation de IRF3 et à la transcription du gène de l'interféron β . TRIF recrute un complexe de signalisation constitué de TBK1 et de IKKi, qui, par l'intermédiaire de TRAF3, va catalyser la phosphorylation d'IRF3 et induire sa translocation nucléaire.

Concernant le TLR7, le TLR8 et le TLR9, exprimés par les cellules dendritiques plasmacytoïdes, les voies de signalisation sont quelque peu différentes, MyD88 étant requis pour entraîner la production d'interféron de type I (figure 4B). IRF7, qui est exprimé de manière constitutive chez ces cellules, se lie à MyD88 et forme un complexe de signalisation multiprotéique, constitué de IRAK4, TRAF6, TRAF3, IRAK1 et IKK α . IRF7 va être phosphorylé par IRAK1 et/ou IKK α , se dissocier du complexe et passer dans le noyau, où la production d'interféron sera induite. TRAF6 va activer IRF5 et NF- κ B de la même manière que pour les autres TLR, sachant qu'ici, l'activation de NF- κ B est facilitée par IRF8.

D'autres protéines présentes dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes et nécessaires à la production d'interféron de type I ont également été identifiées, comme OPN β , qui est un précurseur de l'ostéoponine séquestré dans le cytoplasme et induit par le TLR9, et intervient dans le complexe MyD88-IRF7. De même, l'inhibition de composés comme mTOR et p70S6K diminue l'interaction entre le TLR9 et MyD88, ce qui résulte en une mauvaise translocation nucléaire de IRF7, soit une faible induction de l'interféron de type I. mTOR et p70S6K sont eux-mêmes activés par la kinase phosphoinositol 3-OH (PI(3)K).



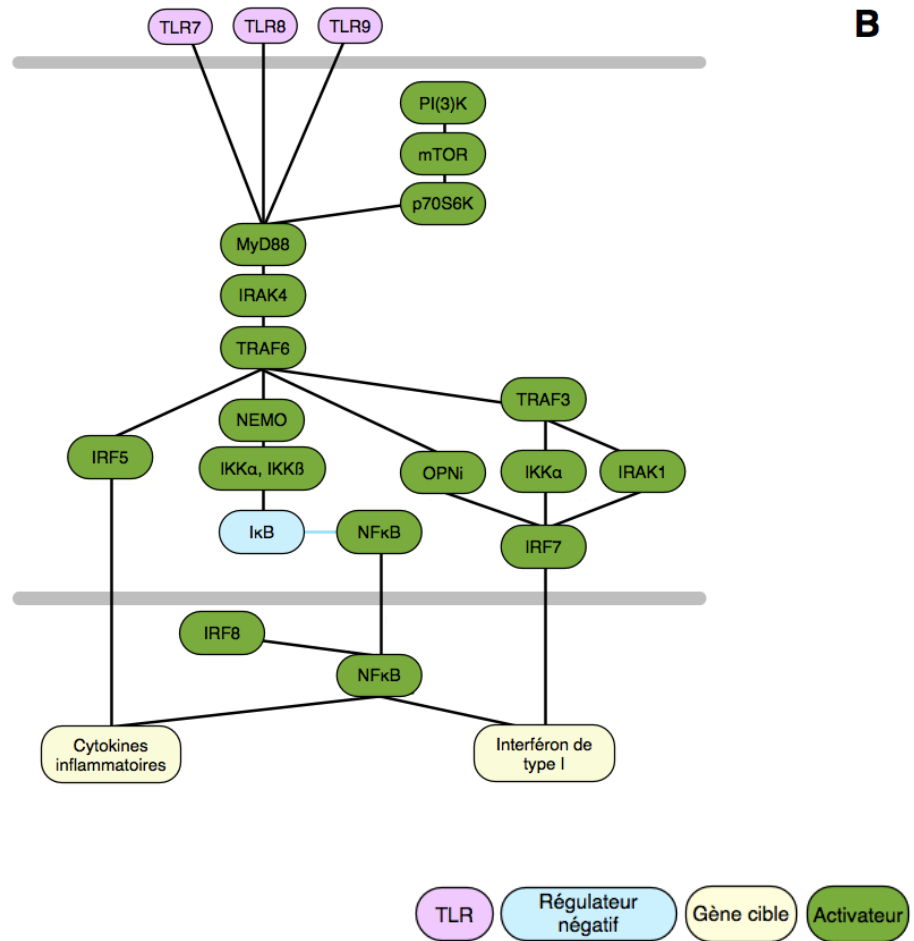


Figure 4 : vue d'ensemble des voies de signalisation des TLR

D'après Kawai, Akira 2010.

A : voies de signalisation dans les macrophages et les cellules dendritiques classiques.

B : voies de signalisation dans une cellule dendritique plasmacytoïde.

II. Lipides et inflammation

Au travers des exemples de l'obésité et de l'athérosclérose, nous allons voir que les lipides jouent un rôle important dans la modulation des réactions inflammatoires et particulièrement des voies de signalisation des TLR.

A. Implication des lipides dans les maladies inflammatoires

Au cours des dix dernières années, de nombreuses études ont montré que l'immunité innée jouait un rôle majeur dans le développement des maladies

associées à l'obésité. L'obésité morbide se caractérise entre autres par une vaste réponse inflammatoire et l'étude du transcriptome a montré que les gènes de l'inflammation et de la réponse au stress étaient parmi les plus régulés du tissu adipeux des animaux obèses (Wellen, Hotamisligil 2005). Le premier élément ayant montré que la libération de cytokines inflammatoires était augmentée en cas d'obésité a été la mise en évidence de forts taux de TNF-alpha dans le tissu adipeux de souris obèses (Galic, Oakhill, Steinberg 2010). D'autres études aboutissant aux mêmes résultats ont souligné l'état d'inflammation chronique à bas bruit rencontré dans l'obésité (Weisberg et al. 2003; Xu et al. 2003; Suganami et al. 2007).

Régime alimentaire riche en matières grasses et inflammation sont deux facteurs de risque pour le développement de l'athérosclérose. Suite à une alimentation non adaptée, les taux plasmatiques de cholestérol et de triglycérides sont augmentés, et ces lipides vont être transportés par des lipoprotéines comme les LDL, pénétrer la paroi artérielle et s'y accumuler, déposant ainsi des lipides et causant les premiers stades de la maladie (Ross, Harker 1976).

Les lipides oxydés jouent un rôle majeur dans la physiopathologie de l'athérosclérose. De manière générale, en cas d'inflammation, les polynucléaires produisent tout un panel de réactifs oxygénés, ce qui est crucial dans l'efficacité des mécanismes de défense. La NADPH oxydase et la myéloperoxydase produisent des oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène. Ces derniers vont causer des dommages aux molécules des tissus environnants (Zhang et al. 2002), notamment en cas de stress oxydatif dû à l'inflammation chronique. Les LDL et la chaîne des phospholipides insaturés membranaires sont tout particulièrement sensibles aux réactifs oxygénés et leur oxydation va donner une large gamme de produits différents (Lee et al. 2012). Ces réactions d'oxydation ne sont pas spécifiques : l'oxydation d'un phospholipide contenant de l'acide arachidonique par des réactifs oxygénés va donner un mélange complexe et non spécifique de phospholipides oxydés. Cette réaction d'oxydation non spécifique est à distinguer des réactions enzymatiques spécifiques, comme par exemple les réactions enzymatiques transformant l'acide arachidonique en éicosanoïdes (Bochkov et al. 2010). Les phospholipides générés aussi bien par

l'oxydation non spécifique que spécifique peuvent activer les cellules endothéliales de la paroi artérielle, ces dernières allant ensuite sécréter des cytokines pro-inflammatoires et attirer des cellules inflammatoires — contribuant ainsi à la formation de plaques athéroscléreuses — et amplifier localement la réponse inflammatoire (Hansson, Hermansson 2011; Libby 2002).

B. Les lipides membranaires comme modulateurs des voies de signalisation inflammatoires

1. Effet proinflammatoire des lipides

Ainsi, dans le développement de l'obésité et de l'athérosclérose, inflammation et lipides jouent des rôles capitaux. Or, il s'avère que certains lipides seraient à même d'activer des voies de signalisation intracellulaires.

Premièrement, les lipides seraient impliqués dans la réponse de stress du réticulum endoplasmique. Ce système s'active normalement lorsque des protéines dépliées ou mal repliées s'accumulent dans la lumière du réticulum endoplasmique, suite à diverses raisons, comme des mutations, de l'hypoxie ou du stress oxydatif, et deviennent nocives pour la cellule. Lors de ces situations, qualifiées de stress du réticulum endoplasmique, les cellules ont la capacité de détecter et d'éliminer les protéines anormales, ce qui évite leur accumulation. Un système de dégradation des protéines peut alors être mis en place, les protéines dépliées étant transportées dans le cytosol jusqu'au système ubiquitine-protéasome. La cellule peut également activer des voies de signalisation intracellulaires qui vont diminuer la biosynthèse des protéines, augmenter celle des protéines chaperonnes et des protéines impliquées dans la machinerie de dégradation protéique, et aider le réticulum endoplasmique à recouvrer son homéostasie. Cet ensemble de voies de signalisations s'appelle l'UPR (Unfolded Protein Response).

Des perturbations de la composition lipidique cellulaire pourraient activer l'UPR : ceci a été observé chez des macrophages chargés en cholestérol (Feng et al. 2003), des cellules β des îlots pancréatiques traités avec des acides gras saturés (Cunha et al. 2008) et dans le foie de souris nourries avec un régime riche en matières grasses (Fu et al. 2011).

On trouve dans les plaques d'athérosclérose des conditions qui peuvent activer le stress du réticulum endoplasmique et l'UPR, comme l'inflammation, la présence de phospholipides oxydés et les perturbations du métabolisme (Hansson 2005). Les marqueurs de ce stress, comme GRP78, GRP94 et CHOP sont systématiquement augmentés dans les lésions d'athérosclérose (Myoishi et al. 2007). Il a de plus été montré que l'exposition de cellules endothéliales et de macrophages à des oxLDL menait à l'activation de la réponse de stress du réticulum endoplasmique et à l'apoptose (Muller et al. 2013).

Certains lipides seraient capables d'activer les voies de signalisation des TLR. Par exemple, dans les macrophages de souris, la stimulation avec de l'acide laurique ou avec de l'acide palmitique entraîne l'activation de NF- κ B et l'induction de l'expression de COX-2 et d'IL-1, avec un effet dose-dépendant (Lee et al. 2001). Une autre étude a eu des résultats similaires : sur des cellules 293T transfectées avec le TLR4 et MD2, l'acide gras saturé acide palmitique entraîne une forte augmentation de l'expression de NF- κ B et de l'IL-6, tandis qu'un effet beaucoup plus modéré est observé avec l'acide oléique, qui est insaturé (Shi et al. 2006).

Le cholestérol semble jouer un rôle important dans cette signalisation. Dans les macrophages de souris, suite à un traitement à la méthyl- β -cyclodextrine, qui retire le cholestérol des membranes cellulaires, le taux d'IL-6 basal est nettement diminué et il augmente lorsque du cholestérol est rajouté au milieu de culture (Zhu et al. 2010).

De même, plusieurs études ont montré que certains phospholipides oxydés activaient les voies de signalisation des TLR (Zhang et al. 2002; Stewart et al. 2010; Seimon et al. 2010). Chez la souris, lors d'infection par un virus influenza hautement pathogène ou par un coronavirus, le syndrome de détresse respiratoire qui se met en place dépendrait en partie de la détection des phospholipides oxydés (tels que l'oxPAPC) par le TLR4 dans les macrophages alvéolaires (Imai et al. 2008). Suite à cette détection, la voie TRIF entraînerait une tempête cytokinique responsable d'une partie des signes cliniques observés.

De plus, les LDL oxydées activeraient un complexe hétérodimérique constitué du TLR4 et du TLR6 suite à la reconnaissance de ces molécules par le CD36,

donnant lieu ainsi à la production de cytokines inflammatoires (Stewart et al. 2010). Le TLR2 serait lui aussi capable de reconnaître les phospholipides oxydés grâce à CD36 (Kadl et al. 2011).

2. Effet anti-inflammatoire des lipides

Il semblerait que d'autres lipides aient un effet inhibiteur sur les TLR. Par exemple, concernant le TLR4 et le TLR2, l'acide docosahexaénoïque, un acide gras polyinsaturé, inhiberait l'expression de NF- κ B (Lee 2003; Lee et al. 2004). L'utilisation de cet acide gras (ainsi que celle de l'acide éicosapentaénoïque) n'a en revanche pas montré d'influence sur l'expression de l'IL-6 dans une autre étude (Shi et al. 2006). Le céramide N-C16:0-Cer et la sphingomyéline C24:0 diminueraient la sécrétion d'IL-6 suite à la stimulation au LPS (Köberlin et al. 2015).

Des études en apparence contradictoires aux études décrites au paragraphe précédent ont montré que les phospholipides oxydés avaient également des propriétés anti-inflammatoires passant par une inhibition de l'activation et de la signalisation des TLR. Une étude a montré que, dans la lignée macrophagique humaine THP1, l'oxPAPC avait un effet inhibiteur sur le TLR2 et le TLR4. Ils mesuraient la production de TNF-alpha de cellules stimulées avec du LPS ou avec Pam3CSK4 (une lipoprotéine bactérienne) et si les cellules étaient préalablement traitées avec de l'oxPAPC, la production de TNF-alpha était diminuée. Toutefois, ils n'ont observé aucun effet inhibiteur de l'oxPAPC avec des stimulations à la flagelline (un ligand du TLR5), la loxoribine (un ligand du TLR7), l'ARN simple brin (un ligand du TLR8) et de l'ADN CpG (un ligand du TLR9). Concernant le TLR2, l'effet observé était réversible en augmentant les concentrations de CD14 libre et ils en ont conclu que l'oxPAPC inhibait ce dernier (Erridge et al. 2008).

Pour le TLR4, une autre étude a conclu que l'oxPAPC bloquait la liaison entre LPS, LBP et CD14, et protégeait les souris contre le choc endotoxinique (Bochkov et al. 2002).

Bretscher et al. 2015 ont, quant à eux, obtenu des résultats différents. En présence d'oxPAPC, la production d'IL-6 et d'IL-12 était fortement diminuée suite à la stimulation de cellules myéloïdes avec des ligands des TLR 2, 3, 4, 7 et 9, montrant

là une inhibition importante des voies de signalisation de nombreux TLR. De plus, le développement des cellules T était diminué.

Dans les cellules dendritiques, la production d'IL-12 et de TNF-alpha serait aussi diminuée en présence de phospholipides oxydés suite à la stimulation du TLR2, du TLR3 et du TLR4 (Bluml et al. 2005). En cas d'infection par des mycobactéries, les phospholipides oxydés générés par des macrophages non seulement diminueraient la réponse aux ligands des TLR1 et TLR2, mais inhiberaient la présentation d'antigène par le CMH de classe II (Cruz et al. 2008).

Ces différences concernant l'effet des phospholipides oxydés peuvent s'expliquer expérimentalement par le fait qu'il est très difficile de contrôler la composition et la complexité des mélanges de phospholipides oxydés. Lorsque l'on parle d'oxPAPC, il s'agit en réalité d'un mélange de différents composés (figure 1). L'oxydation de la chaîne carbonée d'un phospholipide peut grossièrement donner deux catégories de phospholipides oxydés :

- Il est possible d'observer une fragmentation de l'acide gras, qui donnera un phospholipide oxydé avec une chaîne acyle diminuée en position *sn-2*. Au cours de cette réaction, des aldéhydes à chaîne courte, comme le malondialdéhyde ou le 4-hydroxynonanal, peuvent être générés et ces molécules peuvent modifier la nature des protéines, des lipides et des acides nucléiques environnants (Bochkov et al. 2010).

- L'on peut également avoir une cyclisation, un réarrangement et une oxydation plus poussée des phospholipides, donnant ainsi des acides gras avec des isoprostanes, des isofuranes ou des isothromboxanes en position *sn-2*.

Il faut ajouter à cela le fait qu'un phospholipide oxydé peut être le précurseur d'un autre phospholipide oxydé.

Les concentrations relatives des différents composés peuvent avoir une forte influence. Par exemple, le 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-*sn*-glycero-3-phosphocoline (POVPC) et l'oxPAPC entraînent une inhibition de l'activation du TLR4 (mesurée par l'expression de la E-sélectine) à faible concentration, mais auraient un effet pro-inflammatoire à haute concentration (Oskolkova et al. 2010).

La connaissance de ces phénomènes permet donc de comprendre la complexité, la variabilité et les effets des mélanges obtenus *in vitro* et *in vivo* au cours de l'inflammation.

3. Implication des dérivés de l'acide arachidonique dans les voies de signalisation inflammatoires

Au cours d'une réaction inflammatoire chez un sujet en bonne santé, de nombreux lipides sont également impliqués, notamment dans les phases d'amplification et de résolution.

Lors de l'amplification de la réaction inflammatoire, la phospholipase A2 entraîne la libération d'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires. Cet acide est alors rapidement transformé de manière spécifique en différents médiateurs lipidiques par les cyclo-oxygénases, les lipoxygénases ou encore les époxygénases, donnant respectivement des prostaglandines, des leucotriènes et des endopéroxydes (Freire, Van Dyke 2013) (figure 5). Tous ces composés jouent des rôles majeurs dans les voies de signalisations inflammatoires.

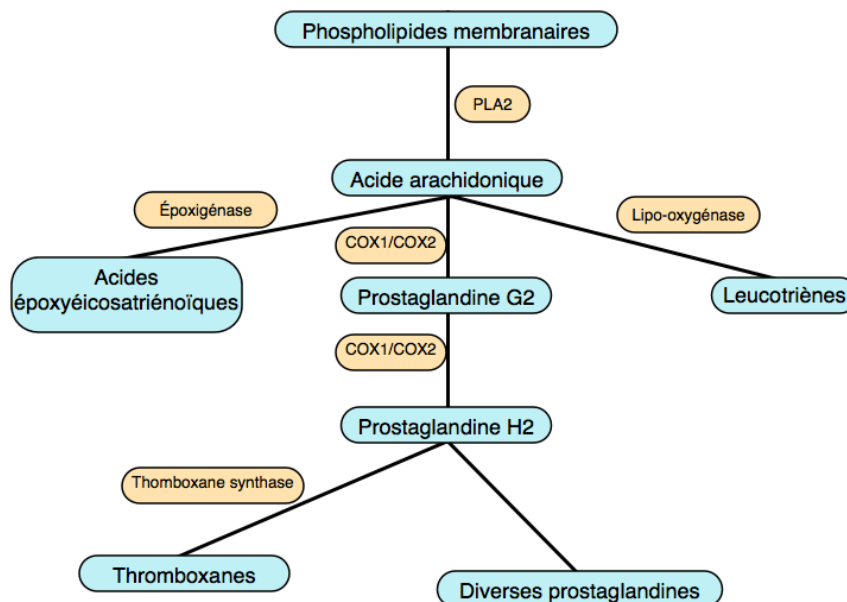


Figure 5 : synthèse des médiateurs inflammatoires dérivés de l'acide arachidonique

PLA2 : phospholipase A2. COX : cyclo-oxygénase.



Dans le cadre de ces travaux, nous nous sommes uniquement intéressés à l'action que pouvaient directement avoir les lipides sur la signalisation propre aux TLR et n'avons pas recherché à mettre en évidence d'action sur les phases de l'inflammation autre que la phase d'initiation.

C. Rôle des TLR dans le développement de l'obésité et du diabète

Concernant l'obésité et le diabète, différentes études ont montré une implication beaucoup plus importante des TLR que la seule activation de voies inflammatoires.

La capacité des acides gras saturés d'activer les TLR serait corrélée à leur capacité à entraîner une résistance à l'insuline. Par exemple, l'acide palmitique et l'acide stéarique activeraient tous deux le TLR4 et entraîneraient une résistance à l'insuline dans des cellules de muscle squelettique (Hommelberg et al. 2009).

En l'absence de TLR4 fonctionnel — que cela soit obtenu par un knockdown ou une mutation du gène du TLR4 —, l'apparition de la résistance à l'insuline chez des souris obèses disparaît (Shi et al. 2006; Poggi et al. 2007).

Il a également été montré qu'avec un TLR4 non fonctionnel, une ration riche en acides gras saturés n'était plus à même de provoquer de l'obésité chez des souris, au contraire d'une ration très riche en acides gras insaturés. De plus, l'absence de TLR4 fonctionnel altérerait la réponse inflammatoire causée par l'obésité dans le tissu adipeux, de moindres taux de MCP-1 et de NF- κ B étant observés, par comparaison à des souris ayant un TLR4 normal (Davis et al. 2008).

Ces résultats semblent donc indiquer que les acides gras saturés — avec notamment l'acide palmitique — et le TLR4 jouent un rôle fondamental dans le développement de l'obésité et de la résistance à l'insuline, que ce soit *in vivo* ou *in vitro*.

De même, des lignées cellulaires et des souris n'ayant pas de TLR2 fonctionnel ont été obtenues. Cette absence a causé une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de la signalisation de cette dernière dans les cellules musculaires et dans les adipocytes de souris ayant une ration très riche en matières grasses (Caricilli et al. 2008). Notamment, un knock-down du TLR2 donne une

inhibition quasi complète de la résistance à l'insuline causée par l'acide palmitique (Senn 2006).

E. Les TLR comme modulateurs du métabolisme lipidique

Nous avons vu que les lipides pouvaient avoir une action modulatrice sur le fonctionnement des TLR. Certaines données montrent que la réciproque serait vraie aussi : la signalisation des TLR pourrait également réguler le métabolisme lipidique.

L'activation du TLR4 de macrophages RAW264.7 de souris avec du Kdo2-lipide A (une sous-espèce de LPS) donne lieu à d'importants remodelages des compositions lipidiques de différents organites cellulaires, et ce pour de nombreuses catégories de lipides (Andreyev et al. 2010). Ces modifications peuvent être globales — ayant lieu dans presque tous les organites dans des proportions similaires — ou localisées à un organite donné.

Par exemple, la stimulation du TLR4 induirait une forte production de céramides à l'échelle de la cellule entière, principalement dans la membrane plasmique, mais également dans la membrane nucléaire et dans la membrane mitochondriale. On observe également une très forte augmentation globale de la quantité de lanostérol, un précurseur du cholestérol, les concentrations étant multipliées par un facteur avoisinant les 100. On peut citer l'acide phosphatidique comme exemple de modification se cantonnant à un organite : suite à l'activation du TLR4, sa concentration n'augmente que dans le réticulum endoplasmique (Andreyev et al. 2010).

Ces modifications lipidiques seraient entraînées par des modifications de l'activité enzymatique des cellules. La SMPDL3B est une phosphodiesterase particulièrement exprimée dans les cellules dendritiques et dans les macrophages, et présente à leur surface. Son activité a un fort impact sur la composition et la fluidité membranaires, et il s'avère qu'elle est sur-exprimée suite à l'activation des TLR (Heinz et al. 2015).

Au travers de ces exemples, nous pouvons constater que les TLR sont partie prenante du métabolisme lipidique et que ce dernier est un régulateur de la signalisation des TLR.

III. Mécanismes impliqués dans la régulation de l'inflammation par les lipides

A. Homologie de structure entre les lipides et les ligands des TLR

Les lipides pourraient directement activer les TLR par homologie avec les ligands microbiens, notamment pour le TLR4. Le lipide A possède la plupart des propriétés biologiques du LPS ; il comporte des acides gras saturés, dont les groupes 3-hydroxyl sont eux-mêmes acylés avec d'autres acides gras saturés, comme l'acide palmitique ou l'acide laurique (Raetz 1990). La suppression de ces groupes entraîne une perte totale de l'activité endotoxinique et ferait de la molécule obtenue un antagoniste du lipide A originel (Munford, Hall 1986). De plus, les lipoprotéines désacylées ne sont plus capables d'activer le TLR2 (Brightbill et al. 1999).

Des co-immunoprécipitations sur des TLR4 marqués par FLAG et GFP ont montré que les acides gras saturés provoquaient la dimérisation des récepteurs, mais également leur activation. Par exemple, une étude a montré que l'acide laurique provoquait la dimérisation de ce TLR et une augmentation du taux de cytokines inflammatoires (Wong et al. 2009). Ces résultats semblent indiquer que les acides gras saturés seraient donc reconnus par le TLR4 comme des ligands, possiblement par analogie avec la structure du LPS.

Toutefois, les résultats concernant l'effet pro-inflammatoire des lipides sont soumis à une certaine controverse : pour les expériences réalisées *in vitro*, les solvants dans lesquels sont présents les acides gras contiennent souvent de la BSA (bovine serum albumine) et cette dernière pourrait être contaminée par du LPS ou des lipoprotéines bactériennes — dans ce cas, ces contaminants seraient responsables de l'activation des TLR, contrairement aux acides gras (Erridge, Samani 2009). *In vivo*, le LPS est produit dans le tube digestif de l'hôte par des bactéries Gram négatives et peut passer dans le sang suite à la mort et à la translocation de ces dernières dans les capillaires intestinaux. Cette translocation se

ferait par un mécanisme dépendant du TLR4. Une alimentation riche en matières grasses entraîne une prolifération des bactéries gram négatives dans les intestins, et chez les souris, il a été montré que cela causait une translocation bactérienne, donc une augmentation du taux sanguin de LPS (Wang et al. 2010, p. 4). Ainsi, l'effet pro-inflammatoire des acides gras serait là aussi dû au LPS, les acides gras ne jouant qu'un rôle indirect.

Certaines études ont cependant mis en évidence une activation de la signalisation des TLR par des lipides tout en s'affranchissant de la possibilité d'avoir leurs réactifs contaminés par des composés bactériens via différentes méthodes de contrôles (Raghavan et al. 2012; Dziarski et al. 2001).

Les lipides pourraient également être reconnus par les co-récepteurs des TLR. Comme nous l'avons dit précédemment, CD36 serait capable de reconnaître les phospholipides oxydés et d'activer le complexe hétérodimérique constitué du TLR4 et du TLR6 (Stewart et al. 2010, p. 36), ou le TLR2 (Kadl et al. 2011, p. 2). L'oxPAPC serait capable d'empêcher la liaison entre LPS, LBP et CD14 (Bochkov et al. 2002). L'effet anti-inflammatoire de l'acide docosahexaénoïque pourrait être dû à une inhibition de l'association entre le complexe TLR4-MD2 et les molécules adaptatrices (Lee 2003; Lee et al. 2004).

B. Action sur les voies de signalisation intracellulaires des TLR

Les effets pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires observés suites aux traitements des cellules avec les lipides pourraient être dus à des interactions au niveau des différentes étapes des voies de signalisation en aval des TLR.

Cette hypothèse est soutenue par l'exemple de l'activation du facteur de transcription de la réponse anti-oxydante Nrf2 (NF E2-related factor 2) par les phospholipides oxydés. Parmi les molécules présentes dans les mélanges d'oxPAPC, l'époxy-cyclopentenone serait l'un des composés avec les plus fortes propriétés anti-inflammatoires. Il s'avèrerait que, de manière générale, l'effet anti-inflammatoire des phospholipides oxydés serait dû au motif cyclopentenone, qui

présente des similarités structurelles avec la prostaglandine 15d-PGJ2 (Bretscher et al. 2015).

Cette prostaglandine, décrite pour la première fois en 1983, a longtemps été considérée comme un produit de dégradation de PGD2. On a au départ pensé qu'elle était capable d'activer le facteur de transcription PPAR-gamma dans les macrophages (Forman et al. 1995), mais des études plus récentes ont indiqué le contraire (Chawla et al. 2001). 15d-PGJ2 lie une cystéine sur la boucle d'activation d'IKK β et l'inactive, bloquant ainsi la réponse inflammatoire dépendant de NF- κ B (Rossi et al. 2000), et active le facteur de transcription Nrf2. Ce dernier est normalement présent dans le cytosol sous forme inactive, lié à la protéine Keap-1 qui entraîne sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome. 15d-PGJ2 ou les phospholipides oxydés comportant un motif cyclopentenone sont capables de former des lésions covalentes avec Keap-1, ce qui entraîne la libération de Nrf2 et son activation (Freigang 2016).

Suite à cela, Nrf2 migre dans le noyau et se lie aux promoteurs de gènes codant pour des enzymes impliquées dans les réactions de phase II de la détoxification ou dans la synthèse de composés antioxydants, comme l'hème oxygénase-1 ou la NAD(P)H:quinone oxydoréductase-1 (Al-Sawaf et al. 2015, p. 2). En conséquence, la tolérance de la cellule au stress oxydatif est nettement augmentée (Mauerhofer et al. 2016).

L'activation de Nrf2 par les phospholipides oxydés comportant un motif cyclopentenone donne lieu à une inhibition de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-12 notamment) dans des cellules myéloïdes *in vivo* et *in vitro*, et module la réponse immunitaire adaptative en inhibant la mise en place d'une réponse de type Th1 (Bretscher et al. 2015).

C. Modifications de la composition et de la fluidité membranaires

1. Les TLR, des protéines en constante interaction avec les lipides

Comme toutes les protéines transmembranaires, les TLR sont insérées dans des membranes cellulaires composées de protéines et de lipides qui organisent et régulent de nombreux processus de signalisation. La lipidomique s'est

considérablement développée au cours des dernières années et a permis d'étudier la complexité des lipides membranaires en en identifiant des milliers. Ces lipides varient par exemple selon la longueur de leur chaîne carbonée, de leur groupe de tête polaire ou encore de leur niveau de saturation.

Si les ectodomains des TLR ont été très étudiés, les domaines transmembranaires et leurs interactions avec l'environnement lipidique sont moins bien connus. Ces domaines transmembranaires, ainsi que les régions juxtamembranaires, joueraient un rôle crucial dans la dimérisation des récepteurs, mais également dans les interactions avec d'autres molécules, comme Unc93B1 qui est une protéine indispensable à la signalisation du TLR3, du TLR7 et du TLR9 (Brinkmann et al. 2007).

Les régions juxtamembranaires cytosoliques pourraient être impliquées dans les interactions avec des glycérophospholipides anioniques comme les phosphatidylsérines et les phosphatidylinositols trouvés dans la couche interne de la membrane plasmique (Hedger, Sansom, Koldsø 2015; Gay et al. 2014). Plusieurs TLR contiennent également sur cette région des résidus cystéine qui, au moins pour le TLR2, sont palmitoylés et seraient très importants pour la signalisation. De même, TRAM pourrait avoir des résidus glycine myristoylés, impliqués dans les interactions protéines-lipides (Chesarino et al. 2014; Levental, Grzybek, Simons 2010).

Suite à l'analyse de leurs séquences, il a été suggéré que plusieurs TLR comporteraient dans leurs domaines juxtamembranaires cytosoliques de possibles motifs liant le cholestérol et potentiellement importants dans les interactions protéines-lipides (Reuven, Fink, Shai 2014), mais ceci reste à prouver expérimentalement.

Ces types de modifications lipidiques post-traductionnelles sont connus pour réguler les associations dynamiques des protéines transmembranaires avec les micro-domaines membranaires, que l'on appelle également les radeaux lipidiques et pourraient être impliquées dans la relocalisation des TLR au sein de la membrane (Levental et al. 2010; Köberlin, Heinz, Superti-Furga 2016). Ces structures seraient enrichies en cholestérol et en sphingolipides, et serviraient de plateformes d'activation pour de nombreux processus de signalisation, y compris le début de la cascade de signalisation des TLR (figure 6).

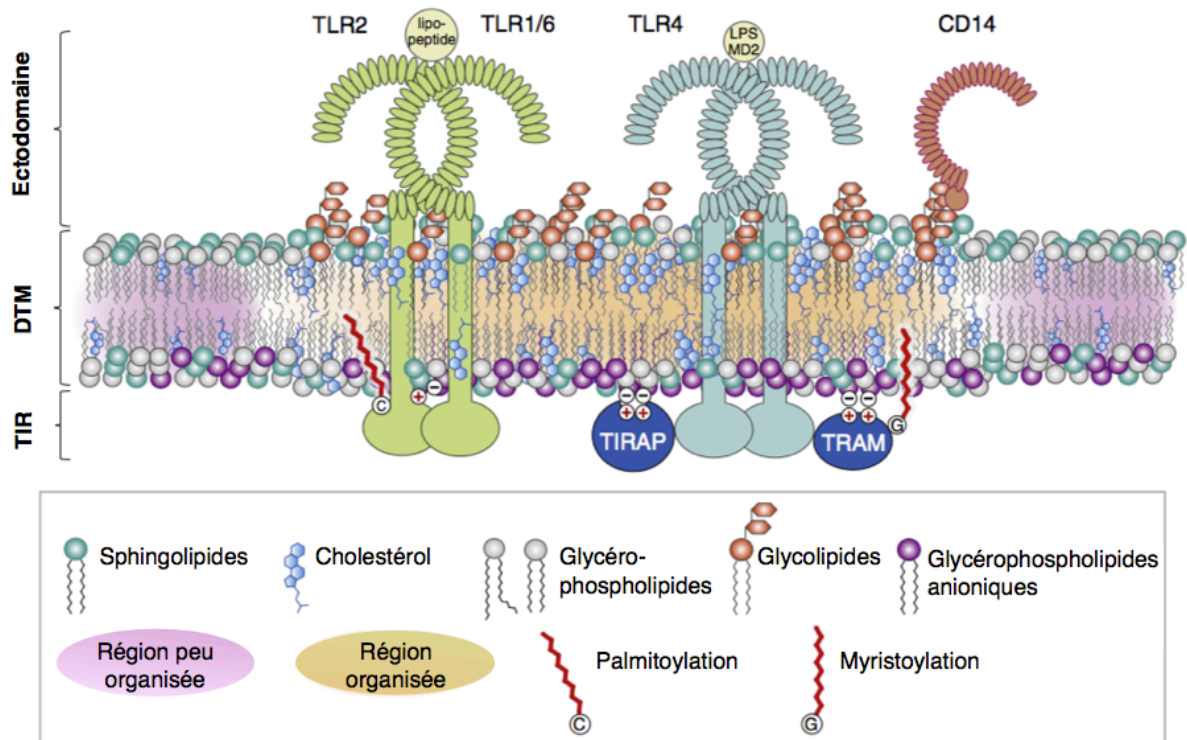


Figure 6 : interactions membranaires avec les TLR et leurs protéines associées.

D'après Köberlin, Heinz, Superti-Furga 2016. Sont représentés le TLR1, le TLR2, le TLR4 et le TLR6, CD14, les molécules adaptatrices TIRAP et TRAM (en bleu), divers exemples de lipides membranaires (sphingolipides, cholestérol, glycérophospholipides et glycolipides). En rouge sont représentés deux exemples de modifications lipidiques post-traductionnelles. Les charges + et – représentent les interactions entre les acides aminés et les lipides. La membrane plasmique est représentée avec une région organisée pouvant correspondre à un radeau lipidique (en orange) et avec une région moins organisée (en violet).

On peut envisager que tout changement dans la composition lipidique de la membrane plasmique puisse avoir un impact sur la fluidité membranaire et sur les radeaux membranaires et, indirectement, sur la signalisation des TLR.

2. Impact des perturbations de la composition lipidique sur la signalisation TLR

Compte tenu des interactions complexes entre les TLR et les lipides, il est cohérent d'envisager que toute perturbation dans la composition et la fluidité membranaire puisse avoir un impact sur les voies de signalisation et la dimérisation des TLR.

Lorsque qu'un knock-down de la Sphingomyéline Phosphodiesterase Acide-Like 3B (SMPDL3B) est réalisé, on constate des changements significatifs de la composition et de la fluidité membranaire, et une hyper-réactivité aux stimulations

des TLR (figure 7). Cette hyper-réactivité peut être compensée en ajoutant au milieu de culture les espèces lipidiques qui avaient été diminuées suite au knockdown. De plus, suite à ce dernier, l'expression des TLR à la surface de la cellule n'était pas modifiée, ce qui signifie que les résultats observés pourraient bien dépendre des perturbations membranaires et que la régulation de la biologie de la membrane serait un moyen de réguler les signaux inflammatoires (Heinz et al. 2015).

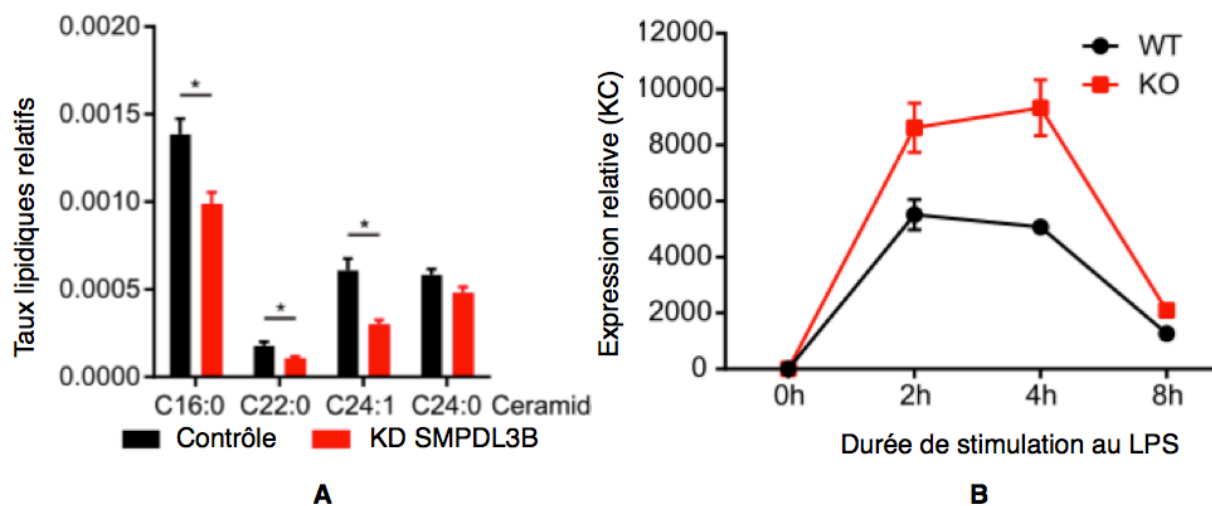


Figure 7 : exemples des conséquences que peuvent avoir les modifications de la composition lipidique membranaire.

D'après Heinz et. al, 2015. A : des macrophages RAW264.7 ont subi un knockdown de SMPDL3B et les taux relatifs en différents céramides ont été mesurés. Suite à ce knockdown, par rapport aux cellules contrôle, on remarque des changements significatifs des différentes proportions en céramide. B : des cellules dendritiques de souris ont également subi un knockdown de SMPDL3B. Suite à une stimulation au LPS, le marqueur inflammatoire KC (sécrété par divers types cellulaires en cas d'inflammation) était dosé dans le surnageant. En absence de SMPDL3B, sa concentration est nettement augmentée.

Les modifications membranaires pourraient également influencer sur le recrutement des TLR au sein des radeaux membranaires. Par exemple, l'ajout d'acide docosahaexanoïque au milieu de culture de cellules T entraînerait une modification de la composition des radeaux membranaires, en augmentant la quantité d'acides gras poly-insaturés, ce qui inhiberait l'activation de ces cellules (Stulnig et al. 2001). De même, les phospholipides oxydés seraient capables de diminuer la quantité de cholestérol membranaire, impactant probablement la composition des radeaux lipidiques, qui sont normalement riches en cholestérol (Triantafilou et al. 2002; Walton et al. 2003).

Des éléments indiquent l'importance du cholestérol dans le recrutement des TLR dans ces radeaux : par exemple, en réalisant un knockdown du transporteur du cholestérol ABCA1, la quantité de cholestérol cellulaire est augmentée et l'on peut observer une augmentation du recrutement du TLR4 et du TLR9 dans les radeaux lipidiques (Zhu et al. 2010).

Cependant, l'utilisation de molécules connues pour perturber les radeaux membranaires, comme la nystatine, donne des résultats controversés. Selon certaines études, ces molécules diminueraient la dimérisation des TLR et la production de cytokines inflammatoires suite à la stimulation au LPS (Triantafilou et al. 2002; Wong et al. 2009), tandis que selon d'autres, aucun effet ne serait observé (Erridge et al. 2008). Ceci suggère que des éléments autres que les radeaux lipidiques interviennent dans la régulation de la signalisation des TLR. Nous avons émis l'hypothèse que des modifications de la composition et la fluidité membranaires étaient aptes à moduler la capacité des TLR à se dimériser, sans impliquer nécessairement les radeaux lipidiques. Ces derniers ne sont pas présents dans la membrane du réticulum endoplasmique et une étude a montré que d'autres récepteurs transmembranaires, IRE1 et PERK, qui sont impliqués dans la réponse UPR, pouvaient se dimériser spontanément suite à des modifications de la composition lipidique (Volmer, van der Ploeg, Ron 2013), ce qui va dans le sens de notre hypothèse. Notamment, la capacité des protéines à créer des interactions avec les lipides est plus faible dans une membrane contenant beaucoup d'acides gras saturés, ce qui revient à dire que les interactions protéine-protéines sont favorisées par rapport aux interactions protéine-lipides lorsque la proportion d'acides gras saturés augmente (White, Wimley 1999; Anbazhagan, Schneider 2010).

Dans le cadre de ces travaux de thèse, l'hypothèse envisagée a été la suivante : afin de comprendre par quel mécanisme l'oxPAPC inhibait les TLR, nous avons testé l'hypothèse que l'oxPAPC avait une action sur la fluidité membranaire et inhibait la dimérisation des TLR.

Deuxième partie : étude expérimentale

I. Matériels et méthodes

A. Traitement à l'oxPAPC de cellules THP1

1. Culture des cellules THP1

Des cellules de la lignée monocyttaire humaine THP1-DualTM (InvivoGen) étaient cultivées dans du DMEM complété par 10% de sérum de veau foetal inactivé par la chaleur, de la zéocine à 100µg/mL, de la blasticidine à 10µg/mL, de la pénicilline à 100U/mL et de la streptomycine à 100µg/mL.

Ces cellules ont intégré de manière stable deux gènes rapporteurs, d'où l'appellation THP1-DualTM. Elles ont une activité luciférase sous le contrôle d'un promoteur ISG (interferon-stimulated gene), ce qui permet d'étudier la voie de signalisation des IRF (interferon regulatory pathway). Elles expriment également le gène de la SEAP (secreted embryonic alkaline phosphatase) sous le contrôle d'un promoteur contenant cinq copies de l'élément de réponse transcriptionnelle de NF-κB: ainsi, quantifier l'activité de SEAP (en utilisant un test colorimétrique spécifique, Quanti-BlueTM, Invivogen) permet d'étudier l'activation de NF-κB.

2. Détermination des concentrations optimales en ligands des TLR

Afin de déterminer les concentrations optimales en ligands des TLR testés, les cellules ont été mises en plaque 96 puits de telle sorte à avoir pour chaque puits $7 \cdot 10^4$ cellules dans 200µL. Les réactifs suivants ont été utilisés : du LPS de *Escherichia coli* 055:B5 (Sigma-Aldrich), de la flagelline FLA-ST Ultrapure (InvivoGen) de *Salmonella typhimurium*, R-848 (Axxora) et Pam3CSK4 (InvivoGen). Les cellules ont été stimulées pendant 24h. Passé ce délai, 20µL de surnageant ont été prélevés dans chaque puits et ajoutés à 200µL de Quanti-BlueTM (Invivogen). 45min plus tard, l'absorbance des puits était mesurée. Afin d'évaluer un bruit de fond, l'absorbance de puits contenant uniquement le milieu de culture des cellules était calculée.

3. Préparation de l'oxPAPC

Pour solubiliser l'oxPAPC (Invivogen), 0,5mL de DMEM à 37°C avec du sérum inactivé par la chaleur était ajouté au flacon de 0,5mg d'oxPAPC et ce dernier était vortexé pendant 30 secondes. La procédure était répétée une seconde fois. Le volume final était ajusté pour obtenir la concentration voulue.

4. Stimulation à l'oxPAPC et aux différents ligands des TLR

Les cellules étaient cultivées en P96 dans 100µL avec $7 \cdot 10^4$ cellules par puits. 100µL d'une solution contenant de l'oxPAPC aux concentrations souhaitées étaient ajoutés. 10µL de DMEM contenant les ligands des TLR aux concentrations souhaitées étaient également ajoutés.

24h plus tard, de nouvelles plaques 96 puits contenant du Quanti-Blue™ (InvivoGen) à 37°C avec 200µL par puits étaient préparées. Pour chaque puits contenant les cellules THP1, 20µL de surnageant étaient prélevés et ajoutés au puits correspondant dans la plaque contenant le Quanti-Blue™. Après 45min d'incubation, l'absorbance de chaque puits était calculée. Afin d'évaluer un bruit de fond, l'absorbance de puits contenant uniquement le milieu de culture des cellules était calculée.

B. Obtention d'une lignée Flp-In avec le TLR4 tronqué et pNiFty2-SEAP

1. Création d'un plasmide avec la séquence du TLR4 tronqué

Un gène synthétique codant pour les acides aminés 561 à 835 du TLR4, le peptide signal du pré-protrypsinogène humain et l'étiquette FLAG (le tout dans le même cadre de lecture) a été commandé (figures 8 et 9).

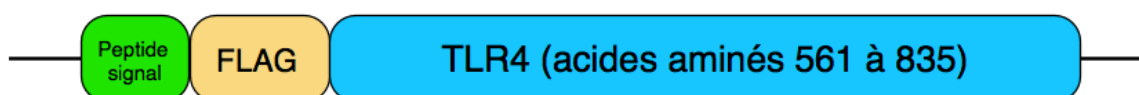


Figure 8 : schéma du gène codant pour le TLR4 tronqué, l'étiquette FLAG et le peptide signal

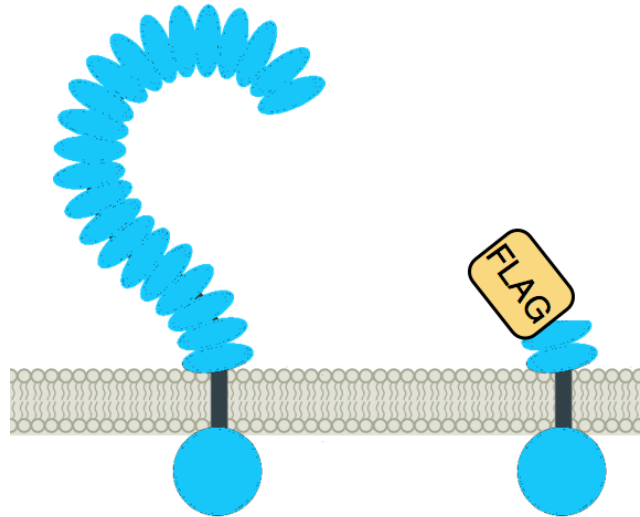


Figure 9 : schémas du TLR4 sauvage et du TLR4 tronqué

Ce gène a ensuite été introduit dans le plasmide pcDNA5/FRT/TO à l'aide des enzymes NaeI et EcoRV, puis la bonne orientation de l'intégration du gène a été vérifiée.

2. Obtention de cellules Flp-In TRex exprimant le TLR4 tronqué

a. Maintenance des cellules

Des cellules Flp-In™ 293 TRex (Thermo Fisher) étaient maintenues dans du DMEM complété avec 10% de sérum de veau fœtal, de la blasticidine à 3µg/mL, de la zéocine à 50µg/mL, de la pénicilline à 100U/mL et de la streptomycine à 100µg/mL.

b. Détermination de la quantité optimale d'hygromycine

Les cellules ont été mises en culture dans une plaque 24 puits de telle sorte à avoir 10⁴ cellules par puits, avec le milieu décrit ci-dessus et différentes concentrations d'hygromycine. Les concentrations testées allaient de 50µg/mL à 400µg/mL. La concentration tuant la plupart des cellules en 3 jours et la totalité en une semaine était de 150µg/mL.

c. Réalisation de la première transfection

Avant la transfection, les cellules étaient cultivées dans du DMEM avec 10% de sérum de veau fœtal, de la blasticidine à 3µg/mL et de la zéocine à 50µg/mL.

2.10⁶ cellules ont été passées dans des BP100 et cultivées jusqu'à une confluence de 50-75%. 24h avant la transfection, le milieu a été changé avec du DMEM uniquement complété avec 10% de sérum de veau foetal. La transfection a été réalisée avec le kit *TransIT*[®]-293 en suivant le protocole du fabricant. La figure 10 illustre l'insertion du plasmide.

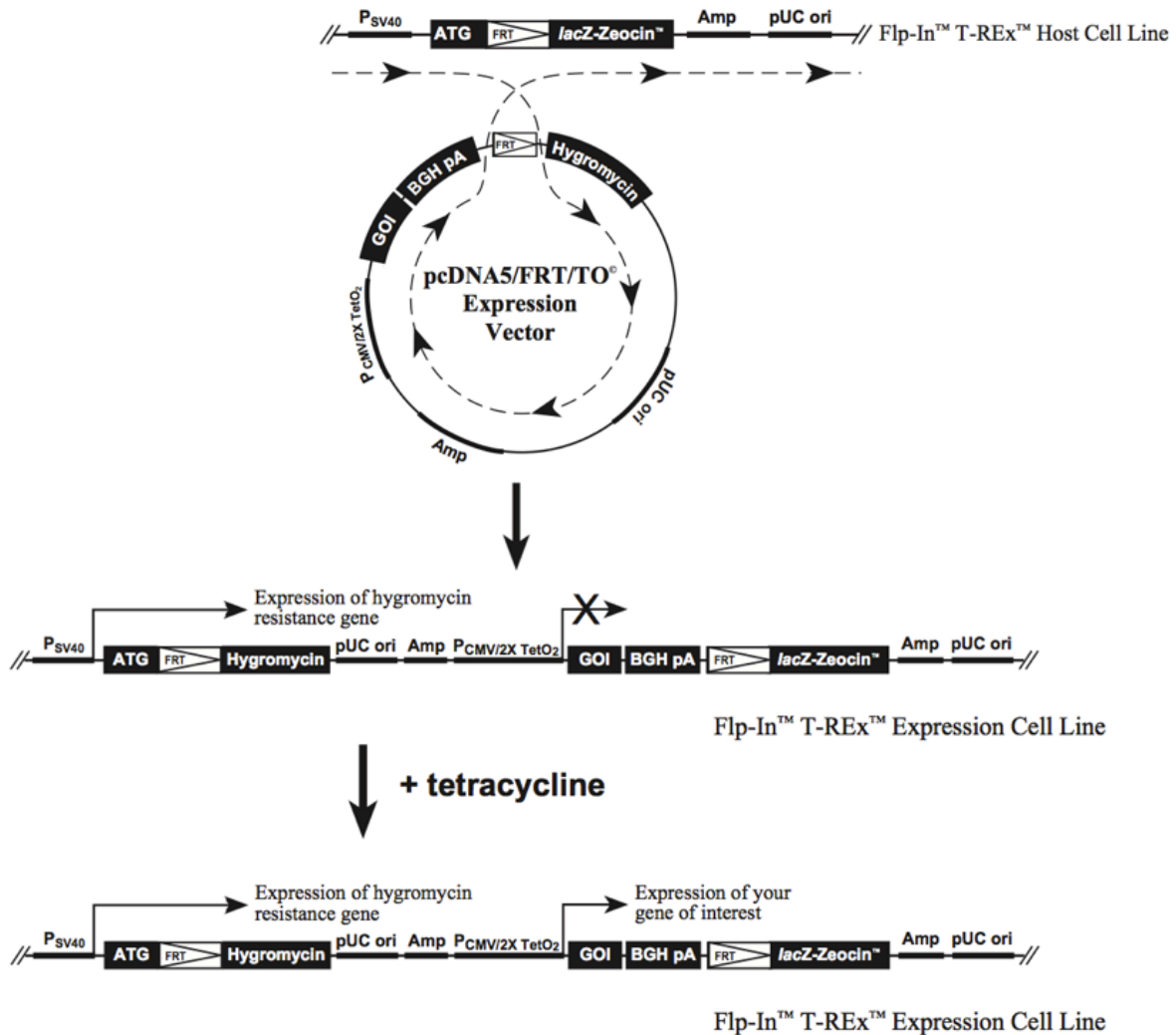


Figure 10 : insertion du plasmide pcDNA5/FRT/TO

L'insertion se fait dans le génome des cellules Flp-In T-REx via une séquence FRT. L'expression du gène du TLR4 tronqué est induite par les tétracyclines.

d. Réalisation d'une sélection antibiotique

24h après la transfection, les cellules ont été lavées avec du PBS à température ambiante, puis récoltées avec de la trypsine EDTA et passées en BP100 en diluant

au quart, au cinquième et au vingtième.

48h après la transfection, le milieu a été retiré et remplacé par du DMEM avec 10% de sérum de veau foetal (inactivé par la chaleur et ne contenant aucune trace de tétracycline), de la blasticidine à 3 μ g/mL et de l'hygromycine à 150 μ g/mL. Ce milieu a été renouvelé tous les 2-3 jours pendant 6 semaines, en lavant systématiquement les cellules avec du PBS avant d'ajouter du nouveau milieu.

Au bout de 6 semaines, des colonies étaient clairement visibles et 24 d'entre elles furent repiquées dans une plaque 24 puits, puis dans des plaques 6 puits, puis en BP100 (figure 11).

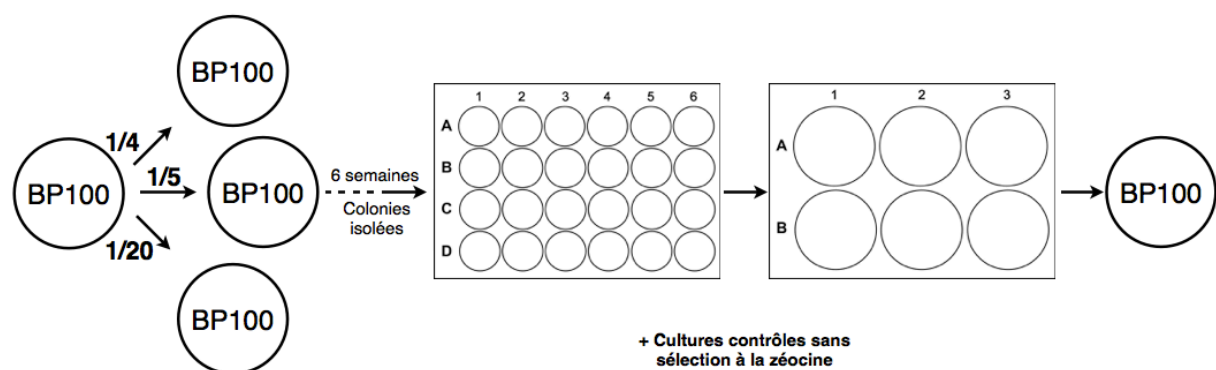


Figure 11 : représentation des principales étapes de la sélection antibiotique

Passages successifs des cellules en BP100 à diverses dilutions pour obtenir des colonies isolées, puis en P24, en P6 et enfin, en BP100.

e. Vérification de l'intégration stable du plasmide

Enfin, chaque clone fut passé dans 3 BP100 (une pour la maintenance et deux pour vérifier l'induction à la tétracycline) et en 2 puits de P6 (pour vérifier la sensibilité à la zéocine). Concernant les cellules en puits de P6, pour chaque clone, un puits contenait le milieu habituel des cellules et l'autre ce milieu avec en plus de la zéocine à 100 μ g/mL.

Afin de vérifier que la tétracycline induisait bien l'expression du TLR4, pour chaque clone, de la doxycycline à une concentration de 10 μ g/mL était ajoutée aux 10mL de milieu dans l'une des BP100, la deuxième servant de contrôle. 24h plus tard, une lyse cellulaire suivie d'une immunoprécipitation FLAG étaient réalisées — l'immunoprécipitation s'est avérée nécessaire à l'obtention d'un signal correct en western blot.

f. Protocole de lyse cellulaire

Le milieu était retiré, les cellules étaient lavées à deux reprises au PBS froid, puis une fois avec du PBS EDTA 1mM. 1mL de tampon de lyse IP (1% Triton X-100, 150mM NaCl, 20mM Hepes pH 7.5, 10% glycerol, 1mM EDTA) contenant des antiprotéases (Roche, cOmplete Protease Inhibitor cocktail) était ajouté et les cellules étaient détachées à l'aide d'un cône. Le liquide était prélevé et mis à 4°C pendant 15min en rotation continue. Ensuite, le tube était centrifugé pendant 10min à 15000g et le surnageant était prélevé.

g. Protocole d'immunoprécipitation FLAG

Pour chaque BP100, 20 μ L de billes d'agarose couplées à des anticorps de souris anti-FLAG étaient lavées à trois reprises avec du tampon de lyse IP. 900 μ L de lysat total étaient ajoutés à ces billes et le tout était placé à 4°C en rotation continue pendant 24h. Ensuite, les billes étaient à nouveau lavées à trois reprises, resuspendues dans du tampon de charge Laemmli contenant du DTT, et chauffées pendant 5min à 100°C pour dénaturer les protéines. Les échantillons étaient alors soit congelés, soit utilisés pour réaliser directement un western blot.

h. Protocole de western blot FLAG

Les échantillons étaient chargés dans un gel d'acrylamide à 10% (avec 12 μ L d'échantillon par puits). La cuve de migration était remplie de TGS et la migration avait lieu à 170V. Les protéines étaient ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose. Cette dernière était ensuite placée dans du TBS avec 0,05% de tween 20 et 5% de lait pendant 1h à température ambiante en agitation continue, pour réaliser le blocage. Après 3 lavages brefs et successifs au TBST, l'incubation primaire avait lieu avec un anticorps de souris anti-FLAG M2 (Sigma) dilué au 1/1000^{ème} dans du TBS avec 0,05% de tween 20 et 5% de BSA pendant 12 à 24h à 4°C, toujours en agitation continue. Ensuite, 3 lavages au TBS avec 0,05% de tween 20 de 5min chacun étaient réalisés, avant de procéder à l'incubation secondaire qui avait lieu avec un anticorps anti-souris couplé à la peroxydase (Thermo Fisher

Scientific™) dilué au 1/10 000^{ème} dans du TBS avec 0,05% de tween 20 et 5% de BSA, pendant 1h à température ambiante. La membrane était alors lavée 3 fois pendant 5min avec du TBST. Elle était placée dans du Super Signal™ West Dura Extended Duration Signal (Thermo Fisher Scientific™) pendant 5min et analysée par le ChemiDoc™ (Bio-Rad™).

2. Réalisation d'une deuxième transfection avec pNiFty2-SEAP

Un des clones de Flp-In TRex ayant stablement intégré le plasmide contenant le TLR4 tronqué a été sélectionné, amplifié et transfecté une deuxième fois, avec le plasmide pNiFty2-SEAP (InvivoGen), contenant un gène rapporteur de NF-κB et un gène de résistance à la zéocine (figure 12).

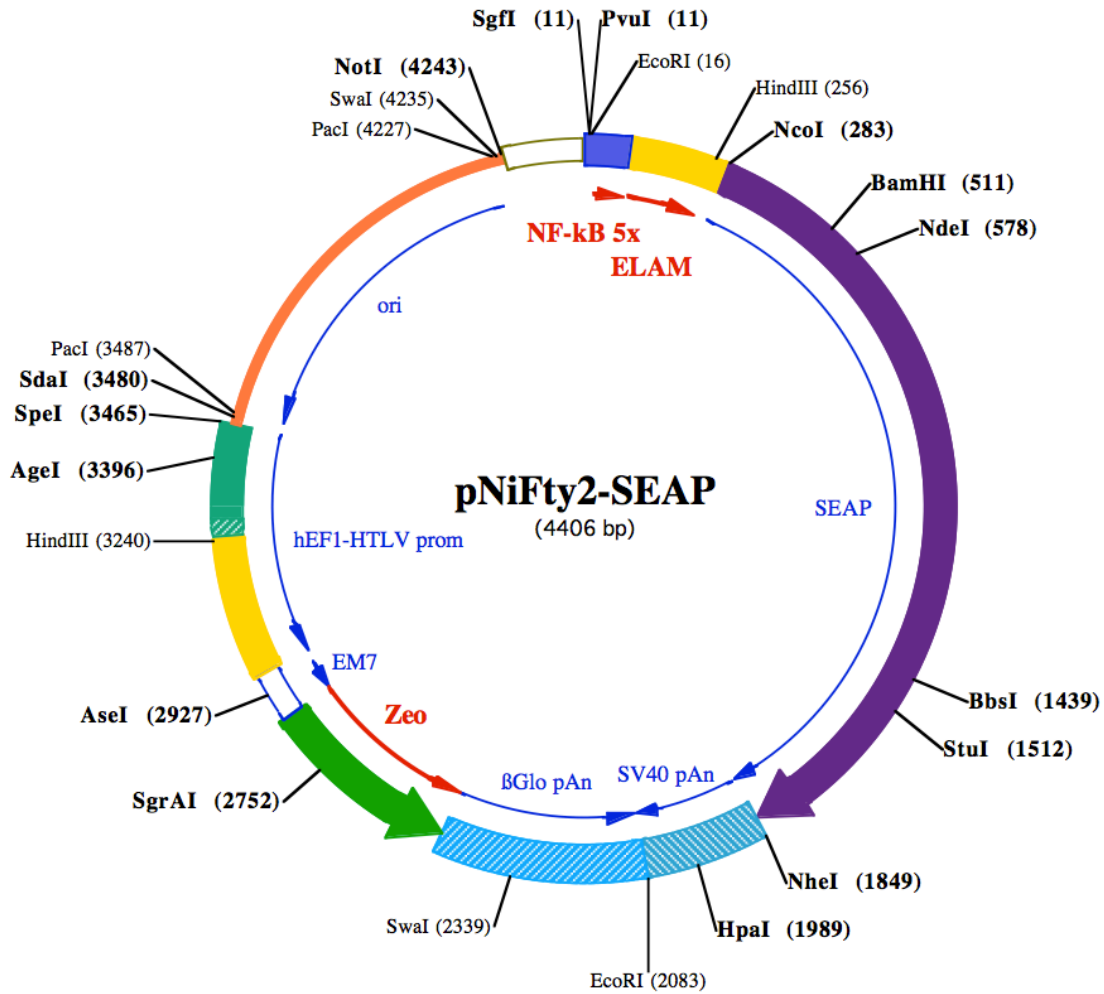


Figure 12 : carte du plasmide pNiFty2-SEAP (InvivoGen)

Les cellules ont été passées en BP100 dans un milieu sans antibiotique et 24h après, alors qu'elles avaient atteint 80% de confluence, la transfection a été réalisée en utilisant le kit Lipofectamine[®] LTX & PLUS[™] Reagent (Invitrogen) en suivant le protocole du fabricant.

48h après la transfection, les cellules ont été passées en BP100 en réalisant une dilution au 1/10^{ème} et au 1/100^{ème}. De la zéocine à 50µg/mL ou à 100µg/mL a été ajoutée au milieu. Des cellules non transfectées ont également été mises en BP100 avec le même milieu afin de servir de contrôle. Le milieu a été changé tous les 2-3 jours pendant 5 semaines. Au bout de ce délai, les colonies macroscopiques et isolées ont été placées en P24, puis en P6, puis en BP100 et en puits de P96. Les clones ainsi obtenus en P96 ont été stimulés au TNF-alpha à 300ng/mL pendant

24h, puis, pour chaque clone, 20 μ L de surnageant ont été ajoutés à 200 μ L de Quanti-Blue chauffé à 37°C afin de vérifier la présence du gène rapporteur de NF- κ B.

3. Stimulation à l'oxPAPC

Les cellules Flp-In TRex doublement transfectées (avec le TLR4 tronqué et le gène rapporteur de NF- κ B) étaient placées en plaque 96 puits avec 7.10⁵ cellules par puits, contenues dans 100 μ L. 24h après, les cellules étaient devenues adhérentes et prêtes à être traitées.

L'oxPAPC était préparé comme décrit précédemment. Les cellules étaient alors stimulées avec ce dernier, du LPS à 10 μ g/mL, du TNF-alpha à 300ng/mL et de la doxycycline à des concentrations allant de 1 à 100 μ g/mL.

24h plus tard, pour chaque puits, 20 μ L de surnageant étaient prélevés et ajoutés à 200 μ L de Quanti-BlueTM chauffé préalablement à 37°C. Comme précédemment, la plaque était lue 45min plus tard pour en mesurer l'absorbance.

La figure 13 résume les étapes successives des manipulations réalisées sur les cellules Flp-In Trex.

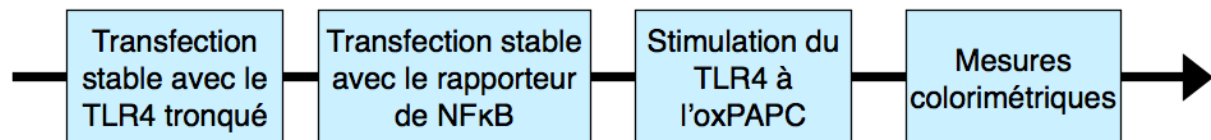


Figure 13 : résumé des différentes étapes réalisées sur les cellules Flp-In Trex

C. Co-immunoprécipitation de cellules BAF3

1. Culture des cellules

Des cellules Ba/F3 (des cellules de souris pro-B dépendant de l'interleukine 3, exprimant le TLR4 marqué soit par GFP, soit par FLAG, MD2 marqué lui aussi par FLAG, et le CD14) étaient cultivées dans du RPMI avec de l'IL-3 recombinante de souris (70 unité/mL), 10% de sérum de veau foetal, de l'hépes à 25mM, de la pénicilline à 100U/mL et de la streptomycine à 100 μ g/mL.

2. Préparation des tampons

Les tampons suivant ont été préparés, à partir de publications réalisant des co-immunoprécipitations sur le TLR4 (Saitoh 2004; Raghavan et al. 2012)

- Tampon de lyse n°1 : Hepes (pH 7,5) 50mM, NaCl 150mM, Nonidet P-40 glycerophosphate 0,1%, EDTA 5mM.
- Tampon de lavage n°1 : Hepes (pH 7,5) 50mM, NaCl 500mM, Nonidet P-40 glycerophosphate 0,1%, EDTA 5mM.
- Tampon de lyse n°2 : NaCl 150mM, Tris-HCl (pH 7,6) 50mM, EDTA 4mM, 0,5% de *n*-octyl- β -D-glucoside et 0,1% de brij.
- Tampon de lavage n°2 : NaCl 150mM, Tris-HCl (pH 7,6) 50mM, 0,1% de *n*-octyl- β -D-glucoside, 0,1% de triton et 0,1% de brij.

3. Stimulation des cellules

Les cellules étaient stimulées avec du LPS à la concentration de $1\mu\text{g/mL}$ pendant 20min à 37°C .

4. Protocole de lyse cellulaire

Pour chaque condition, environ 1.10^7 cellules étaient lysées. Suite à la stimulation au LPS, les cellules étaient centrifugées pendant 5min à 1500rpm. Le reste des manipulations était alors réalisé sur un tapis de glace pilée. 3 lavages successifs au PBS à 4°C étaient réalisés, avec une centrifugation de 5min à 1500rpm entre chaque.

Pour chaque condition, le culot cellulaire était resuspendu dans 1,5mL de tampon de lyse (n°1 ou n°2) contenant des antiprotéases (Roche, cOmplete Protease Inhibitor cocktail). Le tout était mis à agiter à 4°C pendant 15min. Une centrifugation de 10min à 15000g était alors réalisée et le surnageant était prélevé pour être utilisé tout de suite ou congelé.

5. Protocole de d'immunoprécipitation GFP

Pour chaque condition, $20\mu\text{L}$ de billes d'agarose couplées à la protéine A étaient utilisés. Ces billes étaient lavées au même tampon que celui ayant servi à

lyser les cellules, et ce à trois reprises. 1 μ L d'anticorps anti-GFP (ab290, Abcam) était ajouté et le tout était mis à agiter pendant 1h à température ambiante. Les billes étaient alors à nouveau lavées au tampon de lyse à trois reprises, puis resuspendues dans le lysat total pour chaque échantillon. Les tubes étaient placés à 4°C sous agitation continue pendant 12h, puis les billes étaient lavées au tampon de lavage correspondant au tampon de lyse qui avait été utilisé. Les billes étaient resuspendues dans du tampon de charge 2x et soit les échantillons étaient utilisés le jour même pour réaliser un western blot, soit ils étaient congelés.

NB : pour le protocole d'immunoprécipitation de FLAG, se référer à la partie I.B.2.g.

6. Utilisation de GFP-Trap®

GFP-Trap® du laboratoire Chromtek a été utilisé en remplacement des billes d'agarose couplées aux anticorps. Il s'agit de billes d'agaroses directement couplées à une protéine liant GFP avec une haute affinité.

900 μ L de lysat cellulaire étaient ajoutés à 25 μ L de billes et le tout était mis à agiter à 4°C pendant 1h. Les tubes étaient centrifugés pendant 2min à 2500g à 4°C, les billes lavées avec le tampon de lavage n°2 à trois reprises, et au final, elles étaient resuspendues dans 25 μ L de tampon de charge.

7. Protocole de western blot GFP

Les échantillons étaient chargés sur un gel d'acrylamide à 10%, lui-même baignant dans du TGS. La migration avait lieu à 170V. Les protéines étaient transférées sur une membrane de nitrocellulose. Deux protocoles ont été ensuite utilisés.

Protocole n°1 : le blocage avait lieu dans du TBS 0,05% tween 20 et 5% lait pendant 1h à température ambiante. Un anticorps de lapin anti-GFP (Clontech Laboratories) était ajouté de telle sorte à obtenir une dilution au 1/2000^{ème} et la membrane était placée à 4°C sous agitation pendant 12h. Ensuite, 3 lavages de 5min au TBS 0,05% tween 20 étaient réalisés. L'incubation secondaire était réalisée avec un anticorps anti lapin (IgG HRP linked, Cell Signalling Technology) dilué au 1/5000^{1'} en TBS 0,05% tween 20 et 5% lait pendant 1h à température ambiante. Ce protocole

a également été utilisé en diluant l'anticorps primaire au 1/5000^{ème} et l'anticorps secondaire au 1/2000^{ème}.

Protocole n°2 : le blocage avait lieu dans du PBS avec 3% de BSA pendant 1h à température ambiante. Trois rinçages rapides au PBS étaient réalisés. Un anticorps anti-GFP (Abcam Laboratory) était ajouté dilué 1/5000^{ème} dans du PBS avec 3% de BSA et la membrane était placée à température ambiante sous agitation pendant 1h. Trois nouveaux lavages de 5min chacun étaient réalisés. L'incubation secondaire était réalisée avec un anticorps anti lapin (IgG HRP linked, Cell Signalling Technology) dilué au 1/5000^{ème} en du PBS avec 3% de BSA pendant 1h à température ambiante.

NB : pour le protocole de western blot FLAG, se référer à la partie I.B.2.h.

D. Traitement à l'oxPAPC de macrophages et FRET

1. Culture des cellules

Des macrophages immortalisés de souris provenant du Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository (BEI Resources) étaient cultivés dans du DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal, de la L-glutamine à 2mM, du sodium pyruvate à 1mM et de la ciprofloxacine à 10µg/mL.

2. Préparation des cellules pour le FRET

5.10⁶ cellules étaient mises en BP100 de bactériologie et non pas de culture cellulaire classique, afin de les rendre plus facilement détachables.

48h plus tard, le milieu de culture était retiré et les cellules étaient rincées au PBS à 4°C. Du PBS glacé avec de l'EDTA à 5mM était ajouté et les BP100 étaient placées à 4°C pendant 10min. Ensuite, les cellules étaient décollées en agitant le milieu à l'aide d'une pipette, en veillant à ne pas les léser, et une centrifugation de 5min à 1500rpm à 4°C avait lieu. Une fixation au paraformaldéhyde 2% était réalisée à température ambiante pendant 10min. Après une nouvelle centrifugation de 5min à 1500rpm, en travaillant sur glace, le culot cellulaire était resuspendu dans du tampon de FACS (composé de PBS EDTA à 2mM et de 0,5% de BSA). Pour chaque

condition, 5.10^5 cellules étaient placées dans un tube à cytométrie. Les tubes étaient centrifugés pendant 5min à 1500rpm.

Ensuite, les cellules étaient mises à incuber avec les anticorps anti-TLR4 couplés aux fluorochromes dans 100 μ L de tampon FACS pendant 20min à 4°C.

Les anticorps utilisés étaient les suivants : Alexa Fluor® 405 (dans le rôle du donneur) et Alexa Fluor® 488 (dans le rôle du receveur). Les concentrations testées pour chaque anticorps étaient : au 1/20^{ème}, au 1/200^{ème}, au 1/600^{ème} et au 1/1000^{ème}.

Pour une concentration donnée d'anticorps, les cellules étaient soit incubées :

- Sans anticorps
- Avec l'anticorps Alexa Fluor® 405 seul
- Avec l'anticorps Alexa Fluor® 488 seul
- Avec les anticorps Alexa Fluor® 405 et Alexa Fluor® 488

Enfin, deux lavages au tampon de FACS étaient réalisés.

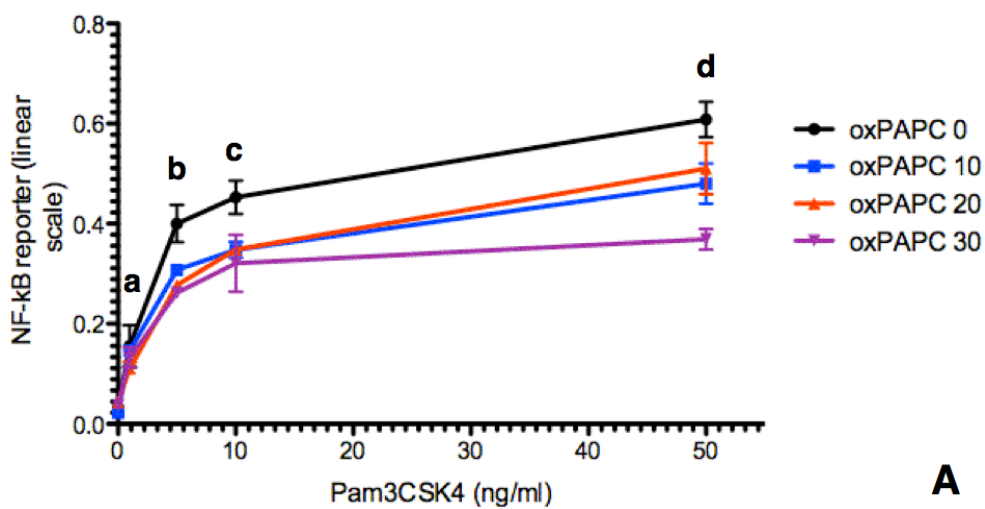
3. Analyse par cytométrie en flux et FRET

L'appareil utilisé était le MACS Quant® Analyser 10. Le tube contenant les cellules non marquées, soit sans anticorps, était d'abord analysé afin d'évaluer la fluorescence intrinsèque des cellules. Puis nous vérifiions que les marquages des cellules avaient bien été efficaces en analysant les cellules marquées avec l'anticorps Alexa Fluor® 405 seul, puis celles marquées avec l'anticorps Alexa Fluor® 488 seul. Dans un dernier temps, les cellules doublement marquées étaient analysées. Lors de l'analyse des cellules, la quantité d'énergie transférée du donneur vers l'accepteur était calculée selon les équations établies par Nagy et al. 1998., et l'appareil donnait alors l'efficacité du FRET.

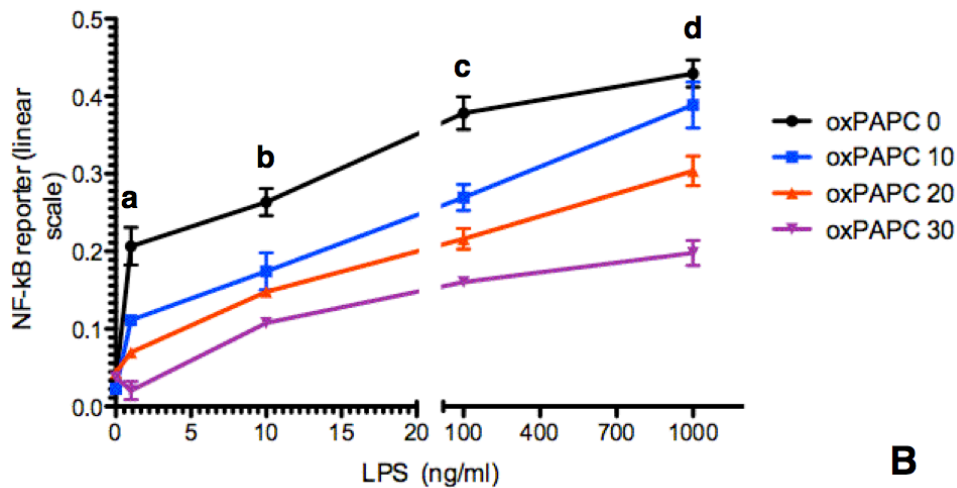
II. Résultats

A. L'oxPAPC est un inhibiteur de la signalisation des TLR

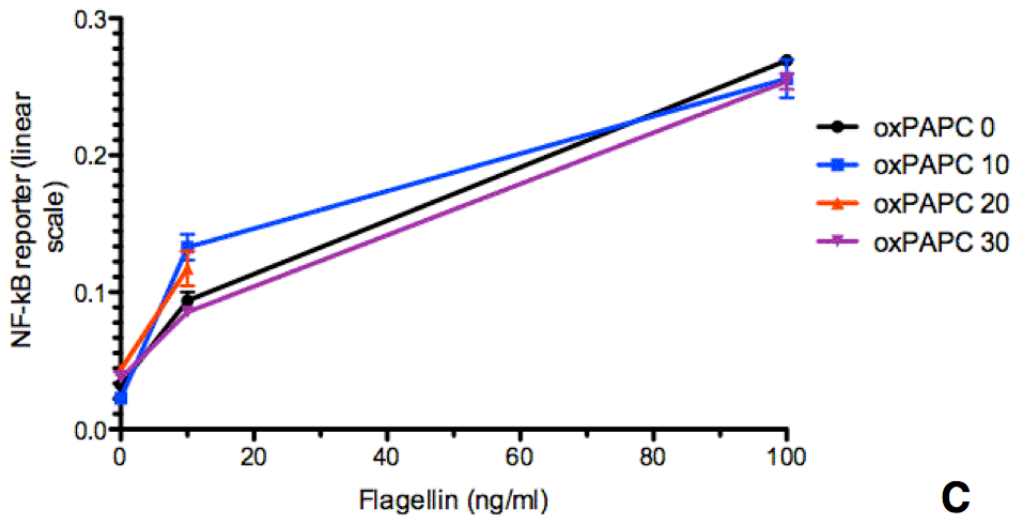
Des cellules THP1-DualTM ont été traitées pendant 24h simultanément avec de l'oxPAPC à différentes concentrations et avec Pam3CSK4 pour stimuler le dimère TLR2/TLR1, du LPS pour stimuler le TLR4, de la flagelline pour stimuler le TLR5 et R848 pour stimuler le TLR7 et le TLR8. L'activation de NF- κ B a été évaluée grâce au test Quanti-BlueTM (InvivoGen) (figure 14).



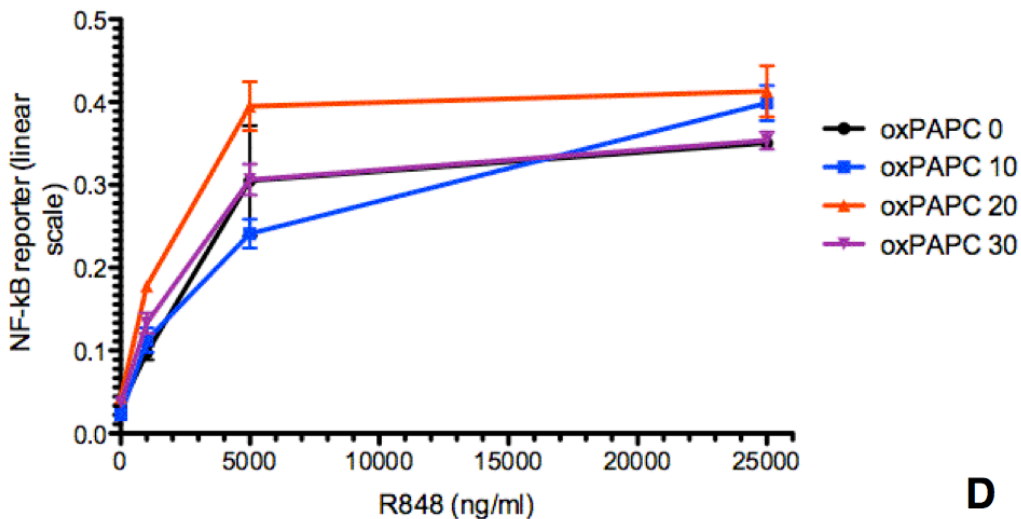
A



B



C



D

Figure 14 : expression du gène rapporteur de NF- κ B suite aux stimulations des TLR en présence d'oxPAPC

A : stimulation du TLR2 et du TLR1 avec Pam3CSK4. Analyse statistique : a : $p > 0,05$ quelle que soit la concentration d'oxPAPC ; b et c : $p < 0,05$ quelle que soit la concentration d'oxPAPC ; d : $p < 0,05$, sauf pour oxPAPC 20.

B : stimulation du TLR4 avec du LPS. Analyse statistique : a,b et c : $p < 0,05$ quelle que soit la concentration d'oxPAPC ; d : $p < 0,05$, sauf pour oxPAPC 10.

C : stimulation du TLR5 avec de la flagelline. Analyse statistique : $p > 0,05$ quelles que soient les concentrations en flagelline et oxPAPC.

D : stimulation du TLR7 avec R848. Analyse statistique : $p > 0,05$ quelles que soient les concentrations en R848 et oxPAPC.

L'oxPAPC présente un effet inhibiteur marqué sur le TLR4 et un effet inhibiteur modéré sur le TLR2. Cet effet est dose-dépendant. En revanche, aucun effet n'a été observé sur le TLR5, le TLR7 et le TLR8. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le test de Student.

Ainsi, sur les cellules utilisées, ce phospholipide oxydé a bien des propriétés anti-inflammatoires, mais l'effet semble être cantonné au TLR2 et au TLR4.

B. Choix de clones Flp-In TRex

Des cellules Flp-In TRex ont été transfectées avec le plasmide pcDNA5/FRT/T0 contenant la séquence du TLR4 tronqué (privé des acides aminés 1 à 560 correspondant à la majeure partie de son domaine extracellulaire). Grâce à un système de recombinaison homologue, ce plasmide est venu s'intégrer dans le génome des cellules au niveau d'un gène de résistance à la zéocine et a apporté un gène de résistance à l'hygromycine.

Ainsi, les cellules ayant intégré stablement le plasmide devaient présenter les caractéristiques suivantes : une sensibilité à la zéocine, une résistance à l'hygromycine et une expression du gène du TLR4 tronqué inducible par les tétracyclines.

Comme dit précédemment, les ectodomains du TLR4 ont un effet inhibiteur sur la dimérisation (Panter, Jerala 2011). Ici, ces parties du récepteurs sont manquantes, ce qui fait que les monomères peuvent spontanément se dimériser et entraîner la signalisation TLR4 (figure 15).

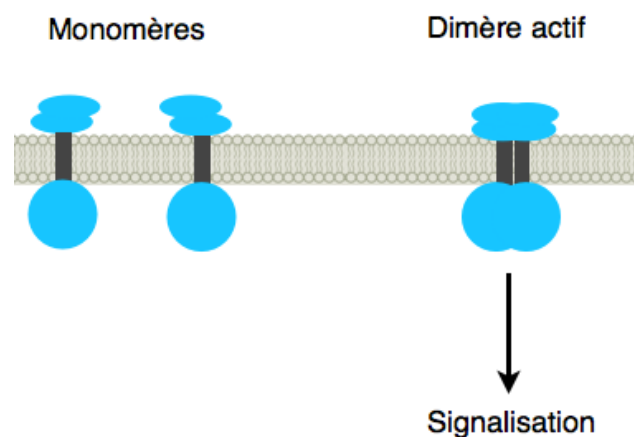


Figure 15 : conformations possibles du TLR4 tronqué

Pour chaque clone obtenu, une partie des cellules a été passée en deux puits de P6 afin de tester la sensibilité à la zéocine. Un puits contenait de la zéocine à

100µg/mL et l'autre n'en contenait pas. De même, pour tester l'inductibilité par les tétracyclines, une partie des cellules a été passée en deux BP100 : une des boîtes était traitée à la doxycycline pendant 24h, l'autre ne l'était pas, puis les cellules étaient lysées et une immunoprécipitation sur FLAG suivie d'un western blot sur FLAG étaient réalisés (figure 16).

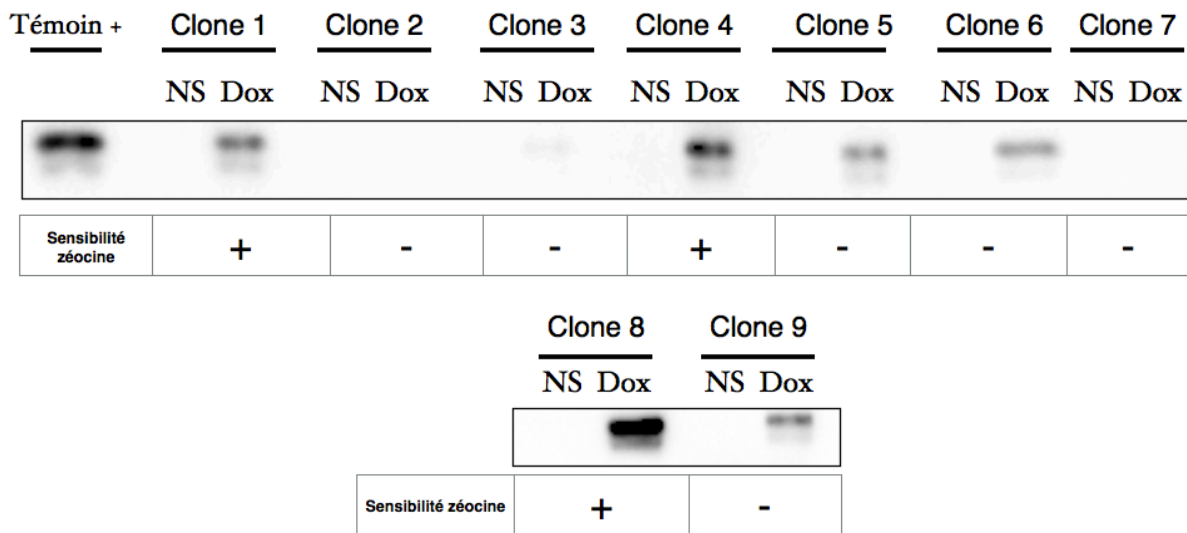


Figure 16 : résultats des tests de sensibilité à la zéocine et des western blot FLAG faisant suite à l'immunoprécipitation FLAG chez les clones Flp-In TRex ayant été transfectés avec le plasmide contenant le gène du TLR4 tronqué

NS : cellules non stimulées. Dox : cellules stimulées à la doxycycline pendant 24h.

FLAG-TLR4 n'était pas détectable sur certains clones, comme le n°2 et le n°7, et ces clones n'étaient pas sensibles à la zéocine, signifiant là qu'ils n'avaient pas intégré le plasmide dans le site prévu pour la recombinaison homologue.

Parmi les clones chez qui FLAG-TLR4 était détectable et qui étaient sensibles à la zéocine, le n°8 a été choisi, car il avait le plus fort signal sur le western blot. C'est sur ce clone qu'une deuxième transfection a été réalisée, en utilisant le plasmide pNiFty2-SEAP afin d'avoir un gène rapporteur de NF-κB. Après sélection à la zéocine grâce au gène de résistance à cette dernière (rapporté par le plasmide pNiFty2-SEAP), les clones obtenus ont été testés avec le réactif Quanti-Blue™ (InvivoGen) avec du TNF-alpha (stimulant l'activation de NF-κB dans les cellules) et un des clones positifs a été choisi pour la suite des expérimentations.

C. L'oxPAPC est anti-inflammatoire chez les cellules Flp-In TRex

Les cellules Flp-In TRex doublement transfectées avec le gène du TLR4 tronqué et le gène rapporteur de NF- κ B ont été traitées avec de l'oxPAPC et de la doxycycline (pour induire l'expression du gène du TLR4) pendant 24h. Les résultats sont indiqués par la figure 17.

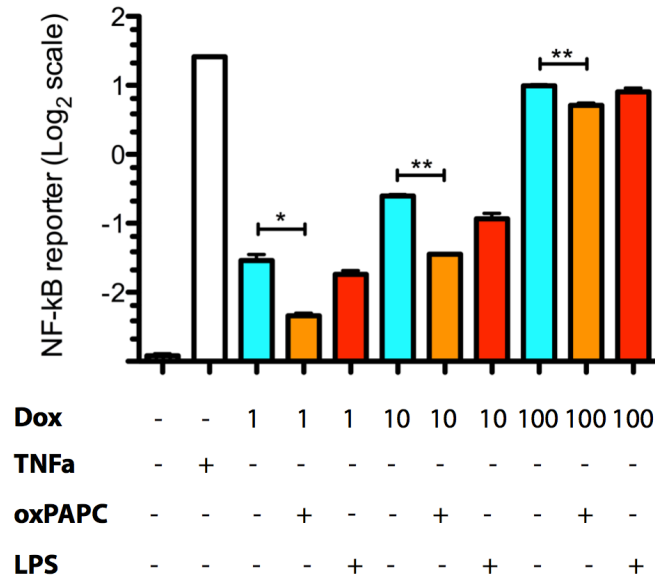


Figure 17 : expression du gène rapporteur de NF- κ B chez les cellules Flp-In TRex doublement transfectés suite au traitement à l'oxPAPC

Les concentrations en doxycycline vont de $1\mu\text{g/mL}$ à $100\mu\text{g/mL}$ et l'oxPAPC est à $30\mu\text{g/mL}$. La durée du traitement est de 24h. L'analyse statistique a été réalisée avec un test de Student. * : $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

En présence de TNF-alpha seul, l'activation de NF- κ B est entraînée, ce qui confirme que le gène rapporteur de NF- κ B est bien intégré au génome des cellules. Le TNF-alpha active NF- κ B indépendamment des TLR (Schütze et al. 1992).

Pour une concentration donnée de doxycycline, l'ajout de LPS n'entraîne pas de différence significative de l'expression de NF- κ B par rapport aux cellules traitées seulement à la doxycycline. Ceci confirme bien que le TLR4 tronqué n'est pas à même de reconnaître le LPS et que la signalisation se fait indépendamment de tout ligand. La troncation du domaine extracellulaire de TLR4 rend la signalisation également indépendante de CD14 et MD2, deux protéines importantes pour l'activation du TLR4 par le LPS.

L'expression du gène rapporteur de NF- κ B augmente avec la dose de doxycycline, ce qui indique que l'augmentation de la densité membranaire du TLR4 mutant est corrélée à une augmentation de la dimérisation et de la signalisation. L'ajout d'oxPAPC entraîne une diminution significative de l'expression de NF- κ B par rapport aux cellules traitées à la doxycycline seule : l'oxPAPC semble donc inhiber la dimérisation de notre TLR4 mutant.

D. Co-immunoprécipitations sur des cellules Ba/F3

Dans le but d'évaluer la dimérisation du TLR4, les cellules Ba/F3 exprimant de façon stable un TLR4 marqué par FLAG et un TLR4 marqué par GFP ont été utilisées. Après traitement au LPS, une immunoprécipitation visant GFP, puis un western blot visant FLAG étaient réalisés.

En utilisant le tampon de lyse n°1, aucun signal n'a été détecté (figure 18).

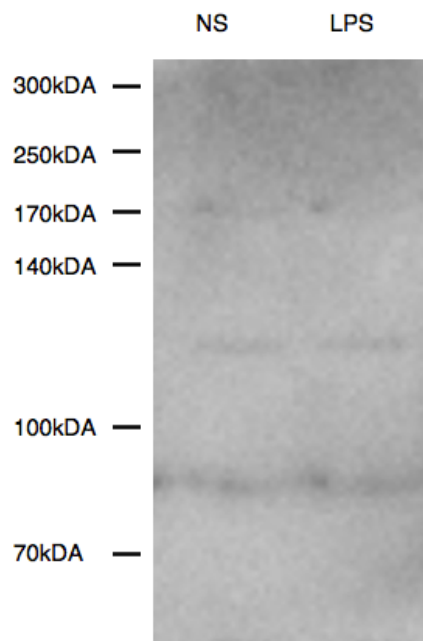


Figure 18 : western blot GFP suite à une immunoprécipitation GFP avec tampon de lyse n°1

Les cellules ont été ou non traitées avec du LPS. Aucun signal n'est détecté.

Dans la mesure où les cellules lysées avec ce tampon de lyse ne nous ont pas permis d'immunoprécipiter GFP, la même manipulation a été réalisée en utilisant le tampon de lyse n°2 (figure n°19)

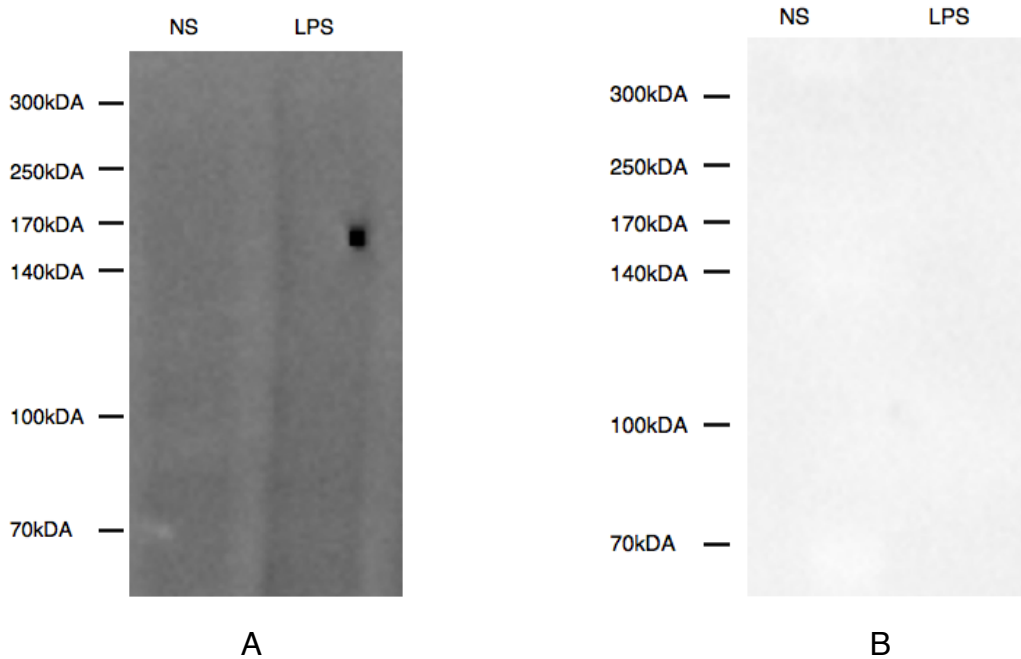


Figure 19 : western blot GFP, utilisation du tampon de lyse n°2

A : résultats du western blot GFP suite à l'immunoprécipitation GFP. B : résultats du western blot FLAG suite à l'immunoprécipitation GFP. Le tampon de lyse n°2 a été utilisé et les cellules ont été ou non traitées avec du LPS.

Ici aussi, nous ne sommes pas parvenus à immunoprécipiter GFP.

Nous avons alors utilisé un nouvel anticorps anti-GFP, tout en gardant le tampon de lyse n°2.

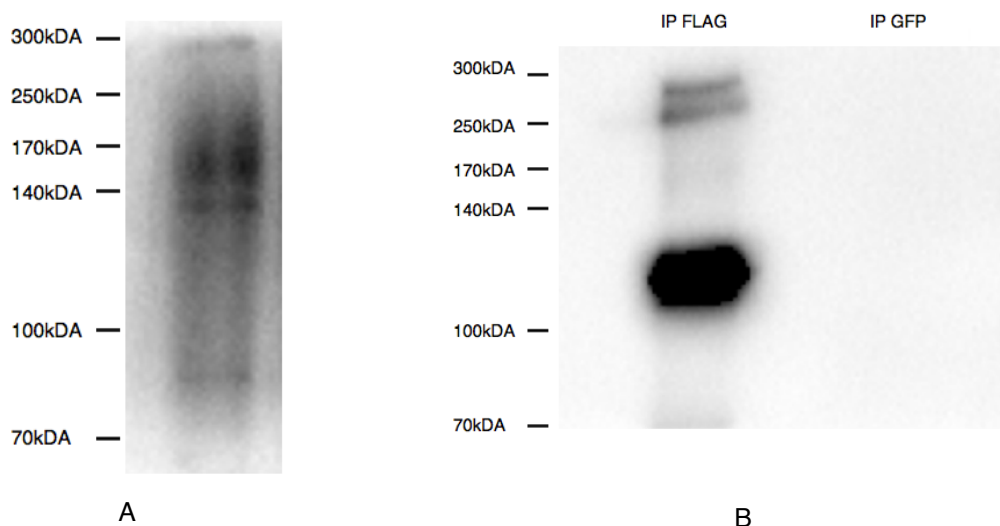


Figure 20 : western blot GFP et FLAG, utilisation du tampon de lyse n°2 et d'un nouvel anticorps

L'anticorps utilisé est celui d'Abcam. Les cellules ont préalablement été traitées au LPS. A : western blot GFP suite à l'immunoprécipitation GFP. B : western blot FLAG suite à des immunoprécipitation FLAG ou GFP.

Malgré ce nouvel anticorps, l'immunoprécipitation anti-GFP s'est à nouveau révélée non concluante (figure n°20A). En revanche, l'immunoprécipitation anti-FLAG suivie du western blot FLAG a permis la détection de FLAG-TLR4 (figure n°20B).

De nouvelles immunoprécipitations anti-GFP ont été réalisées en faisant varier le protocole de l'immuno-blot, comme précisé dans la partie I.C.7. GFP-TLR4 n'a pourtant jamais été détecté (les résultats ne sont pas illustrés).

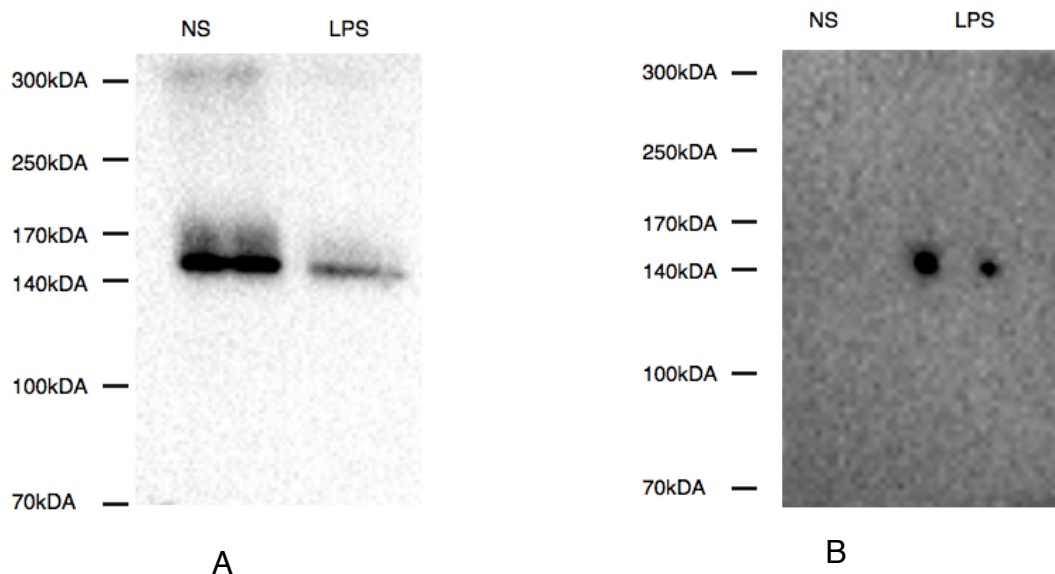


Figure 21 : western blot anti GFP et anti FLAG suite à l'utilisation de GFP-Trap®

A : western blot anti-GFP. Le signal a été détecté au bout de 20 secondes d'exposition, montrant la faible intensité. B : western blot anti-FLAG

Nous avons également essayé l'utilisation de GFP-Trap® du laboratoire Chromtek, mais les résultats se sont également avérés décevants. Pour la première fois, nous avons détecté un signal pouvant correspondre à GFP-TLR4, situé vers 140kDa. Hélas, ce signal était faible, et FLAG-TLR4 n'a pas pu être détecté lors du western blot anti-FLAG (figure n°21).

Compte tenu de notre incapacité à détecter GFP-TLR4 alors que nous avons réussi à obtenir un signal satisfaisant pour FLAG-TLR4, les manipulations sur les cellules Ba/F3 ont été arrêtées. En effet, nous avons suspecté que l'expression de

GFP-TLR4 était insuffisante pour nos manipulations, voire qu'il y avait eu une perte totale de cette expression.

E. Réalisation de FRET sur des macrophages

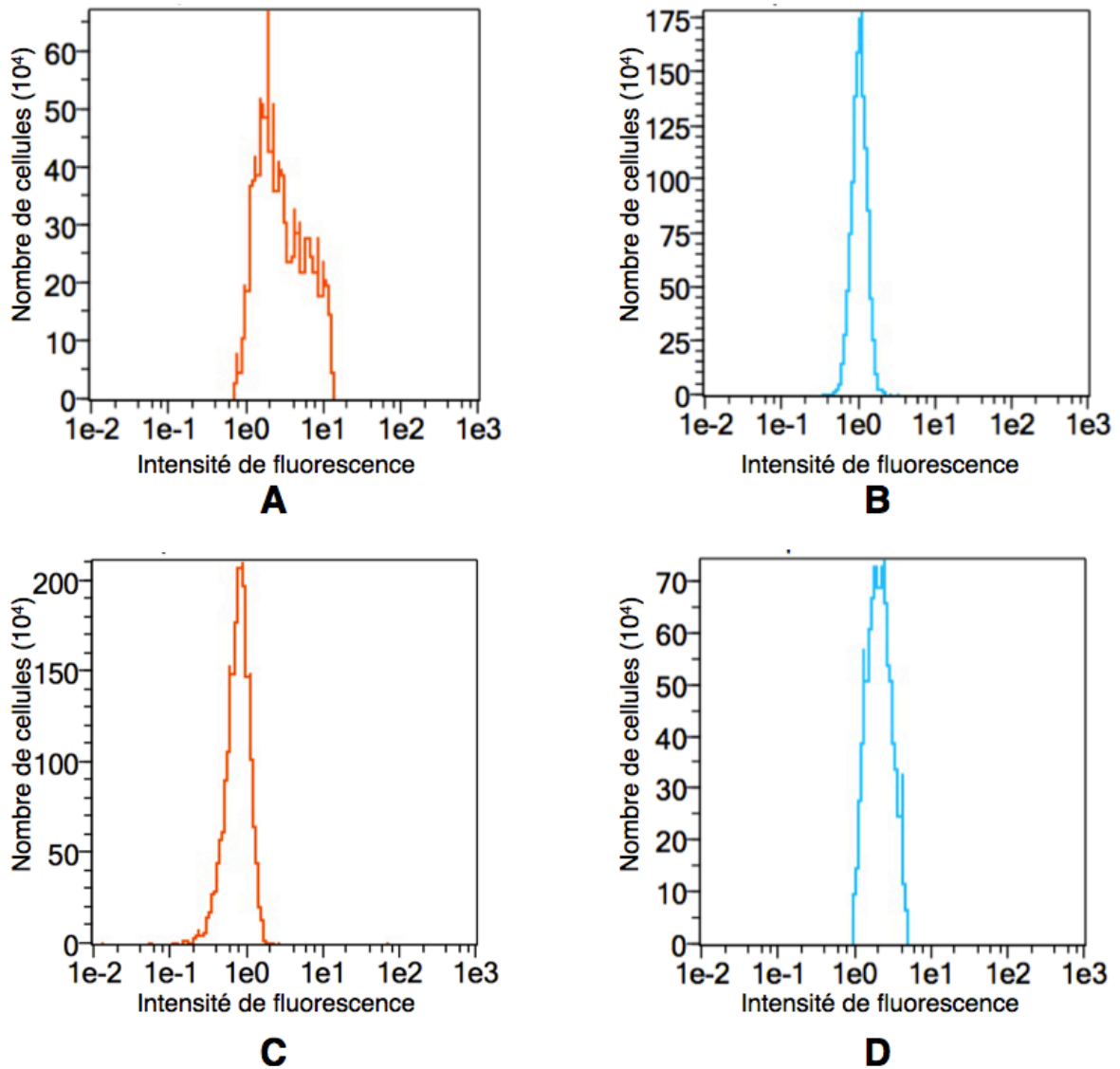


Figure 22 : vérification de l'efficacité des marquages des macrophages BEI par les anticorps Alexa Fluor® 405 et 488

A et B : excitation à 405nm sur des macrophages marqués uniquement par l'anticorps Alexa Fluor® 405 (A) ou uniquement par l'anticorps Alexa Fluor® 488 (B). C et D: excitation à 488nm sur des macrophages marqués uniquement par l'anticorps Alexa Fluor® 405 (C) ou uniquement par l'anticorps Alexa Fluor® 488 (D).

Dans un premier temps, l'efficacité des marquages a été évaluée en stimulant les cellules simplement marquées. On peut constater que la stimulation à 405nm de macrophages marqués uniquement par l'anticorps Alexa Fluor® 405 donne bien lieu

à une fluorescence (figure 22A), cette dernière n'apparaissant pas chez des cellules marquées uniquement par l'anticorps Alexa Fluor® 488 (figure 22B). L'inverse est vrai lorsque la stimulation a lieu à 488nm (figure 22C et 22D). Ceci montrait que les marquages avaient bien été réalisés et que nous pouvions poursuivre les expérimentations.

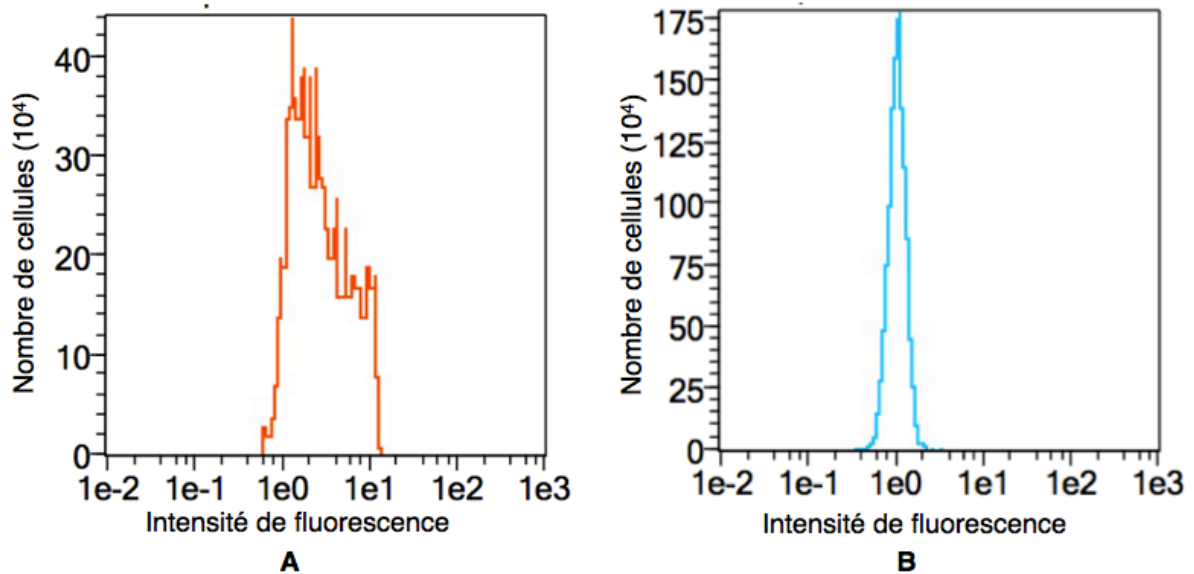


Figure 23 : résultats des analyses de cytométrie en flux et de FRET sur des macrophages

Les cellules doublement marquées ont été stimulées à 405nm. A : fluorescence de l'anticorps donneur. B : fluorescence de l'anticorps accepteur.

En excitant à 405nm les cellules doublement marquées, seule la fluorescence de l'anticorps Alexa Fluor® 405 était détectée (figure 23) : aucun FRET n'était mis en évidence. Autrement dit, la fluorescence émise par l'anticorps donneur ne parvenait pas à exciter l'anticorps receveur.

III. Discussion

Dans notre système expérimental, l'oxPAPC a un effet inhibiteur sur les voies de signalisation du TLR2 et du TLR4. Dans la mesure où la signalisation dépendant des autres TLR étudiés ne semble pas être affectée par le traitement à l'oxPAPC, on pourrait envisager que l'inhibition observée ne soit pas due à une action sur les voies de signalisation communes à tous les TLR ou à une action sur le gène Nrf2, comme cela a été suggéré par Bretscher et al., et discuté dans la première partie de ce manuscrit. Une certaine prudence s'impose toutefois, car seule l'activation de NF- κ B a été mesurée, et de nombreux autres gènes étant impliqués dans la régulation de la réaction inflammatoire, les résultats auraient pu être différents en mesurant par exemple les taux de certaines interleukines.

Le TLR2 et le TLR4 ont un point commun dans leur fonctionnement : ils impliquent tous les deux le co-récepteur CD14. Or, ce dernier peut se lier aux phospholipides oxydés : il serait légitime de penser que l'oxPAPC inhiberait l'interaction entre CD14 et ces TLR. Cette hypothèse peut cependant être réfutée par les résultats que nous avons obtenus grâce aux cellules Flp-In TRex transfectées avec le gène du TLR4 tronqué, car ces dernières n'exprimaient ni CD14, ni MD2. On peut donc en conclure que l'oxPAPC a un effet inhibiteur dû soit à une action sur la dimérisation du TLR2 et du TLR4, soit à une action en aval.

Afin d'évaluer l'impact du traitement à l'oxPAPC sur la dimérisation du TLR4 sauvage et non sur un mutant dépourvu de la majorité du domaine extracellulaire, nous avons réalisé des co-immunoprécipitations sur le TLR4 marqué par FLAG et GFP. Malheureusement, nous ne sommes pas parvenus à immunoprécipiter correctement GFP. Dans la mesure où plusieurs protocoles et anticorps ont été essayés, nous en avons conclu que les cellules utilisées n'exprimaient que très peu GFP, voire pas du tout. Le clone en notre possession était probablement un mutant, car plusieurs équipes ont obtenu des résultats satisfaisant en utilisant ces mêmes cellules (figure 24).

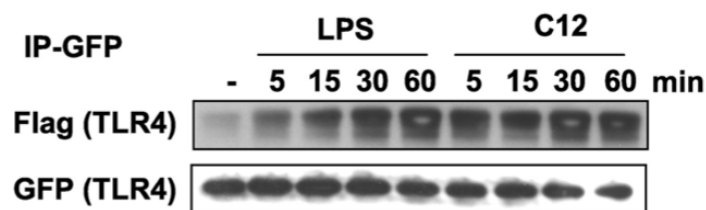


Figure 24 : exemple de co-immunoprécipitation sur le TLR4

Western blot tiré de Wong et al., 2009. Les cellules ont été traitées avec du LPS ou avec un acide gras saturé (l'acide laurique) et une immunoprécipitation sur GFP a été réalisée. On peut voir qu'en présence de LPS ou d'acide laurique, le TLR4 se dimérise, car FLAG devient détectable.

L'on pourrait expliquer pourquoi le TLR2 et le TLR4 sont inhibés par l'oxPAPC en émettant l'hypothèse que ces TLR existent sous la forme de dimères préformés et que la formation de ces derniers est rendue plus difficile suite au traitement aux phospholipides oxydés, de part des perturbations de la fluidité membranaire.

En effet, certains TLR sont présents dans les membranes sous la forme de monomères, mais peuvent aussi l'être sous la forme de dimères préformés et inactifs. Ceci a été démontré par FRET pour le TLR9 (Latz et al. 2007) et par cristallographie pour le TLR8 (Tanji et al. 2013), et l'on peut envisager que cela puisse être vrai pour les autres TLR, bien que cela reste à prouver. Un équilibre serait créé entre ces deux formes et il dépendrait d'une part du niveau d'expression du TLR et d'autre part de la composition de la membrane. Altérer cette dernière pourrait donc déplacer l'équilibre dans un sens ou dans l'autre et nous avons émis l'hypothèse que l'oxPAPC le déplaçait vers la forme monomérique (figure 25).

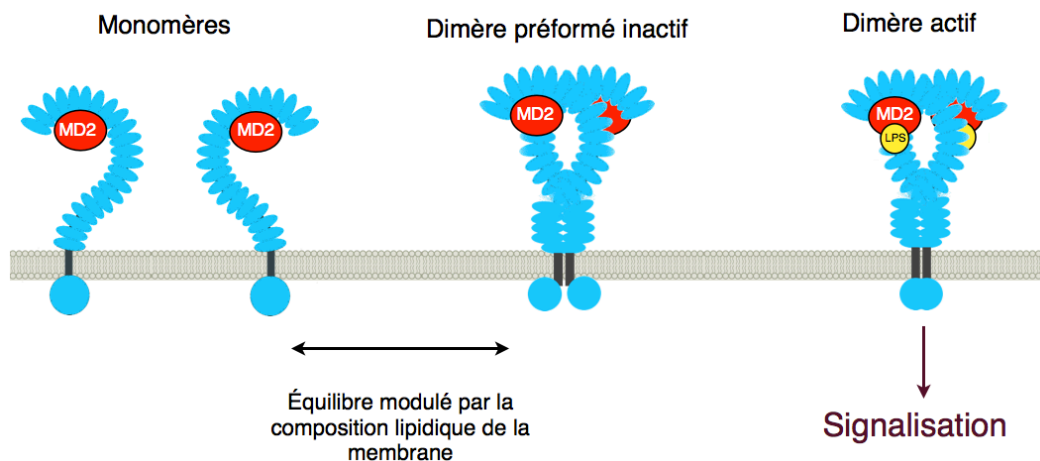


Figure 25 : conformations possibles des TLR

Notre hypothèse est que la composition lipidique module l'équilibre entre les monomères et les dimères inactifs préformés, et que les phospholipides oxydés ont un impact sur cette composition.

Afin de rechercher l'existence de ces dimères préformés chez le TLR4, nous avons réalisé du FRET en utilisant un anticorps anti-TLR4 couplé à deux fluorochromes différents.

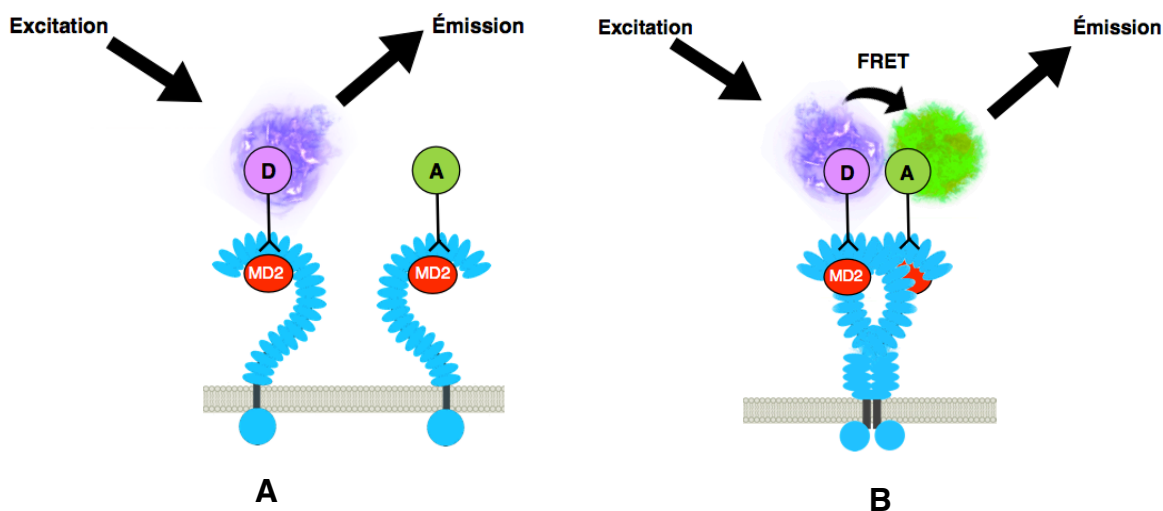


Figure 26 : fluorescence par transfert d'énergie chez le TLR4

A : TLR4 sous forme de deux monomères séparés. La distance entre les deux fluorochromes est trop importante pour permettre le FRET. B : TLR4 dimérisé. L'énergie produite par l'excitation du fluorochrome donneur est transmise au fluorochrome accepteur, la proximité des deux fluorochromes permettant la réalisation du FRET.

Le FRET est caractérisé par un transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes, un fluorochrome donneur et un fluorochrome accepteur (figure 26).

L'efficacité de ce transfert est inversement proportionnelle à la distance séparant les deux fluorochromes — qui ne doivent pas être éloignés de plus de quelques Angström. Ainsi, la mesure de cette efficacité permet de déterminer si deux molécules sont proches l'une de l'autre ou non, soit de détecter des interactions moléculaires. Les fluorochromes doivent être judicieusement choisis, afin que le spectre d'émission du donneur corresponde au spectre d'excitation de l'accepteur ; sans quoi, aucun FRET ne pourrait avoir lieu, quand bien même les molécules seraient accolées l'une à l'autre. Dans notre cas, le spectre d'émission de l'anticorps Alexa Fluor® 405 se superpose bien au spectre d'excitation de l'anticorps Alexa Fluor® 488 (figure 27). Il est également important de noter qu'en excitant à 405nm, l'excitation d'Alexa Fluor® 405 est optimale, tandis que celle d'Alexa Fluor® 488 est négligeable.

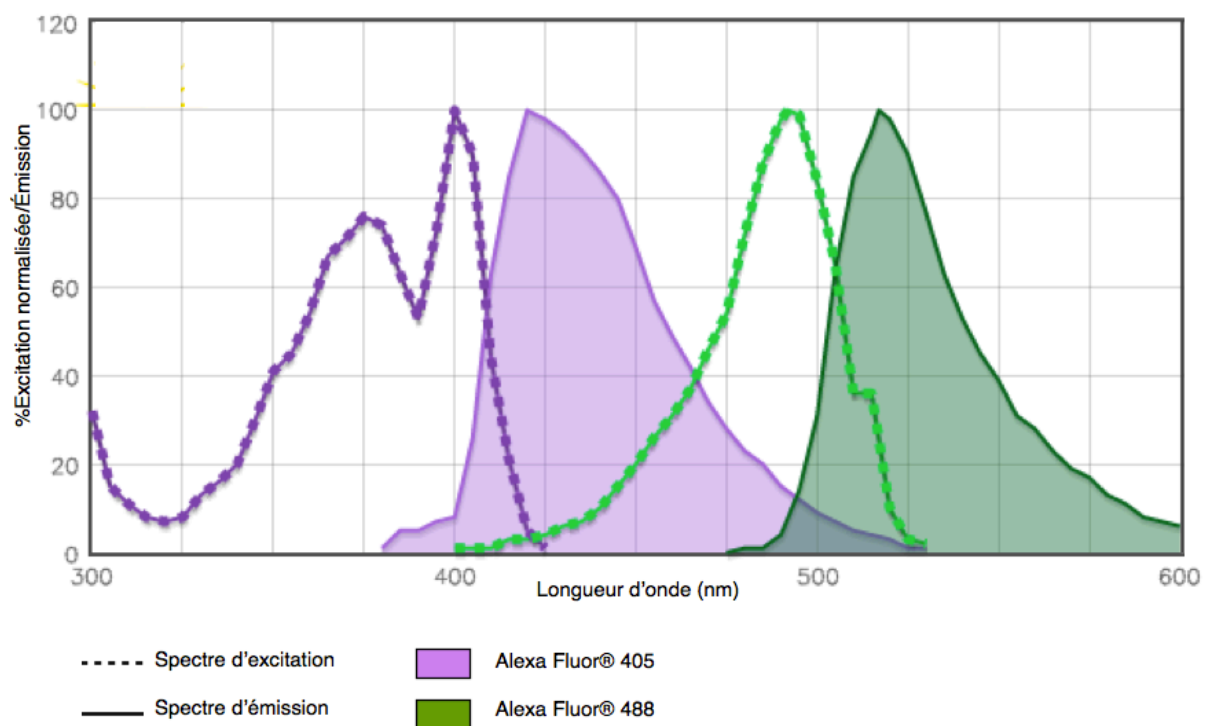


Figure 27 : spectres d'excitation et d'émission des anticorps Alexa Fluor® utilisés

La technique du FRET était particulièrement intéressante ici, puisqu'elle permettait, en théorie, d'évaluer la dimérisation des TLR en fonction des variations de la composition membranaire et de mettre en évidence la présence de dimères préformés chez les TLR étudiés.

Les résultats se sont avérés négatifs en cytométrie en flux. Ceci peut s'expliquer de deux manières différentes : soit la dimérisation du TLR4 n'avait pas lieu, soit le TLR4 se dimérisait bel et bien, mais les deux monomères étaient trop éloignés l'un de l'autre pour que le FRET puisse se réaliser. L'absence de FRET peut aussi s'expliquer par des problèmes techniques. Le protocole expérimental ne semble en effet pas optimal, car l'intensité de marquage TLR4 paraît insuffisante.

Conclusion

Nous pouvons conclure qu'avec les cellules étudiées, les phospholipides oxydés peuvent avoir un effet anti-inflammatoire passant par une inhibition de la signalisation du TLR2 et du TLR4 sauvages. Les expériences menées avec le TLR4 mutant, dépourvu d'une grande partie de son domaine extracellulaire, montrent que cet effet pourrait être dû à une moindre dimérisation du TLR4, sans pour autant que nous puissions exclure un effet sur la cascade de signalisation.

Afin de compléter ce projet, plusieurs expériences seraient à réaliser. Le laboratoire de virologie de l'ENVT s'est récemment équipé d'un lecteur de plaque pourvu d'un monochromateur et il serait intéressant de réaliser du FRET grâce à cet appareil plus sensible, afin de chercher à nouveau à déterminer si le traitement de cellules avec des phospholipides oxydés joue un rôle dans la capacité des TLR à se dimériser.

Surtout, il faudrait essayer à nouveau de réaliser des co-immunoprécipitations sur le TLR4, en créant cette fois-ci nous même les lignées cellulaires. Le laboratoire possède des plasmides exprimant le TLR4 marqué par FLAG et par HA, mais, faute de temps disponible, les transfections n'ont pas été réalisées. A partir de ces cellules, il serait extrêmement intéressant de reproduire les protocoles utilisés avec les cellules Ba/F3. Si nous obtenions des résultats satisfaisants, cela confirmerait l'hypothèse que les cellules Ba/F3 que nous utilisons n'expriment pas GFP-TLR4.

Enfin, ces travaux pourraient être poursuivis en utilisant d'autres lipides modulant la signalisation du TLR4, comme par exemple, l'acide palmitique, qui serait capable d'activer la voie de signalisation du TLR4 (Wong et al. 2009).

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, Romain VOLMER, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de BESSIERE Pierre intitulée « **Inhibition de la signalisation des TLR par les phospholipides oxydés** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.



Fait à Toulouse, le 17 octobre 2017
Docteur Romain VOLMER
Maître de Conférences
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN

Vu :
Le Président du jury :
Professeur Bruno SEGUI



Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier
Monsieur Jean-Pierre VINEL

Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU



Régine ANDRE-OBRECHT

Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

Bibliographie

AKASHI, Sachiko, SAITOH, Shin-ichiroh, WAKABAYASHI, Yasutaka, KIKUCHI, Takane, TAKAMURA, Noriaki, NAGAI, Yoshinori, KUSUMOTO, Yutaka, FUKASE, Koichi, KUSUMOTO, Shoichi, ADACHI, Yoshiyuki, KOSUGI, Atsushi et MIYAKE, Kensuke, 2003. Lipopolysaccharide Interaction with Cell Surface Toll-like Receptor 4-MD-2: Higher Affinity than That with MD-2 or CD14. *The Journal of Experimental Medicine*. 6 octobre 2003. Vol. 198, n° 7, pp. 1035-1042.

AKIRA, Shizuo, UEMATSU, Satoshi et TAKEUCHI, Osamu, 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 24 février 2006. Vol. 124, n° 4, pp. 783-801.

AL-SAWAF, Othman, CLARNER, Tim, FRAGOULIS, Athanassios, KAN, Yuet Wai, PUFÉ, Thomas, STREETZ, Konrad et WRUCK, Christoph Jan, 2015. Nrf2 in health and disease: current and future clinical implications. *Clinical Science*. 1 décembre 2015. Vol. 129, n° 12, pp. 989-999.

ANBAZHAGAN, Veerappan et SCHNEIDER, Dirk, 2010. The membrane environment modulates self-association of the human GpA TM domain--implications for membrane protein folding and transmembrane signaling. *Biochimica Et Biophysica Acta*. octobre 2010. Vol. 1798, n° 10, pp. 1899-1907.

ANDERSON, K. V., JÜRGENS, G. et NÜSSLEIN-VOLHARD, C., 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell*. octobre 1985. Vol. 42, n° 3, pp. 779-789.

ANDREYEV, Alexander Y., FAHY, Eoin, GUAN, Ziqiang, KELLY, Samuel, LI, Xiang, MCDONALD, Jeffrey G., MILNE, Stephen, MYERS, David, PARK, Hyejung, RYAN, Andrea, THOMPSON, Bonne M., WANG, Elaine, ZHAO, Yihua, BROWN, H. Alex, MERRILL, Alfred H., RAETZ, Christian R. H., RUSSELL, David W., SUBRAMANIAM, Shankar et DENNIS, Edward A., 2010. Subcellular organelle lipidomics in TLR4-activated macrophages. *Journal of Lipid Research*. septembre 2010. Vol. 51, n° 9, pp. 2785-2797.

BLUML, S., KIRCHBERGER, S., BOCHKOV, V. N., KRONKE, G., STUHLMEIER, K., MAJDIC, O., ZLABINGER, G. J., KNAPP, W., BINDER, B. R., STOCKL, J. et LEITINGER, N., 2005. Oxidized Phospholipids Negatively Regulate Dendritic Cell Maturation Induced by TLRs and CD40. *The Journal of Immunology*. 1 juillet 2005. Vol. 175, n° 1, pp. 501-508.

BOCHKOV, Valery N., KADL, Alexandra, HUBER, Joakim, GRUBER, Florian, BINDER, Bernd R. et LEITINGER, Norbert, 2002. Protective role of phospholipid oxidation products in endotoxin-induced tissue damage. *Nature*. 5 septembre 2002. Vol. 419, n° 6902, pp. 77-81.

BOCHKOV, Valery N., OSKOLKOVA, Olga V., BIRUKOV, Konstantin G., LEVONEN,

Anna-Liisa, BINDER, Christoph J. et STÖCKL, Johannes, 2010. Generation and Biological Activities of Oxidized Phospholipids. *Antioxidants & Redox Signaling*. 15 avril 2010. Vol. 12, n° 8, pp. 1009-1059.

BRETSCHER, P., EGGER, J., SHAMSHIEV, A., TROTZMULLER, M., KOFELER, H., CARREIRA, E. M., KOPF, M. et FREIGANG, S., 2015. Phospholipid oxidation generates potent anti-inflammatory lipid mediators that mimic structurally related pro-resolving eicosanoids by activating Nrf2. *EMBO Molecular Medicine*. 1 mai 2015. Vol. 7, n° 5, pp. 593-607.

BRIGHTBILL, H. D., LIBRATY, D. H., KRUTZIK, S. R., YANG, R. B., BELISLE, J. T., BLEHARSKI, J. R., MAITLAND, M., NORGDARD, M. V., PLEVY, S. E., SMALE, S. T., BRENNAN, P. J., BLOOM, B. R., GODOWSKI, P. J. et MODLIN, R. L., 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science (New York, N.Y.)*. 30 juillet 1999. Vol. 285, n° 5428, pp. 732-736.

BRINKMANN, Melanie M., SPOONER, Eric, HOEBE, Kasper, BEUTLER, Bruce, PLOEGH, Hidde L. et KIM, You-Me, 2007. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *The Journal of Cell Biology*. 23 avril 2007. Vol. 177, n° 2, pp. 265-275.

CARICILLI, Andréa M., NASCIMENTO, Paula H., PAULI, José R., TSUKUMO, Daniela M. L., VELLOSO, Lício A., CARVALHEIRA, José B. et SAAD, Mário J. A., 2008. Inhibition of toll-like receptor 2 expression improves insulin sensitivity and signaling in muscle and white adipose tissue of mice fed a high-fat diet. *The Journal of Endocrinology*. décembre 2008. Vol. 199, n° 3, pp. 399-406.

CHAWLA, A., BARAK, Y., NAGY, L., LIAO, D., TONTONOZ, P. et EVANS, R. M., 2001. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nature Medicine*. janvier 2001. Vol. 7, n° 1, pp. 48-52.

CHESARINO, Nicholas M., HACH, Jocelyn C., CHEN, James L., ZARO, Balyn W., RAJARAM, Murugesan VS, TURNER, Joanne, SCHLESINGER, Larry S., PRATT, Matthew R., HANG, Howard C. et YOUNT, Jacob S., 2014. Chemoproteomics reveals Toll-like receptor fatty acylation. *BMC Biology*. 2014. Vol. 12, pp. 91.

CRUZ, Daniel, WATSON, Andrew D., MILLER, Christopher S., MONTOYA, Dennis, OCHOA, Maria-Teresa, SIELING, Peter A., GUTIERREZ, Miguel A., NAVAB, Mohamad, REDDY, Srinivasa T., WITZTUM, Joseph L., FOGELMAN, Alan M., REA, Thomas H., EISENBERG, David, BERLINER, Judith et MODLIN, Robert L., 2008. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *The Journal of Clinical Investigation*. août 2008. Vol. 118, n° 8, pp. 2917-2928.

CUNHA, Daniel A., HEKERMAN, Paul, LADRIÈRE, Laurence, BAZARRA-CASTRO, Angie, ORTIS, Fernanda, WAKEHAM, Marion C., MOORE, Fabrice, RASSCHAERT, Joanne, CARDOZO, Alessandra K., BELLOMO, Elisa, OVERBERGH, Lutgart,

MATHIEU, Chantal, LUPI, Roberto, HAI, Tsonwin, HERCHUELZ, Andre, MARCHETTI, Piero, RUTTER, Guy A., EIZIRIK, Décio L. et CNOP, Miriam, 2008. Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. *Journal of Cell Science*. 15 juillet 2008. Vol. 121, n° Pt 14, pp. 2308-2318.

DAVIS, Jeremy E., GABLER, Nicholas K., WALKER-DANIELS, Jennifer et SPURLOCK, Michael E., 2008. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity (Silver Spring, Md.)*. juin 2008. Vol. 16, n° 6, pp. 1248-1255.

DINARELLO, C. A., 1991. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*. 15 avril 1991. Vol. 77, n° 8, pp. 1627-1652.

DZIARSKI, R., WANG, Q., MIYAKE, K., KIRSCHNING, C. J. et GUPTA, D., 2001. MD-2 Enables Toll-Like Receptor 2 (TLR2)-Mediated Responses to Lipopolysaccharide and Enhances TLR2-Mediated Responses to Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria and Their Cell Wall Components. *The Journal of Immunology*. 1 février 2001. Vol. 166, n° 3, pp. 1938-1944.

ENDRES, Nicholas F., DAS, Rahul, SMITH, Adam W., ARKHIPOV, Anton, KOVACS, Erika, HUANG, Yongjian, PELTON, Jeffrey G., SHAN, Yibing, SHAW, David E., WEMMER, David E., GROVES, Jay T. et KURIYAN, John, 2013. Conformational coupling across the plasma membrane in activation of the EGF receptor. *Cell*. 31 janvier 2013. Vol. 152, n° 3, pp. 543-556.

ERRIDGE, C., KENNEDY, S., SPICKETT, C. M. et WEBB, D. J., 2008. Oxidized Phospholipid Inhibition of Toll-like Receptor (TLR) Signaling Is Restricted to TLR2 and TLR4: ROLES FOR CD14, LPS-BINDING PROTEIN, AND MD2 AS TARGETS FOR SPECIFICITY OF INHIBITION. *Journal of Biological Chemistry*. 5 septembre 2008. Vol. 283, n° 36, pp. 24748-24759.

ERRIDGE, Clett et SAMANI, Nilesh J., 2009. Saturated fatty acids do not directly stimulate Toll-like receptor signaling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. novembre 2009. Vol. 29, n° 11, pp. 1944-1949.

FENG, Bo, YAO, Pin Mei, LI, Yankun, DEVLIN, Cecilia M., ZHANG, Dajun, HARDING, Heather P., SWEENEY, Michele, RONG, James X., KURIAKOSE, George, FISHER, Edward A., MARKS, Andrew R., RON, David et TABAS, Ira, 2003. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nature Cell Biology*. septembre 2003. Vol. 5, n° 9, pp. 781-792.

FERREIRA, Adaliene Versiani Matos, MARIO, Érica Guilhen, PORTO, Laura Cristina Jardim, ANDRADE, Silvia Passos et BOTION, Leida Maria, 2011. High-Carbohydrate Diet Selectively Induces Tumor Necrosis Factor- α Production in Mice Liver. *Inflammation*. 1 avril 2011. Vol. 34, n° 2, pp. 139-145.

FORMAN, B. M., TONTONOZ, P., CHEN, J., BRUN, R. P., SPIEGELMAN, B. M. et EVANS, R. M., 1995. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the

adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*. 1 décembre 1995. Vol. 83, n° 5, pp. 803-812.

FREIGANG, Stefan, 2016. The regulation of inflammation by oxidized phospholipids. *European Journal of Immunology*. août 2016. Vol. 46, n° 8, pp. 1818-1825.

FREIRE, Marcelo O. et VAN DYKE, Thomas E., 2013. Natural resolution of inflammation. *Periodontology 2000*. octobre 2013. Vol. 63, n° 1, pp. 149-164.

FU, Suneng, YANG, Ling, LI, Ping, HOFMANN, Oliver, DICKER, Lee, HIDE, Winston, LIN, Xihong, WATKINS, Steven M., IVANOV, Alexander R. et HOTAMISLIGIL, Gökhan S., 2011. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature*. 26 mai 2011. Vol. 473, n° 7348, pp. 528-531.

GALIC, Sandra, OAKHILL, Jon S. et STEINBERG, Gregory R., 2010. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 25 mars 2010. Vol. 316, n° 2, pp. 129-139.

GAY, N. J. et GANGLOFF, M., 2008. Toll-Like Receptors (TLRs) and Innate Immunity. In : . Baeur, S & Hartmann, G. pp. 181-200.

GAY, N. J. et KEITH, F. J., 1991. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature*. 30 mai 1991. Vol. 351, n° 6325, pp. 355-356.

GAY, Nicholas J., SYMMONS, Martyn F., GANGLOFF, Monique et BRYANT, Clare E., 2014. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nature Reviews Immunology*. 25 juillet 2014. Vol. 14, n° 8, pp. 546-558.

GERARD, Craig, 1998. Bacterial infection: For whom the bell tolls. *Nature*. 17 septembre 1998. Vol. 395, n° 6699, pp. 217-219.

HANSSON, Göran K. et HERMANSSON, Andreas, 2011. The immune system in atherosclerosis. *Nature Immunology*. mars 2011. Vol. 12, n° 3, pp. 204-212.

HANSSON, Göran K., 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine*. 21 avril 2005. Vol. 352, n° 16, pp. 1685-1695.

HEDGER, George, SANSOM, Mark S. P. et KOLDSØ, Heidi, 2015. The juxtamembrane regions of human receptor tyrosine kinases exhibit conserved interaction sites with anionic lipids. *Scientific Reports*. 17 mars 2015. Vol. 5, pp. 9198.

HEINZ, Leonhard X., BAUMANN, Christoph L., KÖBERLIN, Marielle S., SNIJDER, Berend, GAWISH, Riem, SHUI, Guanghou, SHARIF, Omar, ASPALTER, Irene M., MÜLLER, André C., KANDASAMY, Richard K., BREITWIESER, Florian P., PICHLMAIR, Andreas, BRUCKNER, Manuela, REBSAMEN, Manuele, BLÜML,

Stephan, KARONITSCH, Thomas, FAUSTER, Astrid, COLINGE, Jacques, BENNETT, Keiryn L., KNAPP, Sylvia, WENK, Markus R. et SUPERTI-FURGA, Giulio, 2015. The Lipid-Modifying Enzyme SMPDL3B Negatively Regulates Innate Immunity. *Cell Reports*. juin 2015. Vol. 11, n° 12, pp. 1919-1928.

HIRSCHFELD, M., MA, Y., WEIS, J. H., VOGEL, S. N. et WEIS, J. J., 2000. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 15 juillet 2000. Vol. 165, n° 2, pp. 618-622.

HOMMELBERG, Pascal P. H., PLAT, Jogchum, LANGEN, Ramon C. J., SCHOLS, Annemie M. W. J. et MENSINK, Ronald P., 2009. Fatty acid-induced NF-kappaB activation and insulin resistance in skeletal muscle are chain length dependent. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. janvier 2009. Vol. 296, n° 1, pp. E114-120.

HORNUNG, Veit, GUENTHNER-BILLER, Margit, BOURQUIN, Carole, ABLASSER, Andrea, SCHLEE, Martin, UEMATSU, Satoshi, NORONHA, Anne, MANOHARAN, Muthiah, AKIRA, Shizuo, DE FOUGEROLLES, Antonin, ENDRES, Stefan et HARTMANN, Gunther, 2005. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nature Medicine*. mars 2005. Vol. 11, n° 3, pp. 263-270.

HOSHINO, K., TAKEUCHI, O., KAWAI, T., SANJO, H., OGAWA, T., TAKEDA, Y., TAKEDA, K. et AKIRA, S., 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 1 avril 1999. Vol. 162, n° 7, pp. 3749-3752.

IMAI, Yumiko, KUBA, Keiji, NEELY, G. Greg, YAGHUBIAN-MALHAMI, Rubina, PERKMANN, Thomas, VAN LOO, Geert, ERMOLAEVA, Maria, VELDHUIZEN, Ruud, LEUNG, Y. H. Connie, WANG, Hongliang, LIU, Haolin, SUN, Yang, PASPARAKIS, Manolis, KOPF, Manfred, MECH, Christin, BAVARI, Sina, PEIRIS, J. S. Malik, SLUTSKY, Arthur S., AKIRA, Shizuo, HULTQVIST, Malin, HOLMDAHL, Rikard, NICHOLLS, John, JIANG, Chengyu, BINDER, Christoph J. et PENNINGER, Josef M., 2008. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell*. 18 avril 2008. Vol. 133, n° 2, pp. 235-249.

IP, Y. T., REACH, M., ENGSTROM, Y., KADALAYIL, L., CAI, H., GONZÁLEZ-CRESPO, S., TATEI, K. et LEVINE, M., 1993. Dif, a dorsal-related gene that mediates an immune response in Drosophila. *Cell*. 19 novembre 1993. Vol. 75, n° 4, pp. 753-763.

JANEWAY, C. A., 1989. Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1 janvier 1989. Vol. 54, pp. 1-13.

JIN, Mi Sun, KIM, Sung Eun, HEO, Jin Young, LEE, Mi Eun, KIM, Ho Min, PAIK,

Sang-Gi, LEE, Hayyoung et LEE, Jie-Oh, 2007. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*. 21 septembre 2007. Vol. 130, n° 6, pp. 1071-1082.

KADL, Alexandra, SHARMA, Poonam R., CHEN, Wenshu, AGRAWAL, Rachana, MEHER, Akshaya K., RUDRAIAH, Swetha, GRUBBS, Nathaniel, SHARMA, Rahul et LEITINGER, Norbert, 2011. Oxidized phospholipid-induced inflammation is mediated by Toll-like receptor 2. *Free radical biology & medicine*. 15 novembre 2011. Vol. 51, n° 10, pp. 1903-1909.

KAWAI, Taro et AKIRA, Shizuo, 2006. Innate immune recognition of viral infection. *Nature Immunology*. février 2006. Vol. 7, n° 2, pp. 131-137.

KAWAI, Taro et AKIRA, Shizuo, 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*. mai 2010. Vol. 11, n° 5, pp. 373-384.

KE, Yunbo, ZEBDA, Nouredine, OSKOKOVA, Olga, AFONYUSHKIN, Taras, BERDYSHEV, Evgeny, TIAN, Yufeng, MENG, Fanyong, SARICH, Nicolene, BOCHKOV, Valery N., WANG, Ji Ming, BIRUKOVA, Anna A. et BIRUKOV, Konstantin G., 2017. Anti-Inflammatory Effects of OxPAPC Involve Endothelial Cell Mediated Generation of LXA4. *Circulation Research*. 18 mai 2017. pp. CIRCRESAHA.116.310308.

KIM, Francis, PHAM, Matilda, LUTTRELL, Ian, BANNERMAN, Douglas D., TUPPER, Joan, THALER, Joshua, HAWN, Thomas R., RAINES, Elaine W. et SCHWARTZ, Michael W., 2007. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circulation Research*. 8 juin 2007. Vol. 100, n° 11, pp. 1589-1596.

KÖBERLIN, Marielle S, HEINZ, Leonhard X et SUPERTI-FURGA, Giulio, 2016. Functional crosstalk between membrane lipids and TLR biology. *Current Opinion in Cell Biology*. avril 2016. Vol. 39, pp. 28-36.

KÖBERLIN, Marielle S., SNIJDER, Berend, HEINZ, Leonhard X., BAUMANN, Christoph L., FAUSTER, Astrid, VLADIMER, Gregory I., GAVIN, Anne-Claude et SUPERTI-FURGA, Giulio, 2015. A Conserved Circular Network of Coregulated Lipids Modulates Innate Immune Responses. *Cell*. juillet 2015. Vol. 162, n° 1, pp. 170-183.

KÖNNER, A. Christine et BRÜNING, Jens C., 2011. Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. janvier 2011. Vol. 22, n° 1, pp. 16-23.

LATZ, Eicke, VERMA, Anjali, VISINTIN, Alberto, GONG, Mei, SIROIS, Cheryl M., KLEIN, Dionne C. G., MONKS, Brian G., MCKNIGHT, C. James, LAMPHIER, Marc S., DUPREX, W. Paul, ESPEVIK, Terje et GOLENBOCK, Douglas T., 2007. Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nature Immunology*. juillet 2007. Vol. 8, n° 7, pp. 772-779.

LEE, J. Y., SOHN, K. H., RHEE, S. H. et HWANG, D., 2001. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *The Journal of Biological Chemistry*. 18 mai 2001. Vol. 276, n° 20, pp. 16683-16689.

LEE, J. Y., 2003. Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. *The Journal of Lipid Research*. 1 mars 2003. Vol. 44, n° 3, pp. 479-486.

LEE, J. Y., ZHAO, L., YOUN, H. S., WEATHERILL, A. R., TAPPING, R., FENG, L., LEE, W. H., FITZGERALD, K. A. et HWANG, D. H., 2004. Saturated Fatty Acid Activates but Polyunsaturated Fatty Acid Inhibits Toll-like Receptor 2 Dimerized with Toll-like Receptor 6 or 1. *Journal of Biological Chemistry*. 23 avril 2004. Vol. 279, n° 17, pp. 16971-16979.

LEE, Sangderk, BIRUKOV, Konstantin G., ROMANOSKI, Casey E., SPRINGSTEAD, James R., LUSIS, Aldons J. et BERLINER, Judith A., 2012. Role of phospholipid oxidation products in atherosclerosis. *Circulation Research*. 31 août 2012. Vol. 111, n° 6, pp. 778-799.

LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHHART, J. M. et HOFFMANN, J. A., 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 20 septembre 1996. Vol. 86, n° 6, pp. 973-983.

LEMAITRE, Bruno, 2004. The road to Toll. *Nature Reviews Immunology*. juillet 2004. Vol. 4, n° 7, pp. 521-527.

LEVENTAL, Ilya, GRZYBEK, Michal et SIMONS, Kai, 2010. Greasing Their Way: Lipid Modifications Determine Protein Association with Membrane Rafts. *Biochemistry*. 3 août 2010. Vol. 49, n° 30, pp. 6305-6316.

LEVENTAL, Ilya, LINGWOOD, Daniel, GRZYBEK, Michal, COSKUN, Ünal et SIMONS, Kai, 2010. Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 21 décembre 2010. Vol. 107, n° 51, pp. 22050-22054.

LIBBY, Peter, 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 19 décembre 2002. Vol. 420, n° 6917, pp. 868-874.

MANCUSO, Giuseppe, GAMBUZZA, Maria, MIDIRI, Angelina, BIONDO, Carmelo, PAPASERGI, Salvatore, AKIRA, Shizuo, TETI, Giuseppe et BENINATI, Concetta, 2009. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nature Immunology*. juin 2009. Vol. 10, n° 6, pp. 587-594.

MAUERHOFER, Christina, PHILIPPOVA, Maria, OSKOLKOVA, Olga V. et BOCHKOV, Valery N., 2016. Hormetic and anti-inflammatory properties of oxidized

phospholipids. *Molecular Aspects of Medicine*. juin 2016. Vol. 49, pp. 78-90.

MCCLURE, Ryan et MASSARI, Paola, 2014. TLR-Dependent Human Mucosal Epithelial Cell Responses to Microbial Pathogens. *Frontiers in Immunology*. 12 août 2014. Vol. 5.

MEDZHITOV, Ruslan, PRESTON-HURLBURT, Paula et JANEWAY, Charles A., 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 24 juillet 1997. Vol. 388, n° 6640, pp. 394-397.

MULLER, Carole, BANDEMÉR, Jan, VINDIS, Cecile, CAMARÉ, Caroline, MUCHER, Elodie, GUÉRAUD, Françoise, LARROQUE-CARDOSO, Pauline, BERNIS, Corinne, AUGE, Nathalie, SALVAYRE, Robert et NEGRE-SALVAYRE, Anne, 2013. Protein disulfide isomerase modification and inhibition contribute to ER stress and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins. *Antioxidants & Redox Signaling*. 1 mars 2013. Vol. 18, n° 7, pp. 731-742.

MUNFORD, R. S. et HALL, C. L., 1986. Detoxification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins) by a human neutrophil enzyme. *Science (New York, N.Y.)*. 10 octobre 1986. Vol. 234, n° 4773, pp. 203-205.

MYOISHI, Masafumi, HAO, Hiroyuki, MINAMINO, Tetsuo, WATANABE, Kouki, NISHIHARA, Kensaku, HATAKEYAMA, Kinta, ASADA, Yujiro, OKADA, Ken-ichiro, ISHIBASHI-UEDA, Hatsue, GABBIANI, Giulio, BOCHATON-PIALLAT, Marie-Luce, MOCHIZUKI, Naoki et KITAKAZE, Masafumi, 2007. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation*. 11 septembre 2007. Vol. 116, n° 11, pp. 1226-1233.

NAGY, Péter, VÁMOSI, György, BODNÁR, Andrea, LOCKETT, Stephen J. et SZÖLLŐSI, János, 1998. Intensity-based energy transfer measurements in digital imaging microscopy. *European Biophysics Journal*. 1 juin 1998. Vol. 27, n° 4, pp. 377-389.

OSKOLKOVA, O. V., AFONYUSHKIN, T., PREINERSTORFER, B., BICKER, W., VON SCHLIEFFEN, E., HAINZL, E., DEMYANETS, S., SCHABBAUER, G., LINDNER, W., TSELEPIS, A. D., WOJTA, J., BINDER, B. R. et BOCHKOV, V. N., 2010. Oxidized Phospholipids Are More Potent Antagonists of Lipopolysaccharide than Inducers of Inflammation. *The Journal of Immunology*. 15 décembre 2010. Vol. 185, n° 12, pp. 7706-7712.

PANTER, Gabriela et JERALA, Roman, 2011. The ectodomain of the Toll-like receptor 4 prevents constitutive receptor activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 1 juillet 2011. Vol. 286, n° 26, pp. 23334-23344.

PARK, Beom Seok, SONG, Dong Hyun, KIM, Ho Min, CHOI, Byong-Seok, LEE, Hayyoung et LEE, Jie-Oh, 2009. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex. *Nature*. 30 avril 2009. Vol. 458, n° 7242, pp. 1191-1195.

PLUM, Leona, SCHUBERT, Markus et BRÜNING, Jens C., 2005. The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. mars 2005. Vol. 16, n° 2, pp. 59-65.

POGGI, M., BASTELICA, D., GUAL, P., IGLESIAS, M. A., GREMEAUX, T., KNAUF, C., PEIRETTI, F., VERDIER, M., JUHAN-VAGUE, I., TANTI, J. F., BURCELIN, R. et ALESSI, M. C., 2007. C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia*. juin 2007. Vol. 50, n° 6, pp. 1267-1276.

POLTORAK, A., HE, X., SMIRNOVA, I., LIU, M. Y., VAN HUFFEL, C., DU, X., BIRDWELL, D., ALEJOS, E., SILVA, M., GALANOS, C., FREUDENBERG, M., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., LAYTON, B. et BEUTLER, B., 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science (New York, N.Y.)*. 11 décembre 1998. Vol. 282, n° 5396, pp. 2085-2088.

RAETZ, C. R., 1990. Biochemistry of endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*. 1990. Vol. 59, pp. 129-170.

RAGHAVAN, Badrinarayanan, MARTIN, Stefan F, ESSER, Philipp R, GOEBELER, Matthias et SCHMIDT, Marc, 2012. Metal allergens nickel and cobalt facilitate TLR4 homodimerization independently of MD2. *EMBO reports*. 12 octobre 2012. Vol. 13, n° 12, pp. 1109-1115.

REUVEN, Eliran Moshe, FINK, Avner et SHAI, Yechiel, 2014. Regulation of innate immune responses by transmembrane interactions: Lessons from the TLR family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. juin 2014. Vol. 1838, n° 6, pp. 1586-1593.

ROSS, R. et HARKER, L., 1976. Hyperlipidemia and atherosclerosis. *Science (New York, N.Y.)*. 17 septembre 1976. Vol. 193, n° 4258, pp. 1094-1100.

ROSSI, A., KAPAHI, P., NATOLI, G., TAKAHASHI, T., CHEN, Y., KARIN, M. et SANTORO, M. G., 2000. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature*. 6 janvier 2000. Vol. 403, n° 6765, pp. 103-108.

SAITOH, S.-i., 2004. Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *International Immunology*. 24 mai 2004. Vol. 16, n° 7, pp. 961-969.

SCHÜTZE, Stefan, POTTHOFF, Karin, MACHLEIDT, Thomas, BERKOVIC, Dinko, WIEGMANN, Katja et KRÖNKE, Martin, 1992. TNF activates NF- κ B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced « Acidic » sphingomyelin breakdown. *Cell*. 27 novembre 1992. Vol. 71, n° 5, pp. 765-776.

SEIMON, Tracie A., NADOLSKI, Marissa J., LIAO, Xianghai, MAGALLON, Jorge, NGUYEN, Matthew, FERIC, Nicole T., KOSCHINSKY, Marlys L., HARKEWICZ,

Richard, WITZTUM, Joseph L., TSIMIKAS, Sotirios, GOLENBOCK, Douglas, MOORE, Kathryn J. et TABAS, Ira, 2010. Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2-dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress. *Cell Metabolism*. 3 novembre 2010. Vol. 12, n° 5, pp. 467-482.

SENN, Joseph J., 2006. Toll-like Receptor-2 Is Essential for the Development of Palmitate-induced Insulin Resistance in Myotubes. *Journal of Biological Chemistry*. 15 septembre 2006. Vol. 281, n° 37, pp. 26865-26875.

SHI, Hang, KOKOEVA, Maia V., INOUYE, Karen, TZAMELI, Iphigenia, YIN, Huali et FLIER, Jeffrey S., 2006. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 1 novembre 2006. Vol. 116, n° 11, pp. 3015-3025.

SIMS, J. E., MARCH, C. J., COSMAN, D., WIDMER, M. B., MACDONALD, H. R., MCMAHAN, C. J., GRUBIN, C. E., WIGNALL, J. M., JACKSON, J. L. et CALL, S. M., 1988. cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science (New York, N.Y.)*. 29 juillet 1988. Vol. 241, n° 4865, pp. 585-589.

STEWART, R., 1987. Dorsal, an embryonic polarity gene in Drosophila, is homologous to the vertebrate proto-oncogene, c-rel. *Science (New York, N.Y.)*. 30 octobre 1987. Vol. 238, n° 4827, pp. 692-694.

STEWART, Cameron R., STUART, Lynda M., WILKINSON, Kim, VAN GILS, Janine M., DENG, Jiusheng, HALLE, Annett, RAYNER, Katey J., BOYER, Laurent, ZHONG, Ruiqin, FRAZIER, William A., LACY-HULBERT, Adam, EL KHOURY, Joseph, GOLENBOCK, Douglas T. et MOORE, Kathryn J., 2010. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nature Immunology*. février 2010. Vol. 11, n° 2, pp. 155-161.

STULNIG, T. M., HUBER, J., LEITINGER, N., IMRE, E. M., ANGELISOVA, P., NOWOTNY, P. et WALDHAUSL, W., 2001. Polyunsaturated eicosapentaenoic acid displaces proteins from membrane rafts by altering raft lipid composition. *The Journal of Biological Chemistry*. 5 octobre 2001. Vol. 276, n° 40, pp. 37335-37340.

SUGANAMI, T., TANIMOTO-KOYAMA, K., NISHIDA, J., ITOH, M., YUAN, X., MIZUARAI, S., KOTANI, H., YAMAOKA, S., MIYAKE, K., AOE, S., KAMEI, Y. et OGAWA, Y., 2007. Role of the Toll-like Receptor 4/NF- κ B Pathway in Saturated Fatty Acid-Induced Inflammatory Changes in the Interaction Between Adipocytes and Macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1 janvier 2007. Vol. 27, n° 1, pp. 84-91.

TANJI, Hiromi, OHTO, Umeharu, SHIBATA, Takuma, MIYAKE, Kensuke et SHIMIZU, Toshiyuki, 2013. Structural reorganization of the Toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands. *Science (New York, N.Y.)*. 22 mars 2013. Vol. 339, n° 6126, pp. 1426-1429.

TRIANTAFILOU, Martha, MIYAKE, Kensuke, GOLENBOCK, Douglas T. et TRIANTAFILOU, Kathy, 2002. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *Journal of Cell Science*. 15 juin 2002. Vol. 115, n° Pt 12, pp. 2603-2611.

UEMATSU, Satoshi, FUJIMOTO, Kosuke, JANG, Myoung Ho, YANG, Bo-Gie, JUNG, Yun-Jae, NISHIYAMA, Mika, SATO, Shintaro, TSUJIMURA, Tohru, YAMAMOTO, Masafumi, YOKOTA, Yoshifumi, KIYONO, Hiroshi, MIYASAKA, Masayuki, ISHII, Ken J. et AKIRA, Shizuo, 2008. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nature Immunology*. juillet 2008. Vol. 9, n° 7, pp. 769-776.

VOLMER, Romain, VAN DER PLOEG, Kattria et RON, David, 2013. Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 19 mars 2013. Vol. 110, n° 12, pp. 4628-4633.

WALTON, Kimberly A., COLE, Amy L., YEH, Michael, SUBBANAGOUNDER, Ganesamoorthy, KRUTZIK, Stephan R., MODLIN, Robert L., LUCAS, Robert M., NAKAI, Junko, SMART, Eric J., VORA, Deven K. et BERLINER, Judith A., 2003. Specific Phospholipid Oxidation Products Inhibit Ligand Activation of Toll-Like Receptors 4 and 2. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1 juillet 2003. Vol. 23, n° 7, pp. 1197-1203.

WANG, Di, LOU, Jun, OUYANG, Chuan, CHEN, Weilin, LIU, Yiqi, LIU, Xinyuan, CAO, Xuetao, WANG, Jianli et LU, Linrong, 2010. Ras-related protein Rab10 facilitates TLR4 signaling by promoting replenishment of TLR4 onto the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 3 août 2010. Vol. 107, n° 31, pp. 13806-13811.

WATSON, A. D., LEITINGER, N., NAVAB, M., FAULL, K. F., HÖRKKÖ, S., WITZTUM, J. L., PALINSKI, W., SCHWENKE, D., SALOMON, R. G., SHA, W., SUBBANAGOUNDER, G., FOGELMAN, A. M. et BERLINER, J. A., 1997. Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*. 23 mai 1997. Vol. 272, n° 21, pp. 13597-13607.

WEISBERG, Stuart P., MCCANN, Daniel, DESAI, Manisha, ROSENBAUM, Michael, LEIBEL, Rudolph L. et FERRANTE, Anthony W., 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*. décembre 2003. Vol. 112, n° 12, pp. 1796-1808.

WELLEN, Kathryn E. et HOTAMISLIGIL, Gökhan S., 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *Journal of Clinical Investigation*. 2 mai 2005. Vol. 115, n° 5, pp. 1111-1119.

WHITE, S. H. et WIMLEY, W. C., 1999. Membrane protein folding and stability:

physical principles. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 1999. Vol. 28, pp. 319-365.

WHITHAM, S., DINESH-KUMAR, S. P., CHOI, D., HEHL, R., CORR, C. et BAKER, B., 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*. 23 septembre 1994. Vol. 78, n° 6, pp. 1101-1115.

WHO | Obesity and overweight. Disponible à l'adresse : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>

WONG, Scott W., KWON, Myung-Ja, CHOI, Augustine M. K., KIM, Hong-Pyo, NAKAHIRA, Kiichi et HWANG, Daniel H., 2009. Fatty Acids Modulate Toll-like Receptor 4 Activation through Regulation of Receptor Dimerization and Recruitment into Lipid Rafts in a Reactive Oxygen Species-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry*. 2 octobre 2009. Vol. 284, n° 40, pp. 27384-27392.

XU, Haiyan, BARNES, Glenn T., YANG, Qing, TAN, Guo, YANG, Daseng, CHOU, Chieh J., SOLE, Jason, NICHOLS, Andrew, ROSS, Jeffrey S., TARTAGLIA, Louis A. et CHEN, Hong, 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*. décembre 2003. Vol. 112, n° 12, pp. 1821-1830.

YAMAMOTO, Masahiro, YAMAZAKI, Soh, UEMATSU, Satoshi, SATO, Shintaro, HEMMI, Hiroaki, HOSHINO, Katsuaki, KAISHO, Tsuneyasu, KUWATA, Hirotaka, TAKEUCHI, Osamu, TAKESHIGE, Koichiro, SAITOH, Tatsuya, YAMAOKA, Shoji, YAMAMOTO, Naoki, YAMAMOTO, Shunsuke, MUTA, Tatsushi, TAKEDA, Kiyoshi et AKIRA, Shizuo, 2004. Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I κ B ζ . *Nature*. 8 juillet 2004. Vol. 430, n° 6996, pp. 218-222.

YANG, R. B., MARK, M. R., GRAY, A., HUANG, A., XIE, M. H., ZHANG, M., GODDARD, A., WOOD, W. I., GURNEY, A. L. et GODOWSKI, P. J., 1998. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature*. 17 septembre 1998. Vol. 395, n° 6699, pp. 284-288.

ZHANG, Renliang, SHEN, Zhongzhou, NAUSEEF, William M. et HAZEN, Stanley L., 2002. Defects in leukocyte-mediated initiation of lipid peroxidation in plasma as studied in myeloperoxidase-deficient subjects: systematic identification of multiple endogenous diffusible substrates for myeloperoxidase in plasma. *Blood*. 1 mars 2002. Vol. 99, n° 5, pp. 1802-1810.

ZHU, Xuewei, OWEN, John S., WILSON, Martha D., LI, Haitao, GRIFFITHS, Gary L., THOMAS, Michael J., HILTBOLD, Elizabeth M., FESSLER, Michael B. et PARKS, John S., 2010. Macrophage ABCA1 reduces MyD88-dependent Toll-like receptor trafficking to lipid rafts by reduction of lipid raft cholesterol. *Journal of Lipid Research*. 1 novembre 2010. Vol. 51, n° 11, pp. 3196-3206.

