



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/> 25398

**To cite this version:**

Rahier, Manon . *Développement de méthodes d'analyses de la dimérisation du récepteur TLR4.*, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2018, 78 p.

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

# DEVELOPPEMENT DE METHODES D'ANALYSES DE LA DIMERISATION DU RECEPTEUR TLR4

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

*par*

**RAHIER Manon**

Née, le 14 mars 1993 à SAINT-JEAN-DE-BRAYE (45)

---

**Directeur de thèse : M. Romain VOLMER**

---

## JURY

PRESIDENT :

**M. Christophe PASQUIER**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**M. Romain VOLMER**

**Mme Christelle CAMUS**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



## REPARTITION DES ENSEIGNANTS PAR GRADE

(Mise à jour : 07/09/2018)

**DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN**

### **PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE (6)**

Mme	CLAUW Martine	SECTION C.N.E.C.A. N° 8	
M.	CONCORDET Didier		3
M.	DELVERDIER Maxence		7
M.	ENJALBERT Francis		6
M.	PETIT Claude		1
M.	SHELCHER François		8

### **PROFESSEURS 1° CLASSE (17)**

M	BAILLY Jean-Denis		4
M.	BERTAGNOLI Stéphane		1
M.	BERTHELOT Xavier		6
M.	BOUSQUET-MELOU Alain		7
M.	BRUGERE Hubert		10
Mme	CADIERGUES Marie-Christine		8
Mme	CHASTANT-MAILLARD Sylvie		6
M.	DUCOS Alain		6
M.	FOUCRAS Gilles		8
Mme	GAYRARD-TROY Véronique		7
M	GUERIN Jean-Luc		6
Mme	HAGEN-PICARD Nicole		6
M.	JACQUIET Philippe		8
M.	LEFEBVRE Hervé		7
M.	MEYER Gilles		8
M.	SANS Pierre		6
Mme	TRUMEL Catherine		7

### **PROFESSEURS 2° CLASSE (7)**

Mme	BOULLIER Séverine		1
Mme	BOURGES-ABELLA Nathalie		7
M.	GUERRE Philippe		7
Mme	LACROUX Caroline		7
M.	MAILLARD Renaud		8
M	MOGICATO Giovanni		7
Mme	LETRON-RAYMOND Isabelle		7

### **PROFESSEUR CERTIFIÉ (P.C.E.A.)**

Mme	MICHAUD Françoise, Professeur d'Anglais
M.	SEVERAC Benoît, Professeur d'Anglais

### **MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE (11)**

M.	BERGONIER Dominique		6
Mme	DIQUELOU Armelle		8
M.	JAEG Jean-Philippe		7
M.	JOUGLAR Jean-Yves		8
M.	LYAZRHI Faouzi		3
M.	MATHON Didier		8
Mme	MEYNADIER Annabelle		6
Mme	PRIYMENKO Nathalie		6
M.	RABOISSON Didier		6
M	VERWAERDE Patrick		8
M.	VOLMER Romain		1

### **MAITRES DE CONFERENCES classe normale (24)**

M.	ASIMUS Erik		8
Mme	BENNIS-BRET Lydie		7
Mme	BIBBAL Delphine		4
Mme	BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle		1
Mme	BOUHSIRA Emilie		8
M	CONCHOU Fabrice		8
M	CORBIERE Fabien		8
M.	CUEVAS RAMOS Gabriel		8
Mme	DANIELS Hélène		1
Mme	DAVID Laure		4
Mlle	DEVIERS Alexandra		7
M.	DOUET Jean-Yves		8
Mme	FERRAN Aude		7
Mme	LALLEMAND Elodie		8
Mme	LAVOUE Rachel		8
M.	LE LOC'H Guillaume		8
M	LIENARD Emmanuel		8
Mme	MILA Hanna		6
Mme	MEYNAUD-COLLARD Patricia		8
M.	NOUVEL Laurent		6
Mme	PALIERNE Sophie		8
Mme	PAUL Mathilde		6
M.	VERGNE Timothée		7
Mme	WARET-SZKUTA Agnès		6

### **A.E.R.C. (6)**

Mme	BLONDEL Margaux		8
M.	CARTIAUX Benjamin		7
M.	COMBARROS-GARCIA Daniel		8
Mme	COSTES Laura		4
M.	GAIDE Nicolas		7
M.	JOUSSERAND Nicolas		8

### **MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUEL (2)**

Mme	DORE-BORDE Laura		8
M.	LEYNAUD Vincent		8



# REMERCIEMENTS

## **A Monsieur le Professeur Christophe PASQUIER**

Professeur des Universités de Toulouse  
Praticien hospitalier au CHU de Toulouse  
*Service de Virologie*

Pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,  
Hommages respectueux.

## **A Monsieur le Docteur Romain VOLMER**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
*Microbiologie et Virologie*

Pour avoir accepté d'encadrer notre travail et de m'avoir épaulé,  
Toute ma reconnaissance.

## **A Madame le Docteur Christelle BOUCLAINVILLE-CAMUS**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
*Biologie cellulaire et moléculaire*

Pour avoir accepté avec enthousiasme de faire partie de notre jury de thèse,  
Sincères remerciements.

## **A toute l'équipe du laboratoire d'IHAP,**

Pour votre accueil chaleureux,  
Merci à tous.

## **A mes parents,**

Pour votre soutien, sans vous je ne serai pas là où je suis aujourd'hui,  
Tout mon amour.



# SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	9
PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
I. Les TLRs et leur ligands .....	11
A. Les PAMPs .....	12
B. Les DAMPs .....	15
C. Les allergènes.....	17
II. La dimérisation des TLRs.....	19
III. Les TLRs et les lipides .....	22
A. L'obésité morbide et les pathologies associées .....	22
B. Les effets pro- et anti-inflammatoire des acides gras.....	24
C. Les lipides modulent la dimérisation des protéines transmembranaires. ....	28
IV. Les méthodes d'analyse de la dimérisation.....	33
A. La co-immunoprécipitation .....	33
B. Le « cross-linking » ou réticulation .....	36
C. Le FRET.....	37
D. L'anisotropie de fluorescence .....	39
PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE.....	41
I. Matériel et méthodes.....	41
A. Production des plasmides .....	41
1. Obtenir une colonie de bactéries contenant les plasmides à répliquer ....	41
2. Extraction des plasmides.....	42
3. Digestion analytique pour vérifier l'identité des plasmides.....	42
B. Détection des dimères de TLR4 par immunoprécipitation.....	43
1. Culture cellulaire .....	43
1.1. Cellules 293T .....	43
1.2. Cellules THP1 .....	43

2. Transfections .....	44
3. Lyse des cellules .....	44
3.1. Tampons utilisés .....	44
3.2. Protocole de lyse.....	44
4. Co-immunoprécipitations .....	45
4.1. Tampons utilisés .....	45
4.2. Protocole d'immunoiprécipitation .....	45
5. Protocole du Western blot.....	45
6. Traitement à l'oxPAPC et stimulation au LPS.....	46
6.1. Préparation de l'oxPAPC.....	46
6.2. Stimulation à l'oxPAPC et au LPS des cellules 293T .....	46
6.3. Contrôle de l'efficacité d'oxPAPC à l'aide des cellules THP1.....	46
7. Stimulation au nickel.....	47
C. Détection des dimères de TLR4 par FRET .....	47
1. Culture cellulaire.....	47
2. Protocole FRET .....	47
2.1. Mise au point des marquages TLR4 au FACS .....	47
2.2. Mise au point du FRET .....	48
II. Résultats .....	49
A. Production des plasmides contenant un gène codant pour un TLR4 humain	49
B. Détection des dimères de TLR4 par immunoprécipitation.....	50
1. Mise en place du protocole .....	50
1.1. Vérification du protocole de transfection et détection des TLR4 par Western blot.....	50
1.2. La co-immunoprécipitation .....	51
2. Analyse des conséquences des stimulations LPS et oxPAPC sur la quantité de dimères à la surface des cellules.....	54
3. Le nickel stimulerait la dimérisation de TLR4 indépendamment de MD2..	59

C. Détection des dimères par FRET.....	61
III. Discussion.....	65
CONCLUSION.....	71
BIBLIOGRAPHIE.....	73

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1</b> : Schéma représentant les parois des différentes bactéries .....	12
<b>Figure 2</b> : Schéma représentant les PAMPs et leurs TLRs.....	15
<b>Figure 3</b> : Schéma représentant la formation des hétérodimères TLR2/TLR1 et TLR2/TLR6.....	20
<b>Figure 4</b> : Schéma représentant un dimère de TLR4: la dimérisation du domaine TIR du TLR4 permet la fixation de protéines adaptatrices comme MyD88 et ainsi activer la cascade de signalisation.....	20
<b>Figure 5</b> : Schéma représentant le changement de conformation de l'homodimère TLR8 en présence d'un ligand.....	21
<b>Figure 6</b> : Diagramme schématique de la cascade de signalisation inflammatoire inhibée par le DHA via l'activation de la $\beta$ -arrestine2. ....	26
<b>Figure 7</b> : Schéma représentant les hypothèses supposant que l'oxPAPC agit comme un compétiteur direct du LPS.....	27
<b>Figure 8</b> : Le modèle de « rotation flexible » pour l'activation du récepteur EGF.....	29
<b>Figure 9</b> : Schéma représentant la translocation des monomères de TLR4 dans les radeaux lipidiques.....	31
<b>Figure 10</b> : Schéma représentant les effets de l'oxPAPC sur le seuil d'activation du dimère de TLR4.....	33
<b>Figure 11</b> : Schéma explicatif de la co-immunoprécipitation.....	35
<b>Figure 12</b> : Recouvrement de l'émission du donneur et de l'excitation de l'accepteur nécessaire au FRET .....	37
<b>Figure 13</b> : Nécessité d'avoir une distance faible (<10 nm) entre les deux fluorochromes pour avoir un FRET.....	38
<b>Figure 14</b> : Gel d'agarose pour la migration des protéines selon leur taille.....	49
<b>Figure 15</b> : Détection du TLR4-GFP .....	50
<b>Figure 16</b> : Détection du TLR4-HA suite à une immunoprécipitation avec des anticorps monoclonaux anti-HA.....	51
<b>Figure 17</b> : Schéma représentant les réactions qui devraient se produire au cours de la co-immunoprécipitation et ce que l'on devrait observer sur le western blot.....	53
<b>Figure 18</b> : Détection des dimères de TLR4 par co-immunoprécipitation.. .....	54

<b>Figure 19</b> : Détection des dimères de TLR4 avec ou sans traitement des cellules au LPS.....	55
<b>Figure 20</b> : Schéma représentant les différentes conditions de l'expérience ainsi que les résultats attendus.....	56
<b>Figure 21</b> : Effet de l'oxPAPC et de la stimulation au LPS sur la quantité de dimères de TLR4 présents sur les membranes des cellules..	57
<b>Figure 22</b> : Effet de l'oxPAPC et de la stimulation au LPS sur la quantité de dimères de TLR4 présents sur les membranes des cellules après normalisation des quantités.....	57
<b>Figure 23</b> : Histogramme représentant la réponse NF-kB dans les cellules THP1..	59
<b>Figure 24</b> : Effet de la stimulation au nickel et de la stimulation au LPS sur la quantité de dimères de TLR4 présents sur les membranes des cellules. ....	60
<b>Figure 25</b> : Schéma représentant l'intérêt d'utiliser un anticorps biotinylé pour s'affranchir des biais.....	62
<b>Figure 26</b> : Schéma représentant les différentes conditions de l'expérience FRET..	63
<b>Figure 27</b> : Graphiques de fluorescence mesurée par cytométrie de flux.....	64
<b>Figure 28</b> : Exemple de co-immunoprécipitation suite à différents traitements sur le TLR4.....	66
<b>Figure 29</b> : Schéma représentant les fixations possibles des anticorps et la répercussion sur la détection de FRET ou non.....	68



## INTRODUCTION

Les Toll-like receptors (TLR) sont des protéines transmembranaires situées à la surface de différentes cellules notamment celles impliquées dans l'immunité innée. Ils ont un rôle de sentinelle puisqu'ils peuvent reconnaître et se lier à de nombreux composants biologiques produits par des microorganismes (bactéries, virus, champignons, parasites) pathogènes ou non, connus sous le nom de PAMPs pour pathogen-associated molecular patterns. Ces biomolécules sont essentielles à la survie du microorganisme et présentent des domaines très conservés. Ce sont des protéines, lipoprotéines, des lipides, des acides nucléiques qui sont des composants des bactéries, virus, champignons ou de parasites. L'association entre le PAMP et le TLR entraîne ensuite une modification de la conformation du récepteur et enclenche une cascade de signalisation pour aboutir à la production de cytokines inflammatoires et/ou d'interféron de type I (Kawai, Akira 2010). Chez les humains, on compte dix TLRs différents. Ce sont des récepteurs transmembranaire de type I possédant un domaine extracellulaire constitué de nombreux motifs LRR (leucine-rich- repeat) différents, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique appelé TIR pour Toll-Interleukine-1-Receptor. L'homo ou hétérodimérisation du domaine TIR est indispensable pour la suite de la signalisation (Akira et al. 2006). Au sein des TLRs, il existe des hétérodimères comme le récepteur TLR2/TLR1 ou TLR2/TLR6, ou des homodimères comme le TLR4. Certains existent principalement sous forme monomérique à l'état inactif et se dimérisent en présence de ligand. Mais certains existent sous forme dimérisée inactive et on les appelle alors des dimères préformés inactifs (Gay et al. 2014).

Bien que les TLRs soient indispensables pour la défense de l'organisme contre les pathogènes, ils contribuent également, lorsqu'ils sont activés de manière chronique, aux pathologies associées, au diabète sucré de type 2, aux maladies cardiovasculaires, à l'athérosclérose et à la stéatose hépatique. En effet, plusieurs études ont montré que la circulation d'un haut taux d'acides gras dans le sang pourrait activer la réponse de certains récepteurs de l'immunité et ainsi stimuler la production de protéines de l'inflammation (Könner, Brüning 2011). De plus, les TLRs sont des protéines insérées dans la membrane plasmique des cellules qui est composée de protéines et de lipides. La composition de la membrane plasmique est complexe et peut être modifiée. En effet, les lipides qui la constituent peuvent être

saturés, avoir des chaînes carbonées de longueurs différentes, ou appartenir à différents groupes et donc posséder des propriétés biophysiques différentes. De nombreuses études ont étudié l'influence de la composition lipidique de la membrane sur le fonctionnement des protéines associées à la membrane (Volmer, et al. 2013; Coskun et al. 2011). Ainsi, les mécanismes par lesquels les lipides moduleraient l'activité des TLRs sont actuellement très étudiés. Nous avons émis l'hypothèse que des variations de la composition lipidique de la membrane plasmique pourraient moduler la dimérisation du TLR4 et donc la signalisation du récepteur TLR4.

Afin de tester cette hypothèse il est nécessaire de développer des méthodes d'analyse nous permettant d'étudier la dimérisation du TLR4.

# **PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I. Les TLRs et leur ligands**

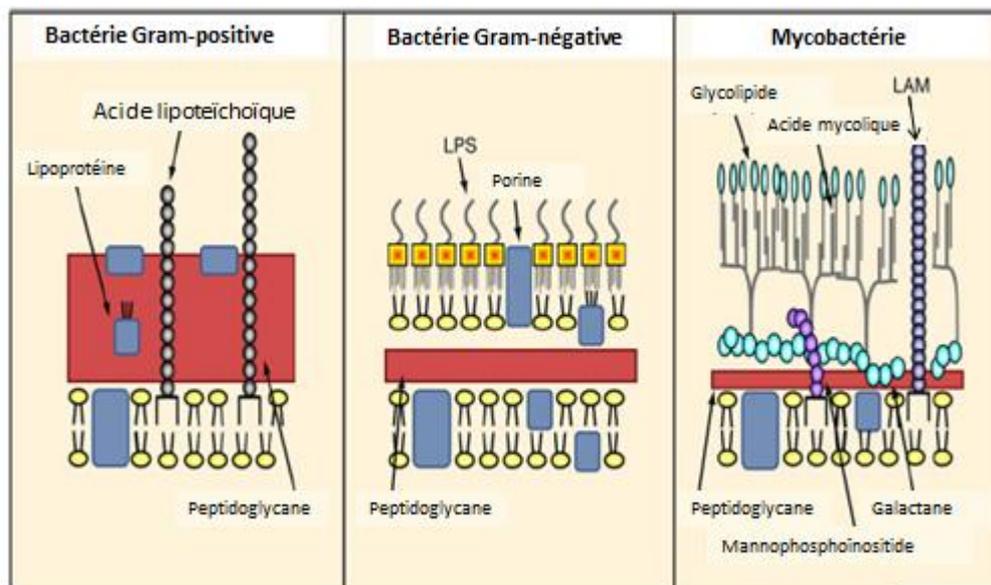
Le système immunitaire des mammifères est divisé en deux catégories : l'immunité innée et l'immunité acquise. L'immunité innée est la première ligne de défense de l'organisme face à un pathogène et est gérée principalement par les macrophages et les cellules dendritiques. L'immunité acquise intervient dans un second temps et permet la génération entre autre des cellules mémoires. Pour pouvoir défendre l'organisme, les cellules de l'immunité innée possèdent des récepteurs transmembranaires appelés les Toll-like receptors (TLRs) ayant la capacité de reconnaître des molécules des microorganismes pathogènes ou non, appelés PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) grâce à un nombre limité de PRR (pattern-recognition receptors). Les TLRs sont donc également capables de reconnaître les bactéries constituant la flore bactérienne résidente du tube digestif de l'hôte. Cependant, il est rare que ces bactéries activent les TLRs car celles-ci sont majoritairement présentes dans la lumière du tube digestif, au-dessus de la couche de mucus recouvrant l'intestin et n'entrent donc normalement pas en contact avec les récepteurs TLR. En revanche, les bactéries pathogènes sont majoritairement capables d'adhérer aux cellules épithéliales, voire d'envahir la muqueuse et les tissus sous muqueux et seront donc en contact avec les cellules exprimant les TLRs et pourront provoquer une réponse inflammatoire innée. Par ailleurs, les TLRs ne reconnaissent pas uniquement des molécules situées à la surface des microorganismes. Il a été en effet montré que les TLRs pouvaient être activés par des molécules provenant de l'hôte. En effet, lorsqu'un tissu est endommagé, des molécules sont synthétisées par les cellules du tissu ou subissent des modifications de leur structure qui leur confèrent de nouvelles propriétés. Ces molécules peuvent alors se lier aux TLRs, les activer et stimuler une réponse immunitaire. Ces molécules sont dites endogènes car elles proviennent de l'hôte et non de l'environnement extérieur et sont également appelées DAMPs pour damage (ou danger) associated molecular patterns. Enfin, les TLRs peuvent également reconnaître certains allergènes (acariens, certains métaux, protéines de champignon) (Bryant et al. 2015).

Le génome humain code pour dix TLRs différents. On distingue deux types de TLR : ceux présents à la surface des cellules, sur la membrane plasmique (TLR 1, 2, 4, 5, 6 et 10) et ceux présents à l'intérieur de la cellule (TLR 3, 7, 8 et 9) sur la membrane de vésicules comme les lysosomes, endosomes, endolysosomes et sur la membrane du réticulum endoplasmique. Ceux présents à la surface des cellules reconnaissent la plupart des composants de la membrane microbienne comme les lipides, les lipoprotéines et les protéines ; et ceux présents à l'intérieur reconnaissent des acides nucléiques (Akira, et al. 2006).

Nous allons maintenant décrire les différents ligands que les TLRs peuvent reconnaître.

## A. Les PAMPs

Le récepteur TLR2 reconnaît des PAMPs provenant de bactéries, virus, parasites et champignons. Il reconnaît notamment les composants des bactéries Gram-positives comme l'acide lipoteichoïque (LTA), ou le peptidoglycane (PG) et des lipoprotéines qui sont également présentes chez les bactéries Gram-négative (Figure 1).



**Figure 1 : Schéma représentant les parois des différentes bactéries (d'après Akira et al. 2006).** Les bactéries Gram-positives ont une couche épaisse de peptidoglycanes. L'acide lipoteichoïque et les lipoprotéines sont incrustées dans la paroi. La paroi des bactéries Gram-négatives est caractérisée par la présence de LPS. Les mycobactéries ont une couche épaisse hydrophobe constituée d'arabinogalactane mycolyl et de dimycolate. Elles possèdent également une bicouche lipidique et une couche constituée de peptidoglycanes associée avec en majorité le glycolipide lipoarabinomannan (LAM). Les lipoprotéines sont présentes dans les parois de toutes les bactéries.

Il reconnaît également le lipoarabinomannan des mycobactéries, le zymosan des champignons, la protéine d'enveloppe du virus de la rougeole, etc. Le récepteur TLR2 forme un hétérodimère avec TLR1 ou TLR6. L'hétérodimère TLR2-TLR1 reconnaît les lipopeptides tri-acylés provenant des bactéries Gram-négatives et des mycoplasmes tandis que l'hétérodimère TLR2-TLR6 reconnaît les lipopeptides diacylés des bactéries Gram-positives et des mycoplasmes. Il est exprimé majoritairement dans les monocytes et les cellules dendritiques. Nous verrons par la suite par quel mécanisme les hétérodimères font la discrimination entre les différentes structures des lipoprotéines (Kawai, Akira 2010).

Le TLR4 reconnaît le lipide A, un constituant du lipopolysaccharide (LPS) situé à la surface des bactéries Gram-négatives, le glucoroxylomannan situé à la surface d'un champignon (*Cryptococcus neoformans*), la protéine de fusion du virus syncytial respiratoire ou encore le glycoinositolphospholipide situé à la surface des trypanosomes (parasites). Le LPS se lie à la protéine de liaison du LPS (LBP) qui circule librement dans le sang. La LBP se lie ensuite au CD14 exprimé à la surface cellulaire. Le complexe LPS-LBP est ensuite transféré par le CD14 au facteur myéloïde de différenciation 2 (MD2) qui est lié à une portion extracellulaire du récepteur TLR4 (Akira, et al. 2006). Le TLR4 est exprimé dans les macrophages, les cellules myocardiques ou encore dans les cellules dendritiques. Les mécanismes permettant la formation du complexe MD2-TLR4-LPS seront expliqués ultérieurement.

Le TLR5 quand à lui reconnaît la flagelline située à la surface des bactéries flagellées. Ce TLR est exprimé en grande majorité dans les cellules dendritiques immatures CD11c<sup>+</sup> et CD11b<sup>+</sup> de la *lamina propria* de l'intestin grêle mais également dans les cellules épithéliales, les monocytes ainsi que dans les cellules pulmonaires. L'analyse cristallographique de la structure de la flagelline d'une salmonelle a révélé la présence d'une chaîne hélice- $\alpha$  non variable appelée D1 qui est reconnue par le récepteur TLR5. La fixation de la flagelline sur le récepteur entraîne la différenciation des cellules T helper productrices d'interleukine 17, des cellules T helper de type 1 et des cellules B naïves en cellules productrices d'immunoglobulines de type A (Uematsu et al. 2008)

Le récepteur TLR3 est activé par l'ARN double brin. Celui-ci peut être produit lors d'une infection virale comme produit de la transcription des virus à ADN ou ARN, comme intermédiaire lors de la réplication des virus à ARN simple brin (West Nile

virus ou le virus syncytial respiratoire), ainsi que lors de la production de certains ARN interférents. Le récepteur TLR3 est exprimé dans les cellules dendritiques ainsi que dans les cellules épithéliales du tissu pulmonaire, utérin, cornéen, vaginal, biliaire, ou encore intestinal (Akira, et al. 2006; Kawai, Akira 2010).

L'ADN bactérien et viral sont également des immunostimulants et sont reconnus par le récepteur TLR9. Le récepteur reconnaît un dinucléotide non-méthylé 2'-deoxyribo (cytidine-phosphate-guanosine) appelé CpG, un motif fréquemment présent dans le génome bactérien ou viral mais rare dans le génome des mammifères. Sa liaison avec le TLR9 induit une production de cytokines inflammatoires, une réponse immunitaire Th1 et active les cellules dendritiques, les macrophages ainsi que les cellules B du système immunitaire (Akira, et al. 2006). L'ADN bactérien doit rentrer à l'intérieur de la cellule pour pouvoir être détecté par le récepteur TLR9 puisque ce dernier est situé dans un endosome. Lorsqu'il passe la membrane plasmique l'ADN bactérien double brin est dégradé en plusieurs morceaux d'ADN simple brin contenant des régions avec le motif CpG qui se lient au récepteur TLR9 (Latz et al. 2004).

Le TLR7 reconnaît les ARN simple brin des virus à ARN, des dérivés d'imidazoquinoline comme le resiquimod (R-848), des analogues de la guanine (acide nucléique) comme la loxoribine, des ARN polyU et certains ARN interférents (Kawai, Akira 2006; Akira, et al. 2006). Il est exprimé en grande quantité dans les cellules dendritiques plasmocytoïdes qui produisent lors d'une infection virale une forte quantité d'interféron de type 1. La production de cytokines par ces cellules suite à la présence d'ARN viral est dépendante de TLR7. Ce récepteur est également capable de détecter les ARN simples brins des bactéries comme ceux des streptocoques du groupe B et induire la production d'interféron de type 1 (Mancuso et al. 2009). La reconnaissance des ARN par les cellules dendritiques plasmocytoïdes s'effectue indépendamment du cycle de réplication du virus. En effet, ce dernier est internalisé dans la cellule, est recruté dans un endolysosome dans lequel se situe le récepteur TLR7 et se lie avec le récepteur ce qui enclenche la cascade de signalisation. Enfin, le TLR8 est génétiquement très similaire au récepteur TLR7, il reconnaît d'ailleurs l'ARN simple brin des virus à ARN ainsi que le R-848. Il est exprimé dans de nombreux tissus et principalement dans les monocytes (Kawai, Akira 2010).

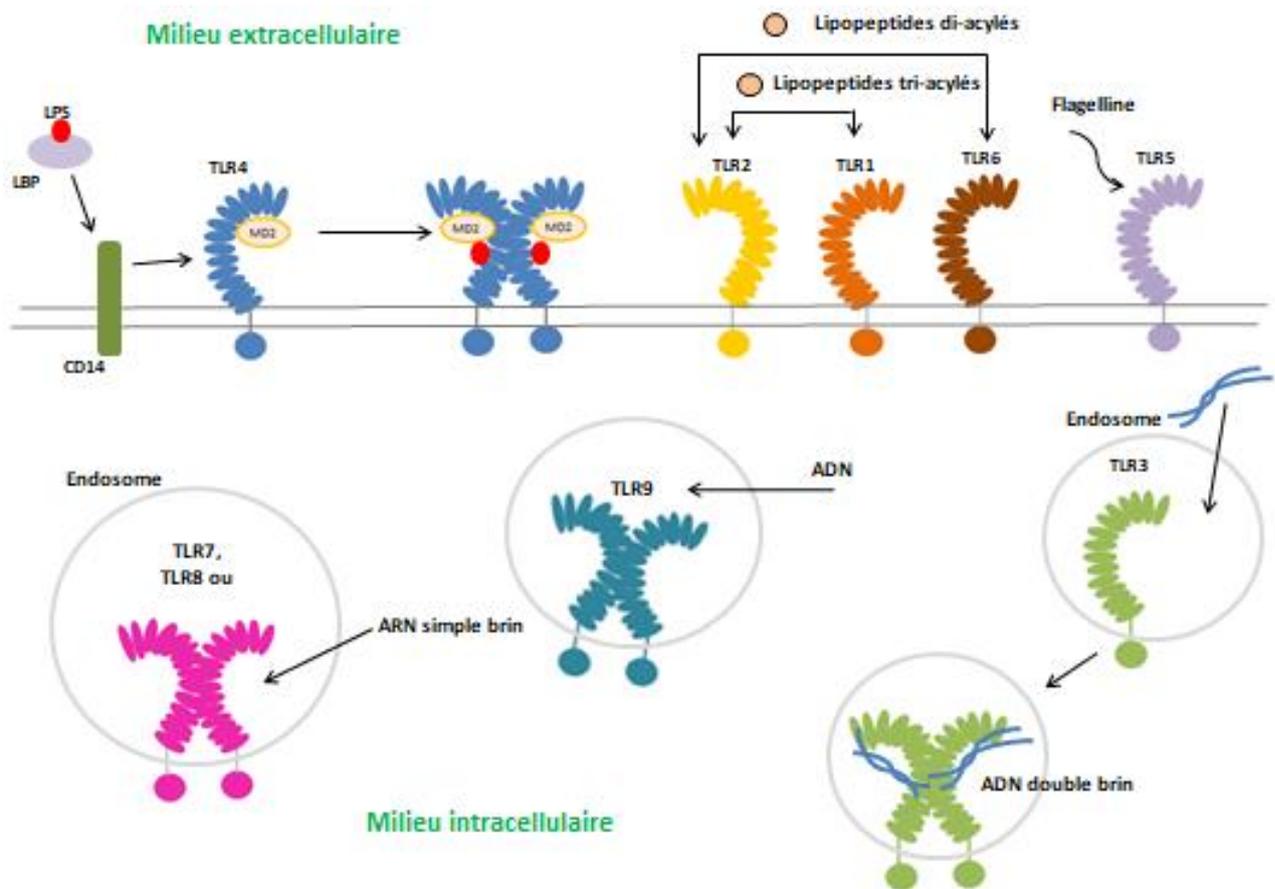


Figure 2 : Schéma représentant les PAMPs et leurs TLRs (d'après Gay et al. 2014).

## B. Les DAMPs

En plus des PAMPs décrits ci-dessus, il existe également des molécules endogènes qui peuvent activer les TLRs. Ces molécules sont des protéines, des peptides, des polysaccharides, des protéoglycanes ou encore des acides nucléiques, des phospholipides, des lipoprotéines et des petites molécules organiques comme l'acide urique. Certaines de ces molécules sont naturellement présentes au sein de l'organisme mais ne rencontrent pas, dans des conditions physiologiques, les TLRs car elles se situent dans des compartiments cellulaires différents des récepteurs. D'autres peuvent être synthétisées dans la matrice extracellulaire (MEC). La MEC est constituée de fibres de collagènes et d'un ensemble de grosses molécules (glycoprotéines, protéines, glycosaminoglycane) présentes dans le tissu mais situées en dehors des cellules qui les sécrètent (fibroblastes, ostéoblastes, chondrocytes, etc.). La MEC facilite les liaisons entre les cellules et les organise en tissu. On

retrouve également au sein de la MEC des cellules de l'immunité comme les macrophages.

Lorsque le tissu est endommagé ces molécules endogènes peuvent être relâchées de manière passive par des cellules mortes, être activement sécrétées ou synthétisées par des cellules activées par des facteurs inflammatoires (les cytokines par exemple)(Bryant et al. 2015).

La fibronectine et la ténascine-C font partie des glycoprotéines constituant la MEC et sont retrouvées en plus grande quantité dans les tissus endommagés par l'inflammation que dans les tissus sains. Lors d'inflammation les cellules expriment à leur surface des molécules indiquant qu'elles sont endommagées. De nombreuses cellules et de nombreux mécanismes vont intervenir pour détruire les cellules endommagées ainsi que la matrice les entourant. L'étape suivante est de reconstituer la matrice extracellulaire en produisant en grande quantité les produits la constituant dont la fibronectine et la ténascine-C. Il a été montré que ces molécules peuvent activer le TLR4 et ainsi stimuler la synthèse de cytokines, chemokines et de protéases (Gondokaryono et al. 2007; Patel et al. 2011). Prenons l'exemple de la fibronectine, une protéine multimodulaire, présente dans le sang et la matrice extracellulaire de tous les tissus. Lorsqu'un tissu est endommagé, la protéine est clivée en fibronectine de type III possédant soit un extra-domaine A (EDA) soit un extra-domaine B (EDB). La fibronectine EDA a été retrouvée en grande quantité dans les tissus endommagés et c'est elle qui serait capable de se lier au récepteur TLR4. En effet, lorsque des mastocytes (cellules exprimant le TLR4) sont stimulées avec de la fibronectine EDA la concentration en cytokines inflammatoires est augmentée (Gondokaryono et al. 2007). De plus, une étude a montré que la stimulation de TLR4 par la fibronectine serait dépendante du co-récepteur MD2 nécessaire pour la liaison du TLR4 avec le LPS, suggérant un mécanisme d'activation similaire à celui du TLR4 (Okamura et al. 2001). Les mécanismes responsables de l'activation du TLR4 par la fibronectine EDA sont encore discutés, la partie EDA de la fibronectine semblerait se lier au récepteur mais il y a peut-être un autre mécanisme qui intervient dans l'activation de ce dernier.

Le biglycane et la décorine sont deux protéoglycanes synthétisés dans la matrice extracellulaire. Leur structure leur permet de se lier avec une forte affinité aux récepteurs TLR2 et TLR4. Une étude a montré que la production du biglycane était augmentée lors de souffrance des tissus rénaux et qu'il induit une augmentation

de la production des cytokines et des chemokines en se liant à TLR4 et TLR2 (Moreth et al. 2014).

Ces molécules interviennent également lors de réaction inflammatoire initiée par un microorganisme pathogène. En effet, lors d'une infection par un microorganisme pathogène, ce dernier est reconnu par l'un des TLRs présenté précédemment ce qui entraîne la synthèse des facteurs inflammatoires et des dommages tissulaires. La concentration des glycoprotéines et protéoglycanes de la matrice extracellulaire va alors augmenter et les molécules vont se lier aux récepteurs TLR4 et TLR2 ce qui va stimuler la production des cytokines inflammatoires et autres facteurs de l'inflammation. Ainsi, ces molécules endogènes potentialiseraient la réponse inflammatoire déclenchée dans un premier temps par un microorganisme pathogène (Moreth et al. 2014).

Les phospholipides oxydés sont issus de phospholipides ayant subi une oxydation. Lors d'inflammations les macrophages stimulés oxydent entre autre les phospholipides grâce à plusieurs enzymes oxydatives. Nous verrons par la suite que ces phospholipides oxydés possèdent des propriétés pro- et anti-inflammatoires.

Parmi les ligands endogènes, il y a aussi des acides nucléiques qui sont eux repérés par les TLRs intracellulaires. La plupart du temps les acides nucléiques relâchés dans le milieu extracellulaire lors de la mort d'une cellule sont dégradés par des nucléases. Ils ne sont donc pas en contact avec les récepteurs et ne peuvent pas les activer. Cependant, une fois dans le milieu extracellulaire ils peuvent parfois se lier à des protéines comme la protéine de liaison cathelicidine LL-37 ou former un immun complexe lors d'un lupus, une maladie auto-immune. Les complexes formés peuvent alors être endocytés par la cellule, présentés aux TLRs et ainsi stimuler une réponse inflammatoire (Ganguly et al. 2009; Lande et al. 2007).

### **C. Les allergènes**

Les réponses allergiques sont induites par de nombreuses molécules comme les pollens, le venin de certains insectes, certains produits pharmaceutiques ou chimiques, les acariens, des métaux, etc. Les mécanismes impliqués dans la reconnaissance des protéines allergènes par l'hôte sont peu connus. Des scientifiques se sont demandés si les TLRs étaient impliqués dans la reconnaissance d'allergènes. La Der p2 est une protéine de liaison lipidique produite par les acariens

qui provoque une réaction allergique au niveau des voies respiratoires. Sa structure est très similaire à celle du co-récepteur MD2. Une étude a montré que cette protéine associée au LPS peut se lier au TLR4 et activer ce dernier en l'absence de MD2 dans les macrophages (Trompette et al. 2009). Ils ont également observé dans cette étude que la signalisation du récepteur TLR4 était très augmentée en présence du couple LPS-Der p2.

Certains métaux sont responsables de réactions allergiques de contact comme le nickel et le cobalt. Il a été observé que le cobalt et le nickel activaient plusieurs cascades de la signalisation inflammatoire (la signalisation NF- $\kappa$ B/IKK2 par exemple) induisant la synthèse et le relargage de cytokines inflammatoires (Minang et al. 2006). L'équipe de Schmidt a montré que le TLR4 jouait un rôle crucial dans le développement de l'allergie de contact au nickel (Schmidt et al. 2010). Le nickel possède une structure similaire au LPS et il a été montré que ce dernier se lie au TLR4 et induit sa dimérisation (Raghavan et al. 2012).

Le TLR4 est également capable de reconnaître les protéases des champignons connus pour leur propriété allergène. Elles activent le récepteur indirectement en clivant le fibrinogène (ligand endogène du TLR4). Les produits du clivage vont stimuler le TLR4 au sein des macrophages et des cellules épithéliales des voies respiratoires et orienter la réponse immunitaire vers une réponse Th2. Cette réponse est en partie responsable du développement des maladies respiratoires allergiques comme l'asthme (Millien et al. 2013).

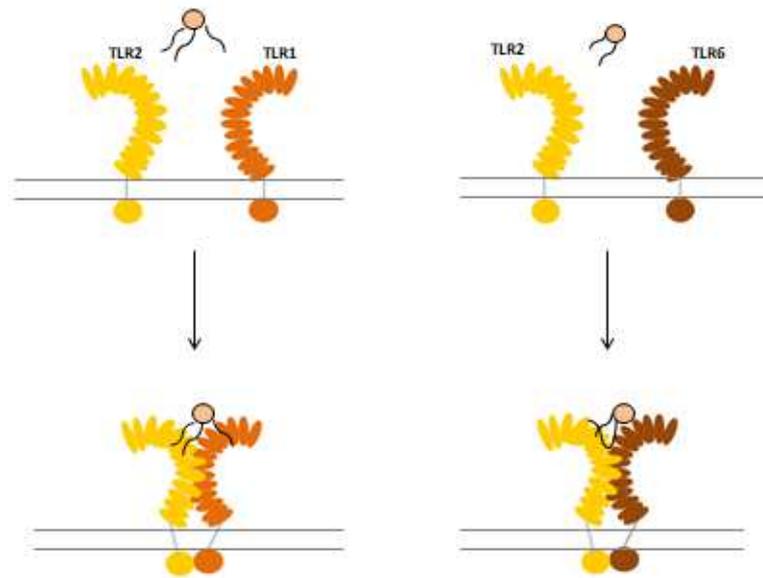
Nous avons vu que les TLRs répondaient à de nombreux stimuli dont les lipides, nous allons maintenant nous intéresser aux mécanismes régulant la dimérisation des récepteurs.

## II. La dimérisation des TLRs

La reconnaissance d'un PAMP par un TLR entraîne la dimérisation de ce dernier. Il peut former un hétérodimère ou un homodimère. La liaison entre un ligand et la partie LRR (leucine-rich-repeat) de l'ectodomaine du récepteur le reconnaissant crée ce que l'on appelle une interface de dimérisation. Elle permet de rapprocher les parties juxtamembranaires situées sur la partie C-terminal des ectodomains des deux récepteurs et autorise ainsi la dimérisation des domaines TIR dans le cytosol (Bryant et al. 2015).

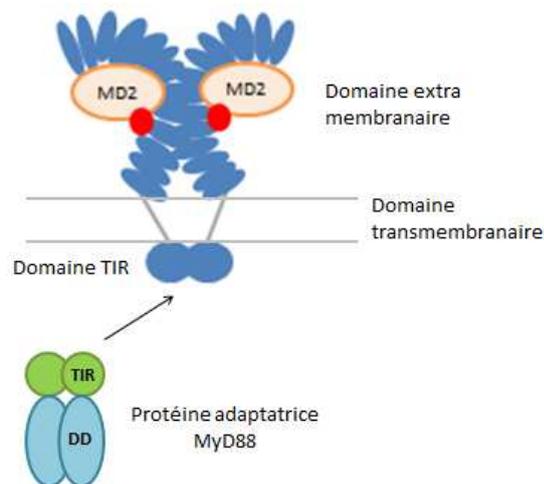
Le récepteur TLR2 forme un hétérodimère avec TLR1 ou TLR6. L'hétérodimère TLR2/TLR1 reconnaît des lipopeptides tri-acylés et l'hétérodimère TLR2/TLR6 reconnaît des lipopeptides diacylés. Deux des trois chaînes des lipopeptides tri-acylés sont reconnues par une séquence LRR du récepteur TLR2 et la troisième est reconnue par le TLR1 ce qui permet à ce moment de créer l'interface de dimérisation du dimère TLR2/TLR1 et non celle du TLR2/TLR6. La liaison des deux récepteurs aux ligands rapproche leur domaine TIR et permet par la suite d'enclencher la cascade de signalisation (Figure 3)(Gay et al. 2014).

Le récepteur TLR4 a besoin pour reconnaître le LPS du co-récepteur MD2. MD2 se lie au niveau des terminaisons amines de l'ectodomaine du TLR4. La portion hydrophobique de MD2 va permettre au complexe MD2-LPS de se lier à TLR4. Cinq des six chaînes du LPS interagissent avec la poche hydrophobique formée par MD2 tandis que la sixième forme une interaction hydrophobe avec les phénylalanines du TLR4. Les groupes phosphates du LPS forment des interactions ioniques avec les résidus positivement chargés du TLR4 et de MD2. Cette liaison modifie dans un premier temps la conformation de MD2 et va former au niveau de la portion hydrophobique une première interface de dimérisation.



**Figure 3 : Schéma représentant la formation des hétérodimères TLR2/TLR1 et TLR2/TLR6. (d'après Gao, Li 2017).**

Puis, les faces latérales des ectodomains vont se rapprocher et favoriser une interaction protéine-protéine au niveau des terminaisons carboxyles et ainsi créer la seconde interface de dimérisation. Ce rapprochement, permet ensuite la dimérisation des domaines TIR dans le cytosol et par la suite le recrutement des facteurs des voies de signalisation du TLR4 (Gay et al. 2014; Akashi et al. 2003)(Figure 4).

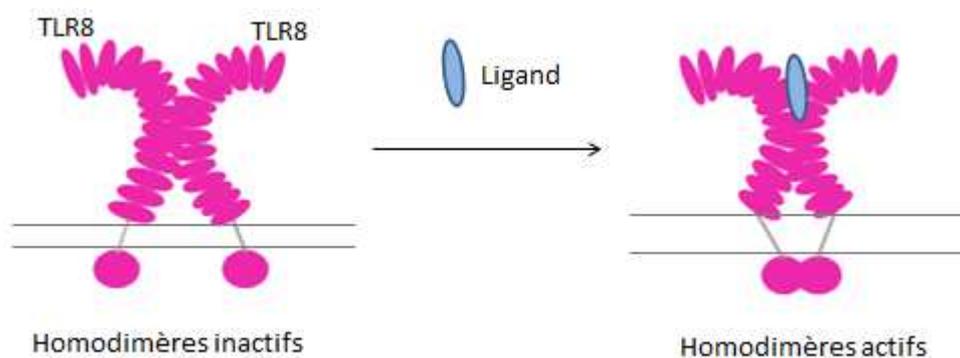


**Figure 4 : Schéma représentant un dimère de TLR4 (d'après Gay et al. 2014): la dimérisation du domaine TIR du TLR4 permet la fixation de protéines adaptatrices comme MyD88 et ainsi activer la cascade de signalisation.**

La structure du dimère de TLR4 et les molécules qui peuvent influencer sa conformation sont encore très étudiées de nos jours. Par exemple, une étude a observé que le motif constitué d'acides aminés polaires appelé SxxS situé dans le domaine transmembranaire du récepteur, permettait une meilleure stabilisation de

l'homodimère (Kargas et al. 2017). Une autre, en étudiant la conformation structurelle du TLR4 au sein d'un modèle de bicouche contenant des phospholipides a entre autre observé l'influence de la flexibilité du domaine transmembranaire du TLR4 sur la dimérisation (Patra et al. 2018).

Les TLR7, 8 et 9 existent sous une forme dimérisée stable au sein des membranes, on les appelle alors des dimères préformés inactifs. En effet, grâce à la cristallographie, il a été montré qu'en absence de son ligand, le TLR8 est déjà présent sous forme dimérisée. Lorsqu'il n'y a pas de ligand la surface de dimérisation se situe entre les séquences LRR8 à 20 et les deux ectodomaines sont reliés à cet endroit par des ponts hydrogènes et des ponts hydrophobes. Ces liaisons confèrent une certaine conformation à la protéine transmembranaire. Lors de la liaison avec le ligand les ectodomaines des deux protéines effectuent une rotation qui permet un rapprochement des parties juxtamembranaires. Ce rapprochement permet ainsi la dimérisation du domaine TIR dans le cytosol et déclenche la cascade de signalisation. Le récepteur TLR8 se trouve alors sous une forme dimérisée active (Tanji et al. 2013) (Figure 5).



**Figure 5 : Schéma représentant le changement de conformation de l'homodimère TLR8 en présence d'un ligand.**

Aucune étude n'a montré l'existence du récepteur TLR4 sous forme de dimère préformé stable à la surface de la membrane plasmique d'une cellule. Notre hypothèse est qu'il existe sous une forme dimérisée instable non active lorsqu'il n'est pas en présence de ligand. De plus, notre hypothèse est que le pourcentage de TLR4 sous une forme dimérisée instable non active pourrait dépendre de la composition lipidique de la membrane.

### **III. Les TLRs et les lipides**

#### **A. L'obésité morbide et les pathologies associées**

L'obésité est caractérisée par une augmentation du stockage des acides gras dans la masse adipeuse. Le tissu adipeux joue un rôle crucial dans la régulation des quantités d'acides gras circulant dans l'organisme. Lors d'un apport excessif en acides gras, ces derniers sont stockés sous forme de triglycérides dans le foie et le tissu adipeux. Ils sont réintégrés dans la circulation sanguine lorsque l'organisme manque d'énergie (les acides gras interviennent dans le cycle de fabrication de l'ATP qui est source d'énergie pour les cellules)(Galic, Oakhill, Steinberg 2010). Le tissu adipeux constitué de cellules appelées adipocytes, synthétise et relâche des facteurs pro-inflammatoires, comme l'interleukine-6 (IL-6) ou le facteur de nécrose tissulaire (TNF $\alpha$ ), et des facteurs anti-inflammatoires comme l'adiponectine et la leptine. Lors d'une augmentation accrue du stockage des acides gras (obésité morbide), les adipocytes augmentent de taille (hyperplasie) et ont un apport en sang diminué. Les cellules en manque d'oxygène se retrouvent en état d'hypoxie et en état de stress. Elles synthétisent alors des facteurs pro-inflammatoires (Ellulu et al. 2017). En effet, une étude a mis en évidence une forte augmentation de la concentration en TNF $\alpha$  dans les tissus adipeux de souris obèses (Galic, Oakhill, Steinberg 2010). L'équipe Illán-Gómez et al. (2012) a évalué la concentration d'IL-6 chez des patients en obésité morbide qui ont subi une chirurgie permettant de restreindre l'apport énergétique journalier en effectuant des modifications anatomiques à l'estomac (anneau gastrique par exemple). Ils ont montré que la concentration en IL-6 diminue significativement douze mois après la chirurgie et que c'est corrélé à une diminution de l'indice de masse corporel. Ainsi, on peut relier obésité morbide et concentration élevée en facteurs pro-inflammatoires. Il a également été montré que le nombre de monocytes circulants ainsi que la présence de macrophages dans le tissu adipeux sont fortement augmentés chez les souris obèses (Weisberg et al. 2003). Cet état inflammatoire localisé et ponctuel dans le temps lors d'un apport élevé en acides gras de manière occasionnel devient chronique chez les individus souffrant d'obésité morbide. Ainsi, l'obésité morbide se caractérise par un état d'inflammation chronique. Nous allons voir que cet état inflammatoire chronique engendre en partie de

nombreuses maladies comme le diabète de type 2 (résistance des tissus à l'insuline), des maladies cardiovasculaires ou encore la stéatose hépatique.

Les cellules des individus atteints du diabète de type 2 sont résistantes à l'insuline. La résistance à l'insuline est due à de nombreux facteurs de stress dont les cytokines inflammatoires, la circulation importante d'acides gras, et le stress du réticulum endoplasmique.  $\text{TNF}\alpha$  ou un fort taux d'acides gras circulants inhibe la phosphorylation d'IRS-1 rompant ainsi la transduction du signal permettant de répondre à une stimulation à l'insuline d'où une résistance des cellules à l'insuline. Les facteurs de stress cités précédemment activent également la kinase c-Jun N-terminal (JNK) ainsi que la kinase inhibitrice du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B (IKK $\beta$ ) qui vont également participer à la résistance des cellules à l'insuline. La kinase IKK $\beta$  inhibe également la phosphorylation d'IRS-1 et active la phosphorylation de NF- $\kappa$ B activant à son tour l'expression de gènes de l'inflammation qui synthétisent de nombreux médiateurs de l'inflammation dont TNF- $\alpha$  et IL-6. La kinase JNK active entre autre la protéine kinase C qui comme le facteur nucléaire NF- $\kappa$ B active l'expression de gènes codants pour des facteurs inflammatoires. On entre alors dans un cercle vicieux aboutissant à une résistance des cellules à l'insuline et donc au diabète de type 2 (Könner, Brüning 2011).

L'athérosclérose se définit comme une perte d'élasticité et une dégénérescence des artères provoquée par l'accumulation de lipides, de débris et de cellules immunitaires formant ce que l'on appelle un athérome sur la paroi des artères (Hansson 2005). Les facteurs favorisant l'apparition de la maladie sont nombreux comme un régime alimentaire riche en acides gras, l'hypertension, fumer, ou encore un état inflammatoire chronique. Lors d'un important apport en lipides, les taux plasmatiques de cholestérol et de triglycérides sont augmentés. Le cholestérol est transporté aux cellules de l'organisme par des lipoprotéines appelées LDL. Lors d'hypercholestérolémie, les LDL s'accumulent au sein des vaisseaux sanguins, traversent la couche primaire de la paroi des vaisseaux constituée de cellules endothéliales et restent piégés dans la couche située en dessous de ces cellules appelée intima. L'infiltration et la rétention des LDL au sein de l'intima engendre une réponse inflammatoire au niveau des cellules endothéliales. Les LDL piégées subissent des réactions oxydatives par différentes substances comme les réactifs azotés (molécules de peroxide), les réactifs oxygénés (molécules de dioxygène), la myéloperoxydase (enzyme d'oxydation produite par les macrophages), etc. De

nombreux produits sont issus de ces réactions dont les LDL oxydés. Ces derniers, induisent la production et la libération de cytokines inflammatoires comme l'interleukine-1 $\beta$  ou le TNF- $\alpha$  par les macrophages et les lymphocytes T présents dans la paroi des vaisseaux. Ils stimulent également l'accumulation des lipides au sein des macrophages pour former ce que l'on appelle des cellules spumeuses qui sont retrouvées dans les plaques athéroscléreuses. Les cytokines inflammatoires activent l'expression de molécules à la surface des cellules endothéliales. Ces molécules permettent l'adhésion des monocytes circulants dans le sang, qui ensuite traversent la paroi des vaisseaux et se différencient en macrophages. Ainsi, on observe au sein du tissu vasculaire une accumulation de cellules inflammatoires, de lipides, de débris tissulaires qui forment des plaques athéroscléreuses à la surface des endothéliums et peuvent aller jusqu'à obstruer le vaisseau. Chez les individus en obésité morbide ce mécanisme est amplifié puisque les adipocytes stimulés suite à l'accumulation d'acides gras synthétisent une grande quantité de cytokines inflammatoires (IL-6 et TNF $\alpha$ ). Ces cytokines vont alors s'accumuler entre autre dans les vaisseaux sanguins et ainsi activer les cellules endothéliales (Hansson 2005).

Ainsi, comme les voies inflammatoires sont impliquées dans l'apparition de certaines maladies, de nombreuses études se sont intéressées au lien entre un régime riche en acide gras et son influence sur la signalisation inflammatoire produite par les TLRs.

## **B. Les effets pro- et anti-inflammatoire des acides gras.**

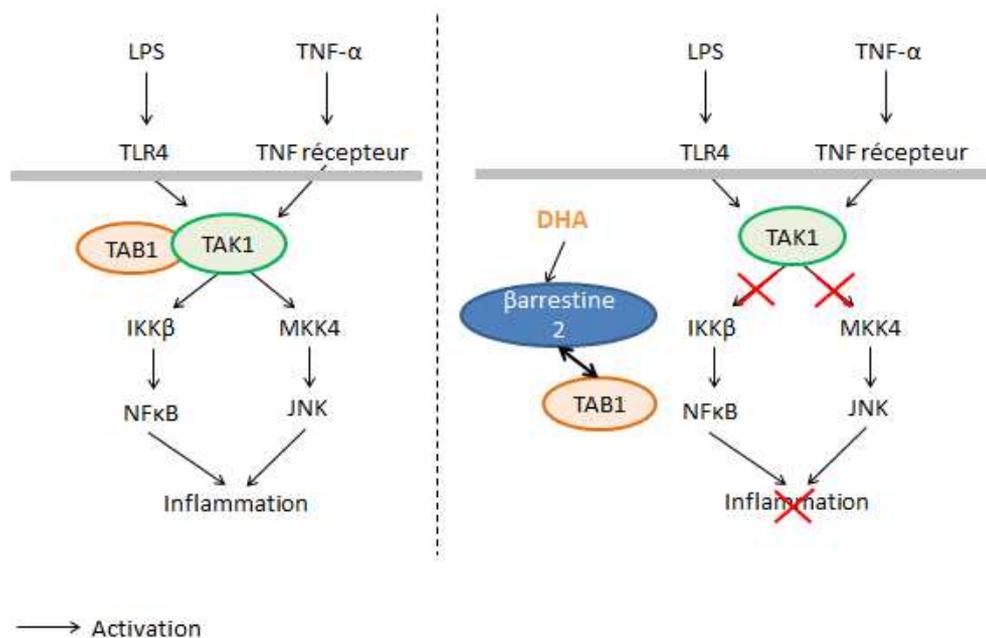
Les acides gras sont les principaux constituants des membranes des cellules et sont synthétisés principalement par le foie (acides gras endogènes). Ils peuvent également être apportés via l'alimentation (acides gras exogènes). Nous venons de voir qu'une augmentation d'acides gras circulants dans le sang est l'un des facteurs responsable de l'apparition de certaines maladies en activant de manière chronique les voies de signalisation inflammatoire. Ces acides gras peuvent être saturés, insaturés ou encore oxydés et nous allons voir que selon leur composition leur effet sur la signalisation des TLRs peut être différent.

Le palmitate ou acide palmitique est l'un des acides gras saturé le plus présent dans le sang chez les humains et plusieurs études ont montré que ce dernier induisait une réponse inflammatoire au sein des différentes cellules de l'organisme. Il

induit par exemple, une augmentation importante de la concentration d'IL-6 dans les cellules endothéliales des artères coronaires, et une augmentation moins importante dans les cellules musculaires des muscles lisses (Staiger et al. 2004). Une étude sur des cellules 293T (cellules rénales embryonnaires humaines) transfectées avec le TLR4-MD2 a montré que l'acide palmitique entraîne une forte augmentation de l'expression de NF $\kappa$ B et de IL-6 (produits de la signalisation des TLRs) tandis qu'un effet beaucoup moins important est observé avec l'acide oléique (acide gras insaturé)(Shi et al. 2006). Une autre étude similaire, a montré, dans des macrophages de souris, qu'une stimulation avec de l'acide laurique ou avec de l'acide palmitique entraînait l'activation de NF- $\kappa$ B et l'induction de l'expression de COX-2 et d'IL-1 (Lee et al. 2001).

Les acides gras insaturés peuvent inhiber la signalisation des TLRs. Des études ont montré que l'acide docosahexanoïque (DHA) active dans le cytosol des macrophages la  $\beta$ -arrestin2 qui séquestre la protéine TAK1. Lors de la cascade de signalisation, cette protéine se lie normalement avec la protéine TAB1 et permet entre autre la phosphorylation de la NF- $\kappa$ B kinase qui permet d'activer le facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Ce facteur va ensuite activer la transcription des gènes codants pour des cytokines inflammatoires. En présence de DHA, la TAK1 est séquestrée et ne peut pas se lier à la protéine TAB1. Le NF- $\kappa$ B n'est alors pas activé et les cytokines inflammatoires ne sont pas synthétisées. Il en est de même pour la voie de signalisation impliquant le facteur JNK qui permet aussi d'activer la transcription de gènes codants pour des cytokines inflammatoires (Figure 6). Ainsi, le DHA a un effet anti-inflammatoire (Oh et al. 2010).

Les chaînes des phospholipides polyinsaturés sont susceptibles de s'oxyder. Lors d'inflammation, les macrophages produisent des éléments oxydés grâce à plusieurs enzymes comme la NADH oxygénase, la myeloperoxydase, la lipooxygénase et d'autres enzymes générant des réactifs oxydés. L'oxPAPC pour 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine oxydé est l'un de ces produits et est retrouvé au niveau des sites d'inflammation ou encore dans des cellules stimulées par les cytokines inflammatoires interleukine1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et TNF- $\alpha$  (Erridge et al. 2008).

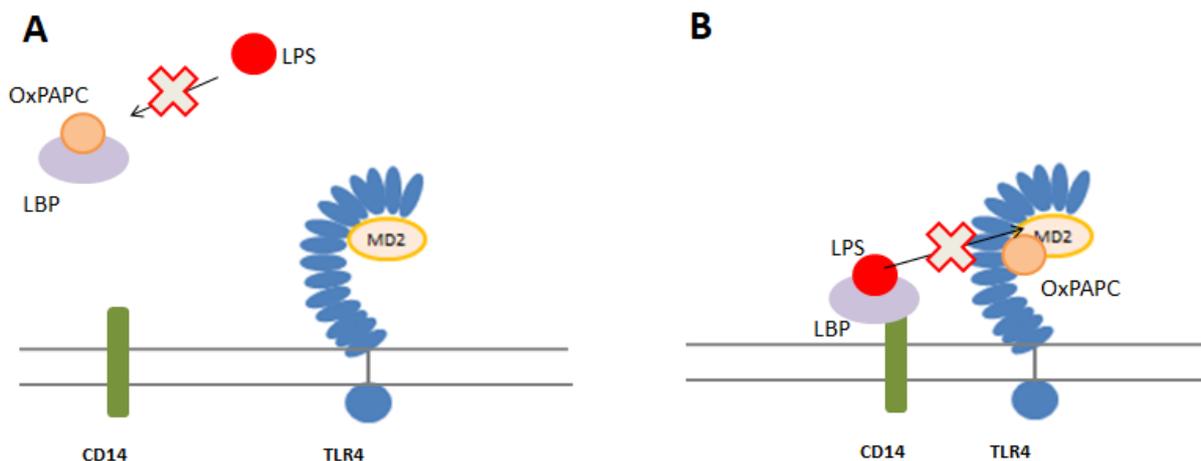


**Figure 6 : Diagramme schématisé de la cascade de signalisation inflammatoire inhibée par le DHA via l'activation de la  $\beta$ -arrestine 2 (d'après Oh et al. 2010).** A gauche, les voies inflammatoires LPS et TNF- $\alpha$  induites. A droite, effet anti-inflammatoire de l'acide docosahexanoïque (DHA)

Plusieurs études ont montré que les phospholipides oxydés avaient des propriétés pro-inflammatoires (Zanoni et al. 2017; Stewart et al. 2010). L'oxPAPC par exemple, activerait la formation d'inflammasomes au sein des cellules dendritiques. L'inflammasome est un complexe de macromolécules qui une fois activé permet la sécrétion de cytokines inflammatoires de la famille des interleukines-1, et peut parfois activer la mort cellulaire programmée appelée pyroptose. L'oxPAPC induit la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les cellules dendritiques sans provoquer leur mort. On dit alors que les cellules dendritiques sont « hyperactives » et que l'oxPAPC potentialise la réponse inflammatoire (Zanoni et al. 2017). Les LDL oxydés activeraient un complexe hétérodimérique constitué de TLR4 et de TLR6 suite à la reconnaissance de ces molécules par le CD36 donnant lieu à la production de cytokines inflammatoires (Stewart et al. 2010).

Par ailleurs, d'autres études montrent que l'oxPAPC aurait des propriétés anti-inflammatoires. Une étude a constaté que la destruction et la mort des tissus au niveau des sites de l'inflammation lors d'endotoxémie chez les souris étaient inhibées par l'oxPAPC. Il inhiberait également l'accumulation de myéloperoxydase produites par les cellules leucocytaires lors d'inflammation. Ils ont également constaté que l'oxPAPC inhibait l'activation de l'ARN messager de l'E-selectine (ARNm) par le LPS. Cet ARNm permet d'activer la production d'E-sélectine, une molécule exprimée à la

surface des cellules endothéliales lors d'inflammation (Bochkov, Kadl, et al. 2002). La synthèse d'E-sélectine est contrôlée en amont par le facteur de transcription NF- $\kappa$ B qui est activé lors d'inflammation par différents récepteurs comme le TLR4, le récepteur de l'IL-1 et le récepteur TNF- $\alpha$ . L'équipe de Bochkov, a montré que l'oxPAPC n'agissait pas au niveau de la cascade de signalisation du TLR4. En effet, ils ont constaté que l'expression de l'E-sélectine n'était pas inhibée par l'oxPAPC lorsqu'ils stimulaient le récepteur IL-1 alors qu'elle l'était lorsqu'ils stimulaient TLR4 avec le LPS (en présence d'oxPAPC). Or, TLR4 et IL-1 partage la même molécule au départ pour activer la cascade de signalisation (MyD88). Ainsi, les effets inhibiteurs de l'oxPAPC concerneraient l'activation de TLR4 par le LPS, en amont des voies de signalisation intracellulaire. Dans cette étude ils ont également montré que l'oxPAPC jouerait le rôle de compétiteur avec le LPS en se fixant sur CD14 et sur la LBP (lipid binding protein) qui sont les molécules qui amènent le LPS jusqu'au TLR4 (Bochkov, Kadl, et al. 2002). Dans une autre étude, lorsque CD14 et LBP sont mis en excès dans les cellules traitées avec l'oxPAPC et le LPS, les effets de l'oxPAPC sont toujours observés ce qui suggère qu'il existe un autre mécanisme qui peut expliquer l'action des phospholipides oxydés. L'oxPAPC pourrait se fixer sur les portions hydrophobiques des séquences LRR du TLR4 et empêcher l'interaction entre LPS et MD2 car il possède des structures similaires au LPS (Erridge et al. 2008)(Figure 7).



**Figure 7 : Schéma représentant les hypothèses supposant que l'oxPAPC agit comme un compétiteur direct du LPS.** Sur la figure A, oxPAPC empêcherait la liaison de LPS à la LBP en se fixant lui-même sur la LBP. Sur la figure B, l'oxPAPC se fixerait à MD2 inhibant la liaison MD2-LPS.

De même, ses similarités structurelles avec les acides gras di-acylés ou tri-acylés reconnus par le TLR2 lui permettraient de se fixer à ce dernier et donc d'empêcher la fixation des ligands (Erridge et al. 2008).

Ainsi, une des hypothèses avancée par les scientifiques est que les acides gras peuvent se lier aux poches hydrophobiques des séquences LRR des récepteurs TLR2 et TLR4 et ainsi agir comme un ligand pour activer ou inhiber leur dimérisation. Cependant, il a été montré que la quantité d'acides gras saturés pour activer les TLRs était  $10^6$  à  $10^9$  fois plus importante que la quantité de LPS nécessaire pour stimuler le TLR4. La théorie des ligands semble moins probable et on parle alors plutôt des lipides gras saturés comme des modulateurs de l'activation de TLR4 et TLR2 (Hwang, Kim, Lee 2016).

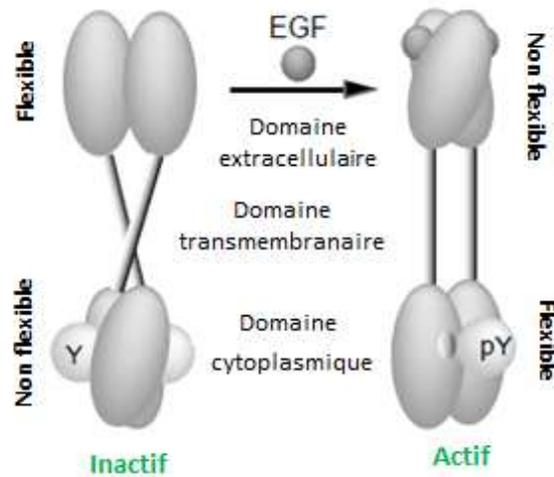
Il n'existe donc pas de consensus sur le (ou les) mécanisme conduisant à la modulation de la signalisation TLR4 par l'oxPAPC. La question est de savoir comment les acides gras peuvent induire ou inhiber la dimérisation des récepteurs TLR2 et TLR4 sans se lier directement à ces derniers.

### **C. Les lipides modulent la dimérisation des protéines transmembranaires.**

Avant de nous intéresser aux effets des lipides sur la dimérisation des TLRs, nous allons nous intéresser à un autre récepteur transmembranaire, le récepteur du facteur de croissance de l'épiderme (EGFR). En effet, de nombreux travaux ont étudié l'impact de la composition lipidique de la membrane plasmique sur la signalisation de l'EGFR. L'EGFR est un récepteur tyrosine kinase qui contrôle la croissance, la différenciation et la prolifération des cellules épithéliales. Une surexpression et/ou une hyper activation de ce récepteur est facteur de mauvais pronostic dans de nombreux cancers (Tan et al. 2016). En effet, plus de 30% des cancers du sein, 40% des glioblastomes et 60% des cancers du poumon à petites cellules surexpriment l'EGFR ou contiennent des mutations activant excessivement l'EGFR (Kovacs et al. 2015). Ce récepteur et son mécanisme d'activation a donc beaucoup été étudié pour trouver des traitements contre les cancers.

Le récepteur existe sous une forme dimérisée stable inactive à la surface des cellules. Lors de la liaison avec son ligand le facteur de croissance de l'épiderme (EGF), la région juxtamembranaire effectue une rotation qui entraîne la dissociation des domaines intracellulaires et permet l'autophosphorylation des résidus tyrosine situés sur la portion C-terminale (Figure 8). Ce changement de conformation permet

ensuite le recrutement de protéines intracellulaires qui stimulent les différentes cascades de signalisation (Moriki, et al. 2001).

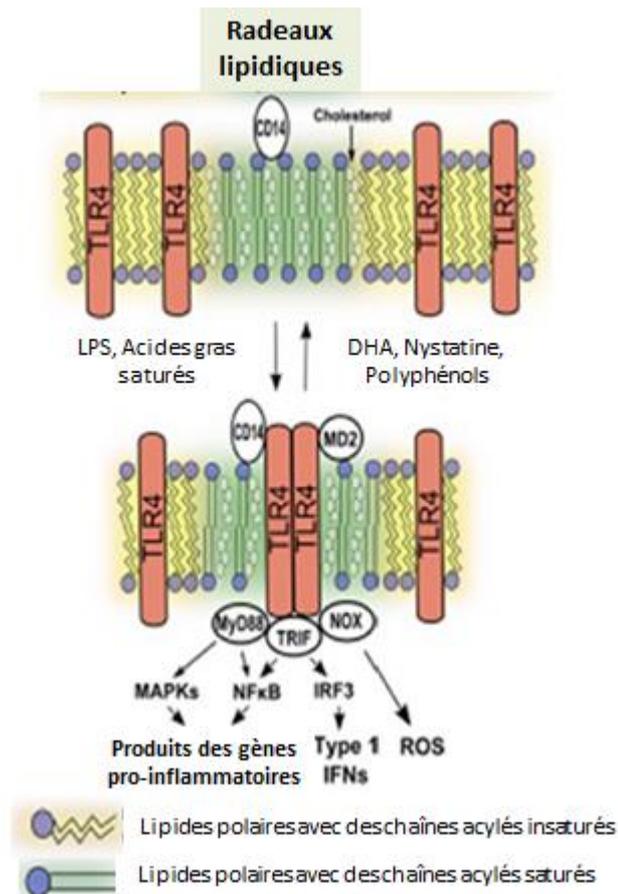


**Figure 8 : Le modèle de « rotation flexible » pour l'activation du récepteur EGF (Moriki et al. 2001).** Vues de profils des dimères EGFR.

Le récepteur peut être activé par plusieurs molécules comme l'EGF ou l'épéreguline, mais il peut également être inhibé par des anticorps monoclonaux comme le cetuximabe (Kovacs et al. 2015). Par ailleurs, le récepteur peut être activé ou inhibé par d'autres mécanismes que la liaison entre un ligand et son récepteur. Par exemple, le complexe calcium ionisé/calmoduline active l'autophosphorylation des résidus tyrosine en se fixant sur la partie juxtamembranaire du domaine intracellulaire du récepteur (Li et al. 2012). Les lipides font partie de ces molécules qui peuvent inhiber ou activer la signalisation de l'EGFR. En effet, en reconstituant un protéolysosome de composition lipidique connue et spécifique, une équipe de chercheur a mis en évidence que la présence du ganglioside GM3 inhibait fortement la transition allostérique permettant l'autophosphorylation de EGFR et son activation sans intervenir au niveau du site de liaison du ligand. De plus, une membrane lipidique pauvre en cholestérol favoriserait l'autophosphorylation et donc l'activation d'EGFR tandis qu'une membrane riche en cholestérol favoriserait l'auto-inhibition de ce dernier (Coskun et al. 2011). Les lipides comme le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate permettraient par ailleurs, une meilleure stabilisation du récepteur en interagissant avec une région du domaine transmembranaire (Maeda et al. 2018). Ainsi, la composition lipidique de la membrane semble jouer un rôle sur la dimérisation du récepteur membranaire par un mécanisme non connu. Nous allons maintenant voir qu'il existe des portions de la membrane qui ne sont pas constituées

des mêmes lipides que dans les autres portions et que cette différence joue un rôle important dans la dimérisation des protéines transmembranaires et notamment les TLRs.

Les radeaux lipidiques sont des micro-domaines de la membrane plasmique qui servent de plateforme pour les récepteurs pour recruter les molécules qui activent la cascade de signalisation. Les radeaux lipidiques sont constitués de lipides polaires avec des chaînes saturées. Les autres portions de la membrane sont constitués de lipides polaires avec des chaînes insaturées (Hwang, et al. 2016). La forme dimérisée du TLR4 a seulement été détectée dans les portions des radeaux lipidiques. L'acide laurique, un acide gras saturé, augmente la dimérisation du TLR4 dans les radeaux lipidiques tout comme le fait le LPS (Wong et al. 2009). Cependant, on ne sait pas si l'acide laurique induit la dimérisation du TLR4 en dehors des radeaux et le dimère est ensuite transloqué dans le micro-domaine lipidique de la membrane ou si l'acide laurique provoque la translocation d'un monomère TLR4 dans le radeau lipidique et ensuite la dimérisation se produit. Le fait qu'une surexpression du monomère TLR4 sans présence de ligand puisse provoquer sa dimérisation suggère la possibilité que l'acide laurique puisse concentrer les monomères de TLR4 dans les micro-domaines lipidiques de la membrane plasmique et ainsi provoquer leur dimérisation sans qu'il y ait de ligand (Hwang, et al. 2016). A l'inverse, les acides gras insaturés sont connus pour inhiber la signalisation du récepteur TLR4 (Figure 9). Il semblerait qu'en altérant la composition du radeau lipidique constitué principalement d'acides gras saturés, ils perturbent la translocation des monomères de TLR4 dans les radeaux lipidiques empêchant ainsi leur dimérisation (Fan et al. 2004; Stulnig et al. 2001). En ce qui concerne l'oxPAPC, ce dernier pourrait épuiser la membrane en cholestérol ce qui perturberait la composition des radeaux lipidiques et empêcherait la dimérisation (Walton et al. 2003).



**Figure 9 : Schéma représentant la translocation des monomères de TLR4 dans les radeaux lipidiques (Hwang et al. 2016).** La translocation de TLR4 dans les radeaux lipidiques et son homodimérisation est induite par le LPS et les acides gras saturés. Elle est inhibée par le DHA, la nystatine et les polyphénols.

D'autres hypothèses ont été explorées pour expliquer comment la modification lipidique des membranes agit sur la dimérisation des protéines transmembranaires. Le réticulum endoplasmique (RE) est un organelle de la cellule qui permet de replier les protéines adressées dans les voies de sécrétion. On a donc une balance entre la production de protéines et leur entrée dans le RE pour être repliées. Cette balance est régulée par l'expression d'un gène, activant ce que l'on appelle la réponse aux protéines dépliées (RPD). Des scientifiques ont étudié les protéines transmembranaires du réticulum endoplasmique, IRE1 et PERK qui sont sensibles à des signaux de stress comme la concentration dans la lumière du réticulum endoplasmique d'une grande quantité de protéines dépliées. Lorsque les protéines IRE1 et PERK détectent une trop grande concentration de protéines dépliées dans la lumière du réticulum endoplasmique, elles se dimérisent et déclenchent la signalisation activant la RPD. En plus de ce mécanisme d'activation dépendant des protéines dépliées, il a été montré que la perturbation de la composition de la membrane lipidique augmenterait la dimérisation des parties transmembranaires

d'IRE1 et PERK (Volmer, et al. 2013). Pour qu'il y ait dimérisation des domaines transmembranaires, il faut qu'il y ait une rupture entre la chaîne acylée phospholipidique et la chaîne aminoacide du domaine transmembranaire au niveau de l'interface de dimérisation. Or, les chaînes des acides gras saturés sont moins flexibles que celles des insaturés et interagissent donc moins fort avec le domaine transmembranaire. Ainsi, lorsque la membrane contient principalement des lipides saturés elles favorisent l'interaction entre les protéines alors que lorsqu'elle contient des lipides insaturés l'interaction lipide-protéine est favorisée. Une autre hypothèse avancée est que la saturation des chaînes, entraîne une diminution de la fluidité de la membrane et favorise une phase solide et augmente la rigidité de la bicouche membranaire. Ainsi, en favorisant la formation de dimères stables inactifs, l'augmentation de la quantité d'acides gras saturés au sein de la membrane permettrait de diminuer le seuil de détection luminal nécessaire pour l'activation de ces récepteurs pour enclencher la RPD (Volmer, et al. 2013). Ce mécanisme dépendant de l'interaction du domaine transmembranaire avec les chaînes acylés des phospholipides serait indépendant des radeaux lipidiques qui sont absents du réticulum endoplasmique.

Nous avons vu que la composition lipidique des membranes pouvait activer ou inhiber la dimérisation des protéines transmembranaires. Les lipides peuvent agir directement sur la portion transmembranaire des récepteurs, ou favoriser la translocation du récepteur dans une portion de la membrane constituée de lipides permettant la dimérisation, ou encore, dans le cas de l'EGFR par exemple, permettre une meilleure stabilisation du dimère préformé inactif. Cette stabilisation pourrait diminuer le seuil d'activation du récepteur. En effet, plus le dimère est stable au sein de la membrane plus son changement de conformation lors de sa liaison avec un ligand sera favorisé. Notre hypothèse dans cette étude est que le récepteur TLR4 existe sous une forme dimérisée instable inactive. La composition lipidique de la membrane plasmique pourrait moduler le pourcentage de TLR4 sous une forme dimérisée instable non active et par conséquent son seuil d'activation par ses ligands. Certains lipides augmenteraient ce seuil en déstabilisant le dimère, entraînant alors une moins bonne réponse inflammatoire. D'autres au contraire permettraient une diminution du seuil en stabilisant le dimère et stimulerait ainsi une réponse inflammatoire (Figure 10).

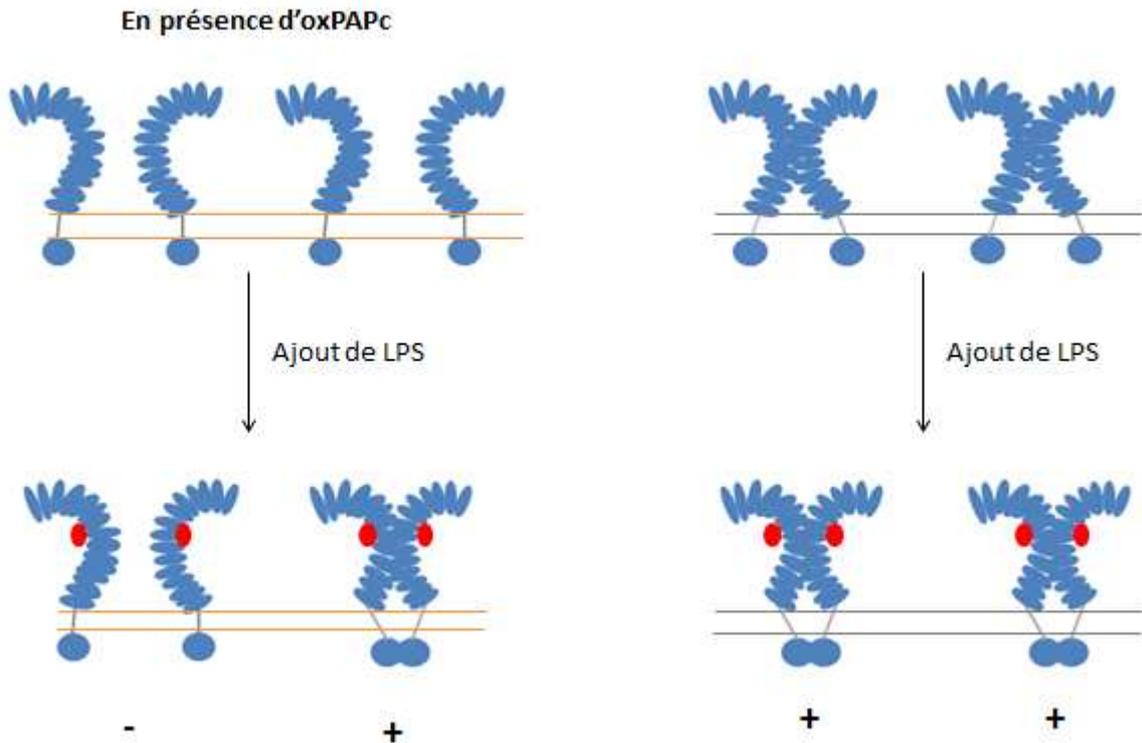


Figure 10 : Schéma représentant les effets de l'oxPAPc sur le seuil d'activation du dimère de TLR4.

#### IV. Les méthodes d'analyse de la dimérisation

L'étape de dimérisation du TLR4 est une étape clef dans la réponse à un stimulus. Notre avons émis l'hypothèse que le récepteur TLR4 existe à la surface des cellules sous une forme dimérisée préformée instable. Pour pouvoir étudier l'interaction entre les deux monomères nous avons dû sélectionner les techniques d'analyse les plus adaptées pour étudier une telle interaction. Afin d'expliquer les choix expérimentaux réalisés, nous allons décrire ces techniques dans les paragraphes suivants. Nous allons voir que certaines méthodes permettent d'étudier une interaction stable entre deux protéines et d'autres permettent de détecter des interactions plus fugaces et instables.

##### A. La co-immunoprécipitation

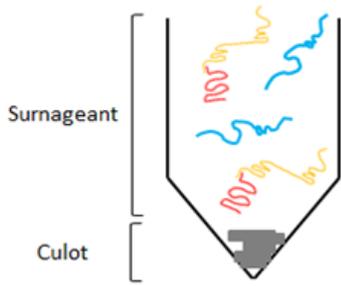
La co-immunoprécipitation est une technique régulièrement utilisée par les biologistes pour étudier l'interaction entre deux protéines. En effet, à partir d'un lysat de cellules, une immunoprécipitation est réalisée sur la première protéine d'intérêt.

Pour cela, un anticorps attaché à une bille est utilisé. La bille permet de faire sédimenter l'anticorps accroché et les protéines qui sont fixées par l'anticorps. Si une autre protéine est intimement liée à la protéine recherchée, elle sera aussi sédimentée avec la bille. Cette seconde protéine est alors appelée la protéine co-immunoprécipitée. Plusieurs lavages sont ensuite effectués pour éliminer les débris et les autres protéines qui n'ont pas sédimentés avec la bille. A la fin des lavages, il ne reste alors dans le tube que la protéine immunoprécipitée et celles co-immunoprécipitées. Par la suite, un western blot est réalisé pour rechercher la deuxième protéine qui nous intéresse à l'aide d'un anticorps primaire spécifique de cette protéine. Celle-ci étant fixée à la première protéine immunoprécipitée lorsqu'elle sera mise en évidence sur la membrane de Western blot, nous pourrions conclure à une interaction entre les deux protéines et ainsi dans notre étude mettre en évidence des dimères de TLR4 (Figure 11).

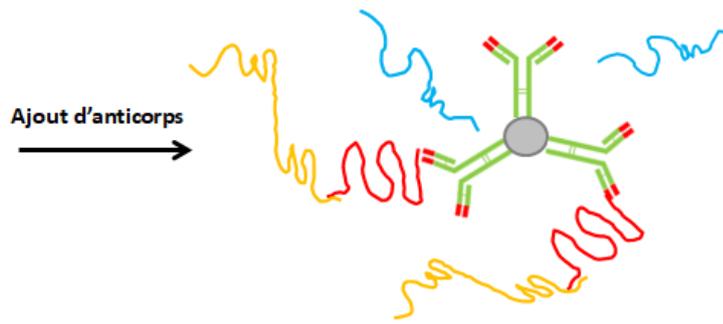
L'un des inconvénients de cette méthode est qu'elle ne permet pas d'étudier des interactions fugaces entre deux protéines. De plus, dans le cas de l'étude d'homodimères, il est nécessaire de pouvoir distinguer la protéine appât immunoprécipitée de la protéine cible co-immunoprécipitée. Dans le cas du dimère TLR4, cela implique d'exprimer des protéines flanquées d'étiquettes différentes.

Nous allons voir que d'autres méthodes permettent d'étudier de telles interactions.

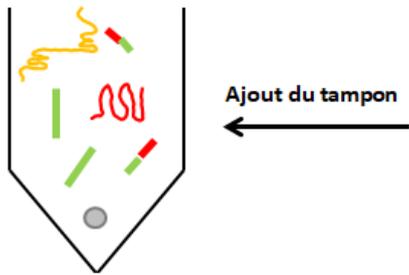
1. Lyse des cellules et récupération du surnageant



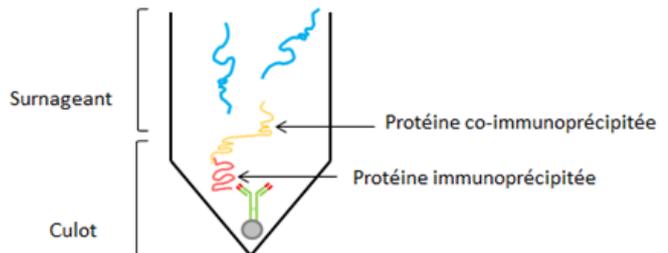
2. Ajout d'anticorps anti-protéine 1 associé à des billes d'agarose



4. Tampon dénaturant avec agent réducteur pour décrocher les billes et dénaturer les protéines

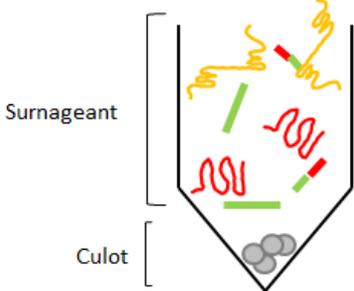


3. Les protéines non immunoprécipitées restent dans le surnageant et sont éliminées

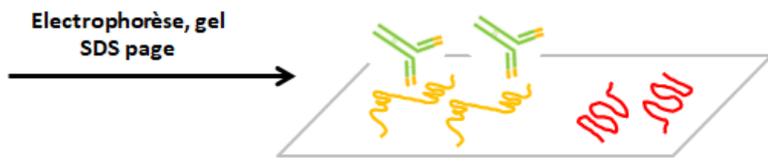


Centrifugation

5. Les protéines du complexe sont récupérées dans le surnageant

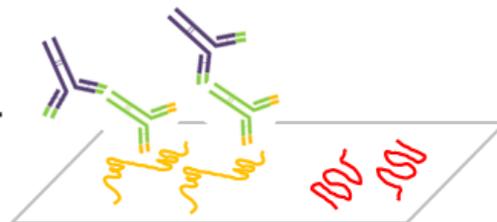


6. Transfert sur membrane et mise en contact avec un anticorps primaire anti-protéine 2



Ajout anticorps secondaire

7. Mise en contact avec l'anticorps secondaire



8. Révélation de la présence de la protéine 2 par immunoblotting



Figure 11: Schéma explicatif de la co-immunoprécipitation

## **B. Le « cross-linking » ou réticulation**

L'un des avantages du « cross-linking » ou réticulation par rapport à la co-immunoprécipitation par exemple, est que c'est une technique qui permet d'étudier des interactions fugaces entre deux protéines car des liaisons covalentes sont créées entre les protéines. En effet, *in vivo* la liaison entre deux protéines peut être éphémère pour permettre la création d'un signal par exemple (comme pour la dimérisation du récepteur TLR4). De plus, un homodimère formé de deux protéines identiques peut être détecté car le poids moléculaire est théoriquement double par rapport à celui du monomère. En revanche, il est possible d'obtenir des interactions non spécifiques. Les réactifs utilisés pour le « cross-linking » permettent de lier de manière covalente les deux protéines interagissant. Il existe de nombreux réactifs de « cross-linking » appartenant à différents groupes chimiques. Certains visent les terminaisons amines (-NH<sub>2</sub>), d'autres les carboxyles (-COOH), les sulfhydryques (-SH), les aldéhydes (-CHO), les hydroxyles (-OH) ou encore certains peuvent se lier aux azides (N<sub>2</sub>). Ensuite, certains réactifs sont dits homobifonctionnels car ils possèdent le même réactif à chaque extrémité et vont donc rassembler des molécules possédant les mêmes groupes fonctionnels. D'autres sont dits hétérobifonctionnels car ils possèdent différents réactifs à chaque extrémité ce qui permet de cibler plus précisément l'interaction entre les deux protéines recherchées et d'éviter les auto-conjugaisons.

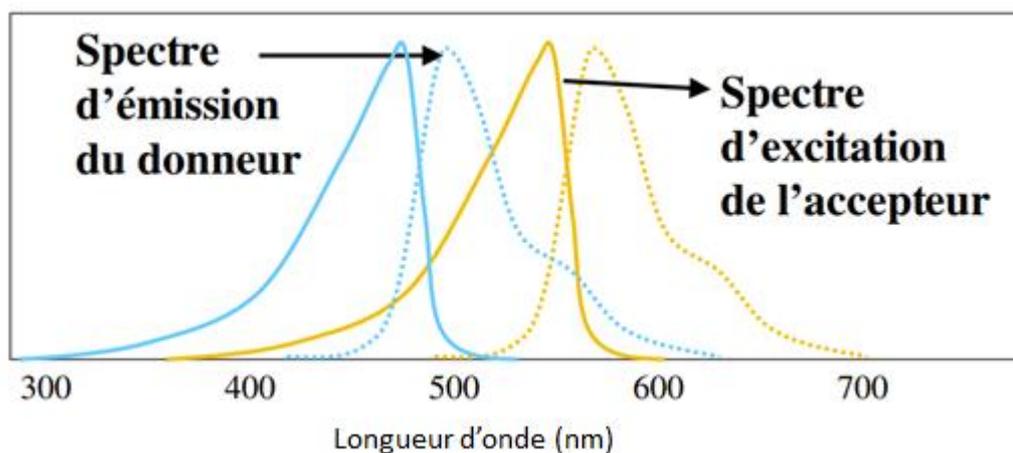
De plus, il est possible de jouer sur la taille de la chaîne du « crosslinker » ou agent de réticulation entre les deux extrémités ce qui détermine sa flexibilité. Plus la chaîne est longue et plus le « crosslinker » est flexible. En contrepartie il possède plus de site pour des potentielles liaisons non spécifiques. Enfin, il est également possible de jouer sur la composition chimique de la chaîne qui peut modifier la solubilité de la molécule, ou insérer des liaisons clivables comme les ponts disulfures facilement clivables avec un agent réducteur ou non clivables selon ce que l'on souhaite réaliser comme expérience (*Crosslinking Reagents Technical Handbook* 2012). Le « cross-linking » permet seulement d'établir une liaison covalente entre deux molécules ou d'assurer une liaison entre deux protéines interagissant de manière fluctuante. Une fois cette liaison établie il faut utiliser une méthode de

détection des protéines interagissant. Les différentes méthodes utilisées sont le western blot ou la spectrométrie de masse.

Le « cross-linking » a par exemple été utilisé pour montrer l'existence d'une forme de dimère préformé du récepteur EGF (Epidermal Growth Factor) ainsi que l'influence de la composition lipidique sur la formation de ces dimères préformés (Moriki, et al. 2001).

### C. Le FRET

Le transfert d'énergie par résonance en fluorescence appelé FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) est un phénomène de la mécanique quantique qui se produit entre un donneur fluorescent et un accepteur fluorescent. Dans des conditions idéales de FRET, l'excitation du donneur provoque un transfert d'énergie vers l'accepteur qui émet à son tour dans ses longueurs d'onde. Cette technique a été utilisée et mise en évidence pour la première fois par le scientifique Förster en 1948. Le FRET est une technique non-invasive qui permet d'étudier : l'interaction protéine-protéine, des activités enzymatiques ou des activations protéiques. Les protéines étudiées sont associées à des fluorochromes soigneusement choisis pour pouvoir assurer l'efficacité du FRET. En effet, pour que le FRET soit efficace le spectre d'émission du fluorochrome donneur doit chevaucher le spectre d'excitation de l'accepteur (Figure 12).



**Figure 12 : Recouvrement de l'émission du donneur et de l'excitation de l'accepteur nécessaire au FRET** (Marc Tramier, formation continue Inserm 2007)

De plus, la distance physique entre les deux protéines doit être faible : 1 à 10 nm (Banning et al. 2010) (Figure 13). Les fluorochromes peuvent être portés par deux protéines différentes et le FRET révélera l'association ou la dissociation de ces deux molécules ; ou alors ils peuvent être portés par la même molécule et sont

appelés dans ce cas-là des biosenseurs. Lors de l'utilisation de biosenseurs, un changement de conformation de la molécule peut entraîner une diminution ou une augmentation du FRET. Cela peut permettre d'étudier l'action de certaines molécules dans des conditions physiologiques (Vinkenberg et al. 2007).

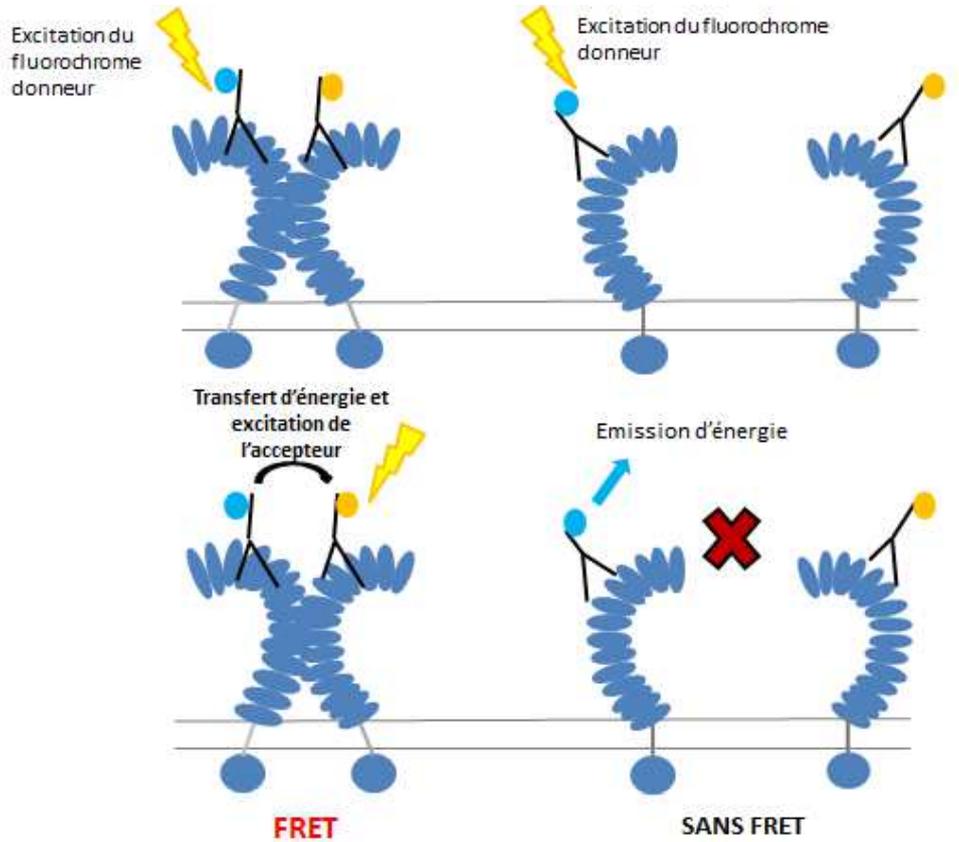


Figure 13 : Nécessité d'avoir une distance faible (<10 nm) entre les deux fluorochromes pour avoir un FRET.

Pour mesurer le FRET il est possible de mesurer l'intensité de fluorescence à l'état stationnaire et à ce moment il faut utiliser des filtres. La plupart du temps, il est difficile d'obtenir un signal FRET clair et il faut à ce moment-là employer des calculs compliqués pour éliminer les artefacts. De plus, la mesure du FRET à l'aide d'un microscope à fluorescence devient rapidement fastidieuse et ne permet pas d'analyser un grand nombre de cellules. Ainsi, d'autres techniques ont été développées pour diminuer ces artefacts et obtenir un signal FRET plus clair comme la mesure de la durée de vie de fluorescence qui est une technique plus dynamique. Cependant, cette technique requiert un matériel spécial et une bonne connaissance et expérience de son utilisation.

Une autre technique est de quantifier le signal FRET à l'aide de la cytométrie de flux qui permet de quantifier le signal de manière non invasive et d'analyser un

grand nombre de cellules assez rapidement. En effet, la cytométrie de flux permet de faire défiler des cellules à grande vitesse devant le faisceau laser (Banning et al. 2010). Dans le cas de la mesure de fluorescence, on choisit la longueur d'onde du laser correspondant au spectre d'excitation du fluorochrome donneur ce qui excitera le fluorochrome accepteur qui émet alors sa propre longueur d'onde. Les signaux émis sont ensuite récupérés par des photomultiplicateurs qui les amplifient. Les données sont ensuite numérisées, stockées et traitées par un ordinateur.

Il existe donc de nombreuses techniques pour quantifier le signal FRET et ainsi étudier entre autre une interaction entre deux protéines comme par exemple étudier la régulation de la dimérisation du récepteur CXR4 par différents stimuli. Des scientifiques ont montré qu'il y avait une augmentation du FRET lors de la mise en présence des cellules avec la chemokine SDF-1 $\alpha$  et qu'il existait un signal FRET basal suggérant la présence de dimères préformés du récepteur CXR4 à la surface des cellules (Toth 2004).

#### **D. L'anisotropie de fluorescence**

L'émission de la fluorescence est caractérisée par plusieurs paramètres : l'intensité, la longueur d'onde, la durée de vie et la polarisation. Nous avons déjà évoqué les techniques utilisant les trois premiers paramètres, nous allons maintenant approfondir la technique qui mesure la polarisation de fluorescence aussi appelée anisotropie (Gradinaru et al. 2010). Un fluorochrome excité par une lumière polarisée provoque une polarisation de la lumière émise. L'anisotropie se définit par l'équation suivante :

$$\text{anisotropy } (r) = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2I_{VH}}$$

Où  $I_{VV}$  est l'intensité de fluorescence émise polarisée verticalement et  $I_{VH}$  est l'intensité de fluorescence émise polarisée horizontalement lorsque le fluorochrome est excité avec une lumière polarisée verticale. Plusieurs facteurs jouent sur l'anisotropie, la température, la viscosité de la solution et la taille moléculaire apparente du fluorophore. C'est ce dernier facteur qui nous intéresse lors de l'étude de l'interaction protéine-protéine puisque la taille apparente d'une protéine contenant un fluorophore est augmentée lorsqu'elle interagit avec une autre protéine. Pour être plus précis, un fluorophore qui effectue une rotation lente par rapport à sa durée de

fluorescence aura un grand  $I_{VV}$  et un petit  $I_{VH}$  et par conséquent une forte anisotropie. Inversement, un fluorophore qui effectue une rotation rapide par rapport à sa durée de vie de fluorescence résultera d'une valeur d'anisotropie faible. Ainsi, lorsque la protéine est seule, le fluorophore peut effectuer des rotations rapides et donc une baisse de l'anisotropie alors que lorsque la protéine est liée à une autre protéine on aura une augmentation de l'anisotropie car les rotations seront plus lentes (Gijsbers, Nishigaki, Sánchez-Puig 2016).

## **PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE**

### **I. Matériel et méthodes**

#### **A. Production des plasmides**

Les plasmides que nous voulons produire sont des vecteurs d'expression en cellules eucaryotes :

- l'un contient un gène codant pour un TLR4 humain marqué sur sa portion N-terminale par une « étiquette HA (hemaglutinine)» que l'on appellera plasmide TLR4-HA.
- l'autre contient un gène codant pour un TLR4 marqué sur sa portion N-terminale par une « étiquette Flag » que l'on appellera plasmide TLR4-Flag.

L'utilisation de TLR4 marqué HA ou Flag permet de détecter l'expression du récepteur par Western blot en utilisant des anticorps anti-HA ou anti-Flag.

Nous avons également utilisé deux autres plasmides dans cette étude :

- le plasmide TLR4-GFP, un vecteur mammifère contenant un gène codant pour le TLR4 humain fusionné avec un gène codant pour la protéine de fluorescence GFP.
- le plasmide MD2, un vecteur mammifère contenant le gène codant pour le co-récepteur MD2 humain.

#### **1. Obtenir une colonie de bactéries contenant les plasmides à répliquer**

Une population de bactéries est mélangée avec 1µL de plasmide HA ou Flag à l'aide d'un embout de pipette stérile. Le mélange est ensuite laissé 10 minutes dans la glace. Pour pouvoir transformer le plasmide au sein du matériel génétique des bactéries un choc thermique est réalisé. Le tube est placé dans un bain marie à 42°C pendant 45 secondes, puis remis dans la glace pendant 5 minutes. Puis, 100µL de milieu SOC Medium (Invitrogen) est ajouté stérilement et mélangé à l'aide d'une pipette. Le mélange est ensuite agité dans un incubateur à 37°C pendant 40 minutes.

Parallèlement, du milieu de culture LB AGAR est liquéfié au micro-onde, puis laissé à refroidir jusqu'à une température d'environ 37°C. Puis, 20ml de ce milieu sont versé dans un FALCON de manière stérile, de l'ampicilline à une concentration

de 50µg/ml est ajouté. Enfin, le milieu est coulé dans une boîte de pétri et laissé à solidifier pendant 20 minutes.

Une fois le milieu solidifié, 150µL de bactéries transformées avec le plasmide TLR4-HA ou le TLR4-Flag sont étalées sur les boîtes de pétri à l'aide d'une pipette pasteur. Les boîtes sont ensuite mises dans l'incubateur (STUART) à 37°C pendant 24 heures.

## **2. Extraction des plasmides**

Une seule colonie de bactéries est sélectionnée et inoculée dans 3 ml de milieu de culture LB contenant de l'ampicilline à 50mg/ml. Le mélange est mis à incuber à 37°C pendant 8 heures dans un incubateur sous agitation. Puis, la culture est diluée au 1/50 dans 150 ml de milieu LB et de nouveau laissé à incuber pendant 12 heures (37°C et agitations). Ensuite, les bactéries sont mises à centrifuger à 6000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est retiré et les bactéries sont resuspendues dans 0,3 ml de tampon P1. Le tampon P2 est ensuite ajouté et le tube est retourné 6 fois pour homogénéiser le mélange, puis laissé à incuber 5 minutes à température ambiante. Le tampon P3 est ajouté, le mélange est homogénéisé et laissé à incuber 5 minutes sur un tapis de glace. Le tube est mis à centrifuger pendant 10 minutes à la vitesse maximale (15000 rcf). Le surnageant contenant le plasmide est récupéré dans un autre tube.

Le kit QIAGEN-tip 20 est préparé en ajoutant 1 ml de tampon QBT puis laissé à décanter pour former une résine. Le surnageant est ajouté par la suite et l'ADN du plasmide entre dans la résine par gravité. Le tout est ensuite lavé deux fois avec 2ml de tampon QC. L'ADN est enfin élué dans 0.8ml de tampon QF.

### Les tampons :

P1: 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A

P2: 200mM NaOH, 1% SDS

P3: 3.0 M d'acétate de potassium, pH 5.5

QBT : 750mM NaCl, 50mM MOPS, 15% isopropanol, 0,15% Triton X-100, pH 7,0

QC : 1,0 M NaCl, 50mM MOPS, 15% isopropanol, pH 7

QF : 1,25 M NaCl, 50 mM Tris-Cl, 15% isopropanol, pH 8,5

## **3. Digestion analytique pour vérifier l'identité des plasmides**

La digestion enzymatique par l'enzyme de restriction EcoRI est préparée selon le protocole suivant : 7µl de l'enzyme de digestion EcoRI, 14µl de tampon

EcoRI et 72µl d'eau. Pour la digestion BamHI et HindIII le mélange contenait 7µl de l'enzyme BamHI, 7µl de l'enzyme HindIII, 14µl de tampon et 77µl d'eau. Les mélanges étaient incubés à 37°C pendant 1 heure. Puis, 15µl de chacune des préparations étaient répartis respectivement dans six tubes Eppendorf. Ensuite, 5µl de plasmide supposé TLR4-HA ou TLR4-Flag étaient ajoutés.

Le gel de migration était préparé à l'aide de 0,8g d'agarose mélangé avec 80ml de TBE dilué 0,5 fois et porté à ébullition. Puis, 4 µl de SYBR safe étaient ajoutés (dilution au 1/20000). La préparation était ensuite coulée et laissée à solidifier pendant environ 40 minutes.

Enfin, 4 µl de Fast Green buffer 10x étaient ajoutés dans les tubes Eppendorf pour pouvoir visualiser la migration, les puits étaient remplis avec 10µl des différentes préparations. Un puit contenait 4µl de marqueur à 10000 paires de bases. Le gel était ensuite placé dans la cuve d'électrophorèse réglée sur 100 Volts. La lecture s'est effectuée après une heure de migration.

## **B. Détection des dimères de TLR4 par immunoprécipitation**

### **1. Culture cellulaire**

#### **1.1. Cellules 293T**

Les cellules 293T (ThermoFisher) sont des cellules rénales embryonnaires humaines. Elles étaient cultivées dans du DMEM complété par 10% de sérum de veau foetal, de la pénicilline à 100UI/mL et de la streptomycine à 100 µg/mL.

#### **1.2. Cellules THP1**

Les cellules THP1-Dual™ (Invivogen) sont une lignée de macrophages humains. Elles étaient cultivées dans du milieu RPMI complété par 10% de sérum de bovin foetal inactivé par la chaleur, 2mM de L-glutamine, 25 mM d'Hepes, 100µg/ml de pénicilline et streptomycine, 100 µg/ml de zéocine, et 10µg/ml de blasticidine. Elles étaient dérivées des monocytes THP-1 humains transfectées durablement par deux gènes rapporteurs :

- un gène rapporteur luciférase sous le contrôle d'un promoteur interféron ISG54 fusionné avec cinq éléments de réponse aux interférons de type I
- un gène rapporteur phosphatase-alkaline embryonnaire (SEAP) sous le contrôle activé par un promoteur l'interferon IFN-β fusionné avec cinq copies du facteur de transcription nucléaire κB (NF-κB) et trois copies du

facteur de transcription c-Rel qui fait partie de la même famille que le NF- $\kappa$ B

Ainsi, en observant l'activité de la SEAP on étudie les voies de signalisations dans lesquelles intervient le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, et en observant l'activité de la luciférase on étudie la voie de signalisation dans laquelle interviennent les interférons. Ces deux gènes rapporteurs sont mesurables dans le surnageant de culture des cellules en utilisant le QUANTI-Blue™ pour détecter la SEAP et le QUANTI-Luc™ pour détecter la luciférase sécrétée.

## 2. Transfections

Les cellules 293T étaient passées en P6 ou BP100 dans un milieu DMEM avec 10% de sérum de veau fœtal, inactivé par la chaleur, sans antibiotiques. Elles étaient transfectées 24h après en utilisant le kit Lipofectamine® LTX & PLUS™ Reagent (Invitrogen™).

Plasmides utilisés pour les transfections : plasmides TLR4-HA, TLR4-Flag, TLR4-GFP et MD2

## 3. Lyse des cellules

### 3.1. Tampons utilisés

**Tampon E1A 1X**: 150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM Hepes, 0,1%  $\text{NPO}_4$

**Tampon Glucoside** : 150mM NaCl, 50mM TrisHCl, 0,5% Octyl  $\beta$ -Dglucopiranoside, 4mM EDTA, 1% Brij

La présence de glucose et de glycérol dans le tampon permet une meilleure stabilisation des interactions protéine-protéine.

### 3.2. Protocole de lyse

Le milieu était retiré, les cellules étaient lavées avec du PBS EDTA 1mM froid. Puis, 1mL de PBS EDTA 1mM froid était ajouté, et les cellules étaient détachées à l'aide d'un cône. Le liquide était prélevé et mis dans un tube Eppendorf, centrifugé 30 secondes à 5000 rcf. Un nouveau lavage au PBS EDTA était réalisé. Ensuite, les cellules étaient resuspendues dans 1mL de tampon de lyse E1A 1X ou glucoside contenant des antiprotéases et mises à 4°C pendant 15min en rotation continue. Enfin, le tube était centrifugé pendant 10min à 15000rcf et le surnageant était prélevé.

## 4. Co-immunoprécipitations

### 4.1. Tampons utilisés

**Tampon E1A 1X:** 150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM Hepes, 0,1% NPO<sub>4</sub>

**Tampon E1A 500:** 500mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM Hepes, 0,1% NPO<sub>4</sub>

**Tampon de lavage glucoside :** 150mM NaCl, 50mM TrisHCl, 0,1% glucoside, 0,1% Triton, 0.1%Brij.

**Tampon de charge Laemni 2X:** 100mM Tris pH=6.8, 20% glycérol, 4% SDS, 0.2% Bromophenol blue, 200mM DTT

### 4.2. Protocole d'immunoipréciation

Les billes d'anticorps monoclonal anti-HA de souris (SIGMA) étaient lavées trois fois avec 1mL de tampon de lyse E1A 1X avec des antiprotéases. La centrifugation entre chaque lavage était d'une minute à 2500 rcf. Puis, les billes étaient mélangées avec le surnageant de la lyse. Enfin, chaque tube était mis à 4°C en rotation continue pendant 12 à 24h.

Le lendemain, 3 lavages avec du tampon E1A 500 ou E1A 1X ou glucoside étaient effectuées. Puis, le mélange était resuspendu dans du tampon de charge Laemni 2X, les tubes étaient vortexés, bouillis pendant 5 minutes, puis centrifugés 1 minute à 15000rcf.

## 5. Protocole du Western blot

Les échantillons étaient chargés dans un gel d'acrylamide à 10 ou 7%. La migration avait lieu dans du TGS 1x (Tris-glycine-SDS) à 170V pendant 45 minutes ou à 100V pendant 1 heure. Les protéines étaient ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose. Cette dernière était ensuite placée dans du TBS (Tris-NaCl) avec 0,05% de tween 20 (TBST) et 5% de lait pendant 1h à température ambiante en agitation continue pour réaliser le blocage.

Après 3 lavages rapides et successifs au TBST, l'incubation primaire était réalisée avec un anticorps de lapin anti-HA ou un anticorps de lapin anti-FLAG dilué 1/1000 dans du TBST 5% BSA (sérum contenant de l'albumine de bovin) ou un anticorps anti-GFP dilué 1/2000 dans du TBST 5% lait pendant 12 à 24h à 4°C, en agitation continue.

Ensuite, 3 lavages au TBST de 5 minutes chacun étaient réalisés, avant de procéder à l'incubation de l'anticorps secondaire qui avait lieu avec un anticorps anti-

lapin dilué au 1/10 000 dans du TBST 5% de BSA ou 5% de lait pendant 1h à température ambiante. La membrane était alors lavée 3 fois pendant 5min avec du TBS. Elle était placée dans du Super Signal™ West Dura Extended Duration Signal (Thermo Scientific™) pendant 5 minutes et analysée par le ChemiDoc™ (Bio-Rad™)

## **6. Traitement à l'oxPAPC<sup>1</sup> et stimulation au LPS**

### **6.1. Préparation de l'oxPAPC**

Pour solubiliser l'oxPAPC (Invivogen), 0,5mL de DMEM seul était ajouté au flacon de 0,5mg d'oxPAPC et ce dernier était vortexé pendant 30 secondes, puis mis à 37°C pendant 5 minutes. Le flacon était ensuite vortexé pendant 1 minute. Un volume ensuite était prélevé pour l'ajouter à du milieu DMEM sans antibiotiques ou du RPMI et obtenir la concentration voulue soit 30µg/ml et de concentration molaire de 3.8 mmole/ml ( $3.8 \cdot 10^{-5}$  mole/L).

### **6.2. Stimulation à l'oxPAPC et au LPS des cellules 293T**

Les cellules étaient cultivées en BP100 dans 10mL de DMEM 10% sérum de veau fœtal (SVF) sans antibiotiques et transfectées 24 heures après. Après 48 heures, la stimulation à l'oxPAPC était effectuée. Le milieu des BP100 était retiré, puis 7,5mL d'un mélange contenant de l'oxPAPC à 30µg/ml et du DMEM 10% SVF sans antibiotiques était ajouté aux BP100 stimulées. Pour les autres, du milieu seul était mis. Les cellules étaient remises à 37°C pendant 24 heures.

Ensuite, les cellules étaient stimulées 20 ou 30 minutes avec du LPS à 1mg/ml à 37°C, puis lysées.

### **6.3. Contrôle de l'efficacité d'oxPAPC à l'aide des cellules THP1**

Des cellules THP1 étaient stimulées en P96 dans un volume final de 100µL avec  $7 \cdot 10^5$  cellules par puits dans du RPMI 10% sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur. Parmi les 100µL, 50µL de milieu avec de l'oxPAPC à 60µg/ml (soit une concentration finale d'oxPAPC à 30 µg/ml) ou du milieu seul était mélangé à 50µL de LPS à 100ng/ml ou 1000ng/mL.

Après 24 heures, 20µL des puits étaient prélevés et ajoutés à 200µL de Quanti-Blue™ chauffés préalablement à 37°C. Le Quanti-Blue™ détecte l'activité des phosphatases alcalines comme la SEAP, dans le surnageant de culture des cellules. La SEAP est exprimée dans les cellules THP1 lorsque ces dernières sont stimulées

---

<sup>1</sup> oxPAPC : 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine oxydé

par un agoniste des TLRs, notamment le LPS. L'absorbance des puits était mesurée après 15 minutes d'incubation à 37°C, un programme cinétique était lancé, mesurant l'absorbance toutes les 15 minutes pendant 4 heures.

## **7. Stimulation au nickel**

La solution de nickel (N6136 SIGMA) est préparée à 1,5 M sous une hotte, 2.3 ml d'eau nanopure est ajoutée à 0.82g de nickel. Les cellules 293T étaient cultivées en BP100 dans 10mL de DMEM 10% SVF. Les cellules étaient transfectées avec les plasmides TLR4-HA et TLR4-Flag, ou TLR4-Ha/TLR4-Flag et TLR4-MD2 ou TLR4-Flag seul. Elles étaient ensuite stimulées avec une solution de nickel à 1,5 mmol/L (10 µl de solution à 1.5 M dans 10 ml de milieu) pendant 3 heures ou stimulées avec du LPS à 1µg/ml pendant 20 minutes ou non stimulées. Les cellules étaient ensuite lysées avec le tampon E1A 1X ou avec le tampon glucoside.

## **C. Détection des dimères de TLR4 par FRET**

### **1. Culture cellulaire.**

Des macrophages de souris (BEI Resources) étaient cultivés dans du DMEM complété par 10% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur, de la ciprofloxacine à 10µg/mL, de 1mM de sodium pyruvate, de la pénicilline à 100UI/mL et de la streptomycine à 100µg/mL.

### **2. Protocole FRET**

#### **2.1. Mise au point des marquages TLR4 au FACS**

Les cellules étaient cultivées en BP100 dans leur milieu de culture habituel. Elles étaient lavées avec du PBS, puis incubées avec du PBS EDTA 5mM pendant 10 minutes à 4°C. Les macrophages étaient ensuite décollés et mis dans un FALCON pour être centrifugés 5 minutes à 1500 rpm. Ils étaient resuspendus dans du tampon FACS (PBS EDTA 2mM, 0.5% BSA) puis comptés et mis à la concentration de 500 000 cellules par tube de cytométrie, dans 100µL de tampon FACS.

L'anticorps anti-TLR4/MD2 de souris Alexa Fluor 488 (Biorad) était ajouté au 1/2 ou 1/20 et mis à incuber 20 minutes à 4°C à l'abri de la lumière. Après, 2 lavages au tampon de FACS étaient effectués. Enfin, les cellules étaient resuspendues dans

500µL de tampon de FACS, gardées au froid à l'abri de la lumière pour être analysées par cytométrie de flux MACSQuant Analyzer 10 - Miltenyi Biotec.

### 2.2. Mise au point du FRET

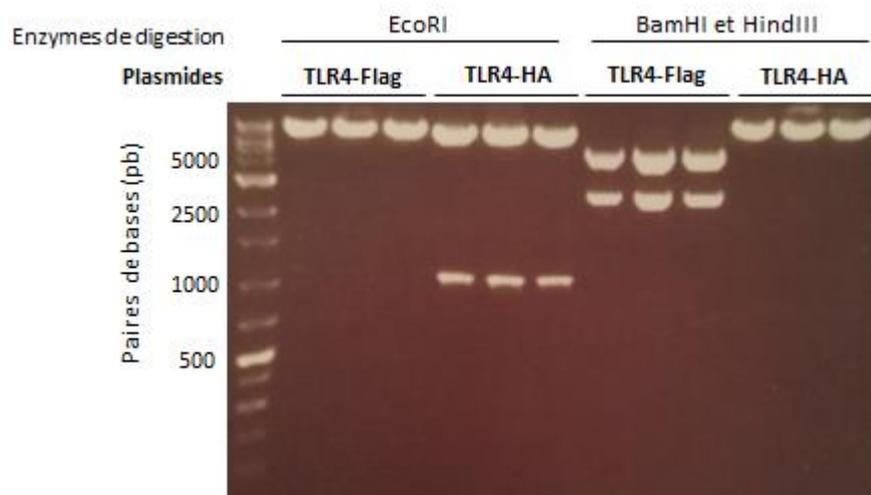
Les cellules étaient cultivées en BP100 dans leur milieu de culture habituel. Elles étaient lavées avec du PBS, puis incubées avec du PBS EDTA 5mM pendant 10 minutes à 4°C. Les macrophages étaient ensuite décollés et mis dans un FALCON pour être centrifugés 5 minutes à 1500 rpm. La moitié des cellules étaient resuspendues dans du tampon FACS (PBS EDTA 2mM, 0.5% BSA) puis comptées et mis à la concentration de 500 000 cellules par tube de cytométrie, dans 100µL de tampon FACS. L'autre moitié étaient d'abord fixée au paraformaldéhyde, 10 minutes à température ambiante et ensuite on poursuivait les étapes comme ci-dessus.

Les anticorps utilisés sont l'anticorps anti-TLR4/MD2 couplé au fluorophore Alexa Fluor 488 et l'anticorps anti-TLR4/MD2 couplé à la biotine. Les deux anticorps sont issus du même clone, anticorps monoclonal de rat, clone MTS-510. L'anticorps anti-souris TLR4/MD2 Alexa Fluor 488 était ajouté au 1/2 et mélangé avec un anticorps anti-souris TLR4/MD2 biotinylé au 1/20 ou il était mis seul au 1/2. Incubation 20 minutes à 4°C à l'abri de la lumière. Après deux lavages au tampon de FACS, les échantillons seuls étaient resuspendus dans 500µL de FACS gardés au froid à l'abri de la lumière. Cependant une partie de l'échantillon contenant 488 et biotine était gardé à part pour ajouter le réactif Streptavidine-ATTO Q 540 au 1/200 et incuber le tout de nouveau 20 minutes à 4°C. Puis comme pour les autres conditions, deux lavages au FACS étaient effectués. La mesure du FRET est réalisée par cytométrie de flux.

## II. Résultats

### A. Production des plasmides contenant un gène codant pour un TLR4 humain

Pour pouvoir réaliser les expériences, une grande quantité de plasmide HA et de plasmide Flag est nécessaire. Après avoir transformé le plasmide au sein du matériel génétique de la bactérie, celle-ci est placée dans les conditions d'incubation optimales pour pouvoir permettre sa réplication. Une fois que nous avons extrait les plasmides des bactéries, nous cherchons à savoir si nous avons bien obtenu les plasmides que nous voulions c'est-à-dire un plasmide codant pour un TLR4 marqué par HA et un plasmide codant pour un TLR4 marqué par Flag. Pour cela, nous utilisons des enzymes de digestion restrictive. L'enzyme de digestion EcoRI coupe seulement le plasmide HA en deux avec une partie de plasmide à 921 paires de bases (pb) et l'autre à 6648 pb, ce que l'on retrouve parfaitement sur le gel d'agarose. De même, le plasmide Flag est coupé en deux par deux enzymes BamHI et HindIII à 2500 pb et 5000 pb, ce qui est retrouvé sur le gel (Figure 14). De plus, les contrôles négatifs sont fonctionnels ; on peut donc ainsi valider les résultats obtenus. Nous avons donc réussi à produire deux plasmides différents, le TLR4-HA et le TLR4-Flag.



**Figure 14 : Gel d'agarose pour la migration des protéines selon leur taille.** Les plasmides supposés TLR4-HA ou TLR4-Flag ont été digérés avec différentes enzymes : EcoRI, ou BamHI et HindIII

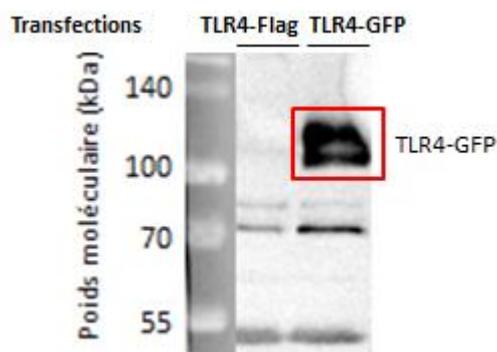
## **B. Détection des dimères de TLR4 par immunoprécipitation**

### **1. Mise en place du protocole**

#### **1.1. Vérification du protocole de transfection et détection des TLR4 par Western blot**

Pour la première expérience, les cellules 293T ont été transfectées dans une boîte de culture P6. Nous avons voulu vérifier que les cellules transfectées exprimaient bien les gènes TLR4-HA et TLR4-Flag. Pour cela, nous avons transfecté les cellules d'un puit avec le TLR4-GFP. Si ces cellules expriment correctement le gène, elles seront fluorescentes. Vingt-quatre heures après la transfection, la fluorescence est observée à l'aide d'un microscope à la fluorescence. A l'œil nu, environ 80% des cellules sont transfectées avec succès. Le protocole utilisé pour la transfection des plasmides est donc efficace.

Ensuite, nous avons voulu savoir si les différents TLR4 exprimés étaient détectables par Western blot. Nous avons donc coulés trois gels et effectués la migration des protéines par électrophorèse. Chaque membrane était ensuite incubée avec un anticorps anti-HA, anti-Flag ou anti-GFP. Les westerns blot incubés avec les anticorps anti-HA et anti-Flag n'étaient pas lisibles, en revanche le TLR4-GFP a réussi à être détecté grâce à l'anticorps anti-GFP (Figure 15).



**Figure 15 : Détection du TLR4-GFP.** Western blot sur un gel polyacrylamide 10%. Cellules 293T transfectées avec le plasmide TLR4-Flag ou le plasmide TLR4-GFP. Lyse des cellules avec le tampon E1A1X, incubation des membranes avec l'anticorps primaire anti-GFP.

L'anticorps primaire anti-GFP utilisé pour révéler la présence de TLR4-GFP est donc plus sensible que les anticorps primaire anti-HA ou anti-Flag. Cependant, la quantité de cet anticorps disponible était faible à l'inverse de celle des deux autres, il a donc fallu trouver une technique pour pouvoir détecter les TLR4-HA ou TLR4-Flag.

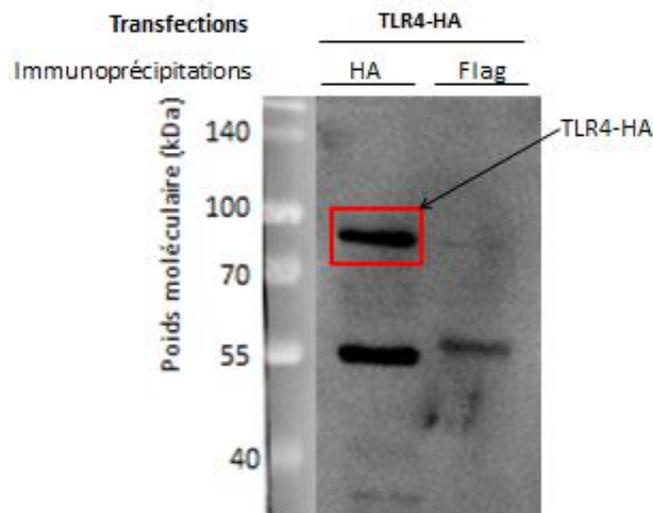
Pour avoir une meilleure sensibilité de détection des TLR4-HA et -Flag, nous avons décidé d'utiliser la technique d'immunoprécipitation permettant de travailler avec plus de cellules en concentrant la protéine d'intérêt grâce à l'immunoprécipitation.

### 1.2. La co-immunoprécipitation

Avant, de réaliser les étapes de la technique de co-immunoprécipitation, nous avons voulu vérifier que l'immunoprécipitation du TLR4-HA permettait une détection de ce dernier par Western blot et que cette immunoprécipitation était spécifique. Nous avons donc transfecté des cellules 293T avec le plasmide TLR4-HA.

L'immunoprécipitation est réalisée après la lyse des cellules cultivées en boîte de 100mm de diamètre et avant le transfert sur le gel polyacrylamide 10% de western blot. Le lysat des cellules est mélangé avec des anticorps monoclonaux anti-HA ou anti-Flag.

L'incubation de la membrane cellulaire est réalisée avec un anticorps primaire anti-HA pour essayer de détecter le TLR4-HA.



**Figure 16 : Détection du TLR4-HA suite à une immunoprécipitation avec des anticorps monoclonaux anti-HA.** Western blot réalisé sur un gel polyacrylamide 10%. Cellules transfectées avec le plasmide TLR4-HA, lyse des cellules avec le tampon E1A 1X, immunoprécipitation avec des anticorps monoclonaux anti-HA ou avec des anticorps monoclonaux anti-Flag, incubation de la membrane cellulaire avec l'anticorps primaire anti-HA.

L'immunoprécipitation nous permet bien de détecter TLR4-HA par western blot puisque l'on observe une bande protéique à 90kDa (poids moléculaire du récepteur). De plus, elle est spécifique puisque lorsque les cellules ne contiennent pas le TLR4-HA, l'anticorps monoclonal anti-HA ne se fixe pas sur les TLR4-Flag et

donc aucune bande n'apparaît sur la membrane. A 55kDa on peut observer les chaînes lourdes des anticorps (Figure 16).

Ainsi, nous allons pouvoir utiliser la co-immunoprécipitation pour mettre en évidence la présence de dimères de TLR4 sur les membranes des cellules.

Pour cela, les cellules 293T ont été mises en culture en en boîte de 100mm de diamètre. Les cellules étaient soit co-transfectées TLR4-HA et TLR4-Flag, soit transfectées par TLR4-Flag seul, soit non transfectées. De plus, le mélange surnageant de lyse et billes monoclonales anti-HA est lavé soit avec le tampon E1A 1X soit avec un tampon plus stringent le E1A 500. Par ailleurs, sachant que la taille de la protéine cherchée est élevée, le gel acrylamide est réalisé à 7% car il permet une meilleure séparation spatiale des protéines recherchées et des chaînes lourdes. Enfin, la membrane cellulaire obtenue après migration des protéines est incubée avec l'anticorps primaire anti-Flag.

On devrait donc observer une bande protéique seulement avec la condition où la cellule est transfectée avec les deux plasmides. En effet, notre hypothèse est qu'elles expriment à leur surface des dimères préformés de TLR4-HA/TLR4-Flag. Lors de l'immunoprécipitation de TLR4-HA, si TLR4-Flag est lié à TLR4-HA (dimère) il sera co-immunoprécipité avec cette dernière. Ainsi, lorsque par la suite on cherche à mettre en évidence TLR4-Flag avec un anticorps anti-Flag celui-ci est présent, ce qui n'est pas possible s'il n'est pas lié avec un TLR4-HA (Figure17).

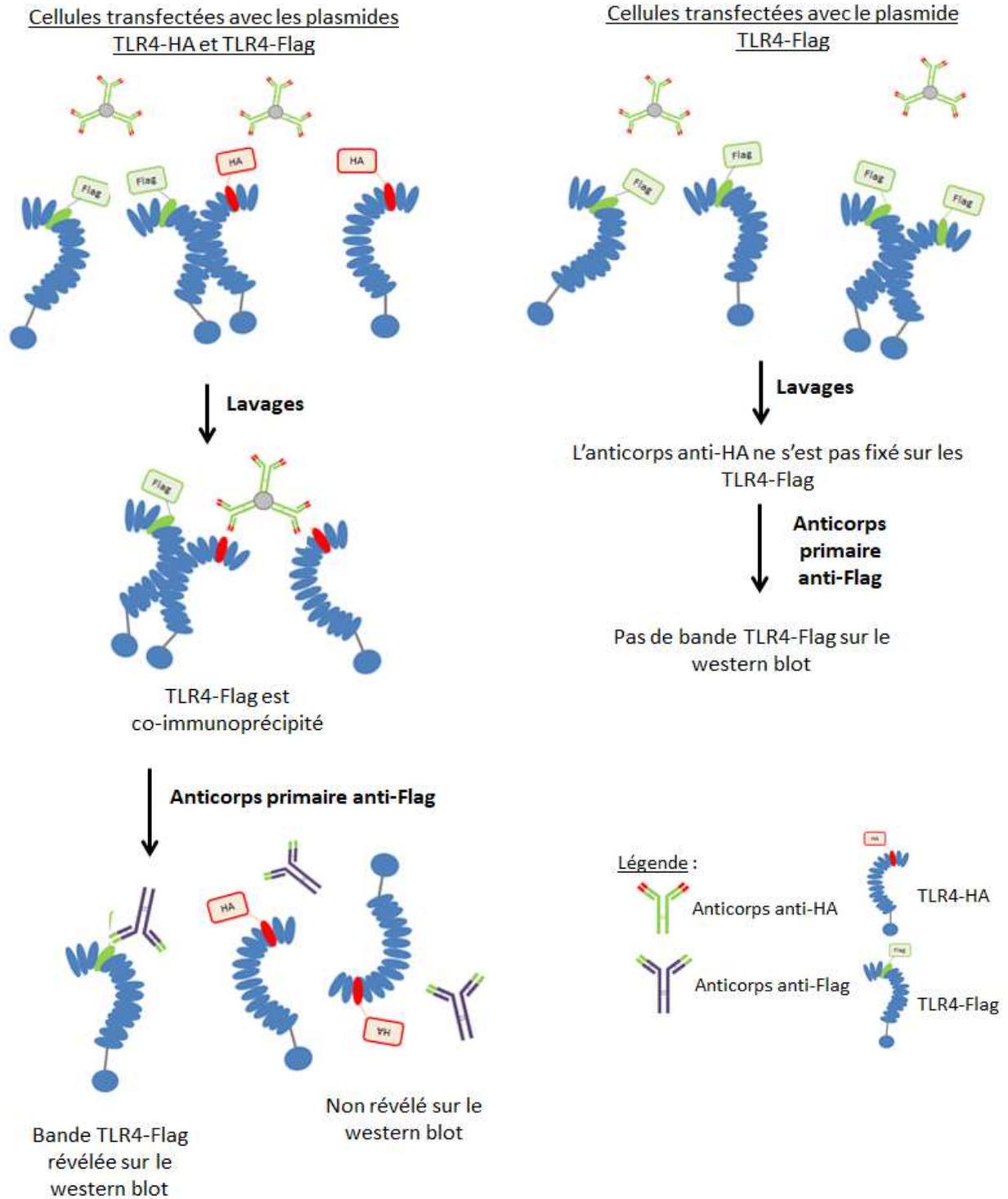
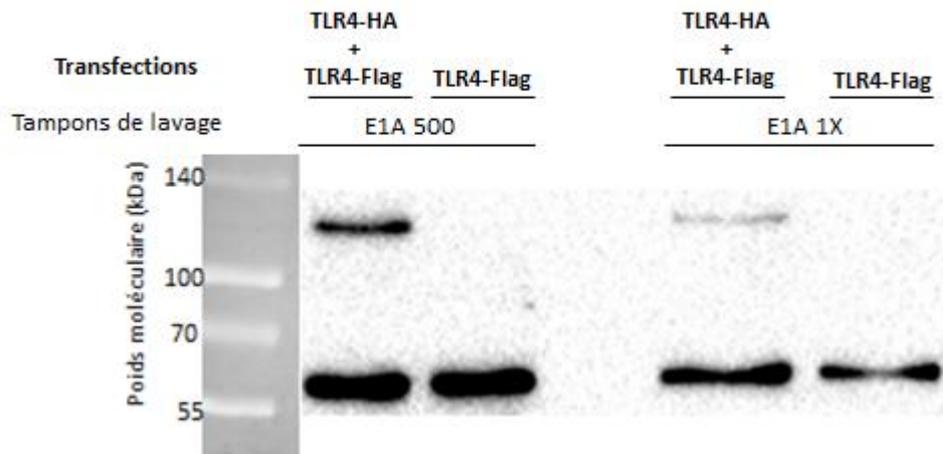


Figure 17 : Schéma représentant les réactions qui devraient se produire au cours de la co-immunoprécipitation et ce que l'on devrait observer sur le western blot.

Le TLR4-Flag est visible à environ 120kDa. Cette bande protéique démontre ainsi l'existence des dimères de TLR4 puisqu'au niveau du contrôle ne contenant que des récepteurs marqués Flag aucune bande de protéines n'apparaît (Figure 18).



**Figure 18 : Détection des dimères de TLR4 par co-immunoprécipitation.** Western blot réalisé avec un gel polyacrylamide 7%. Cellules transfectées avec les deux plasmides HA et Flag ou transfectées avec le plasmide Flag seul. Lyse des cellules avec le tampon E1A 1X, puis immunoprécipitation avec les anticorps monoclonaux anti-HA avec le tampon E1A 1X ou le tampon E1A 500. Incubation des membranes avec l'anticorps primaire anti-Flag.

Ainsi, grâce à la technique de co-immunoprécipitation nous avons montré l'existence de dimères de TLR4 présents lorsque la cellule n'est pas stimulée.

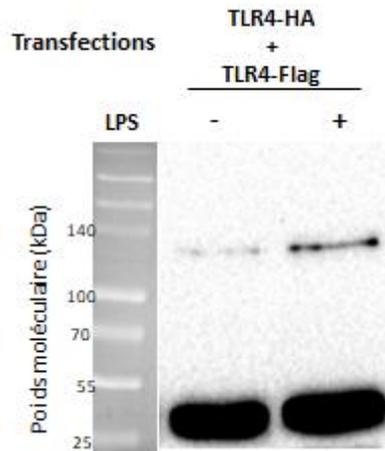
Nous pouvons également observer que la bande est plus marquée et mieux visible lorsque le tampon de lavage utilisé lors de l'immunoprécipitation est le tampon E1A 500 qui est hypertonique par rapport au tampon E1A 1X. On utilisera donc l'E1A 500 pour la suite des expériences.

## **2. Analyse des conséquences des stimulations LPS et oxPAPC sur la quantité de dimères à la surface des cellules.**

Le protocole pour détecter les dimères de TLR4 présents à la surface des cellules est maintenant au point. Le LPS est un ligand du TLR4 et stimule sa dimérisation à la surface des cellules. Ainsi, en stimulant les cellules au LPS, la quantité de dimères à la surface des cellules devrait augmenter, et on devrait observer une bande protéique plus intense lorsque les cellules sont stimulées que lorsqu'elles ne sont pas stimulées.

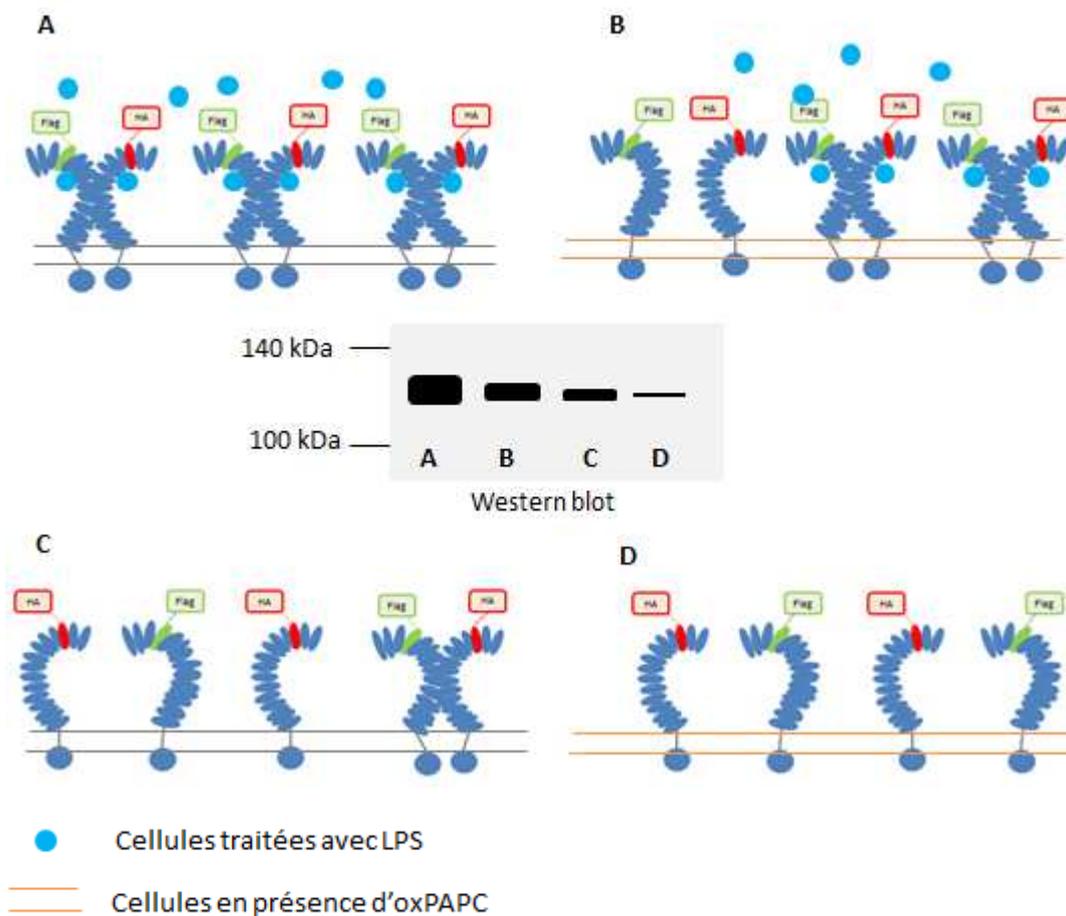
Les cellules étaient cultivées en en boîte de 100mm de diamètre dans un milieu sans antibiotiques, puis transfectées par TLR4-HA et TLR4-Flag. Après 24h, les cellules sont stimulées au LPS pendant 20 minutes. Une étude a montré qu'après 20 minutes la quantité de dimères de TLR4 à la surface des cellules étaient diminuée (Zanoni et al. 2011). En effet, lorsque les dimères sont formés et activés, ils sont ensuite endocytés dans la cellule.

La bande protéique représentant les dimères TLR4-HA/TLR4-Flag est plus importante lorsque les cellules ont été stimulées au LPS. Il semblerait donc qu'après stimulation au LPS on puisse observer une augmentation de la quantité des dimères de TLR4 présents sur les membranes des cellules (Figure 19).



**Figure 19 : Détection des dimères de TLR4 avec ou sans traitement des cellules au LPS.** Western blot réalisé avec un gel polyacrylamide 7%. Cellules transfectées TLR4-HA et TLR4-Flag, stimulées pendant 20 minutes avec du LPS ou non stimulées. Lyse des cellules avec le tampon E1A 1X, immunoprécipitation avec les anticorps monoclonaux anti-HA avec tampon de lavage E1A 500. Incubation des membranes avec l'anticorps primaire anti-Flag.

L'oxPAPC possède des propriétés anti-inflammatoires (Erridge et al. 2008; Walton et al. 2003; Bochkov, Kadl, et al. 2002). Plusieurs hypothèses ont été émises sur son mode d'action, nous pensons qu'il inhiberait le seuil d'activation des TLR4 en diminuant la quantité de dimères préformés inactifs à la surface des cellules. En utilisant la technique de co-immunoprécipitation, nous espérons montrer qu'en présence d'oxPAPC la quantité de dimères préformés à la surface des cellules est diminuée et que lors de la stimulation au LPS, la dimérisation des TLR4 est moins importante que lorsque les cellules sont stimulées uniquement avec le LPS et n'ont pas été en présence d'oxPAPC. Nous devrions donc observer sur le western blot une bande protéique moins intense que lorsque les cellules sont stimulées au LPS uniquement. De plus, la quantité de dimères présents devrait être inférieure ou égale à celle des cellules non stimulées lorsque les cellules ont été mises en présence d'oxPAPC seul (Figure 20).

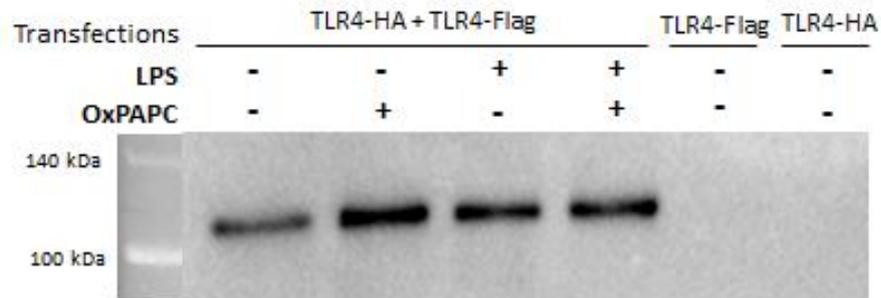


**Figure 20 : Schéma représentant les différentes conditions de l'expérience ainsi que les résultats attendus. A.** Cellules traitées avec LPS. **B.** Cellules traitées avec LPS et oxPAPC. **C.** Cellules non traitées. **D.** Cellules traitées avec oxPAPC.

De nouvelles expériences ont donc été réalisées. Les cellules 293T étaient cultivées en boîte de 100mm de diamètre et transfectées avec les plasmides TLR4-HA et TLR4-Flag, avec le plasmide TLR4-HA seul ou avec le plasmide TLR4-Flag seul. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec de l'oxPAPC à 30µg/ml pendant 24 heures. Nous avons choisi cette concentration puisque dans plusieurs études ils ont observé un effet optimal de l'oxPAPC à 25-30µg/ml (Erridge et al. 2008; Bochkov, Kadl, et al. 2002). Ensuite, certaines cellules ont été stimulées 20 minutes avec du LPS avant d'être lysées.

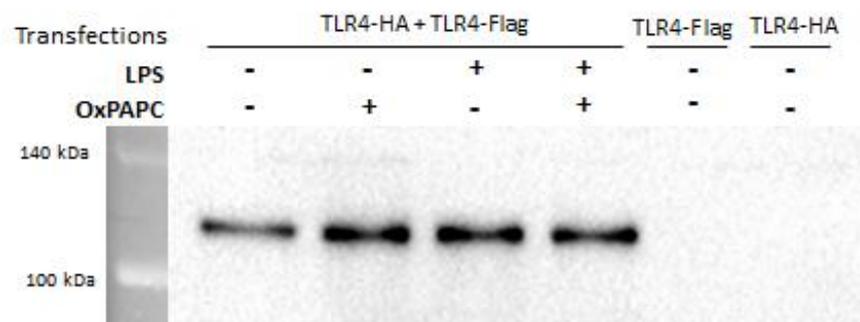
Les résultats sont peu concluants. On observe une légère différence d'intensité de la bande protéique entre les cellules non traitées et les cellules stimulées avec le LPS et/ou l'oxPAPC. En effet, la bande est légèrement plus fine pour les cellules transfectées par les deux plasmides mais non stimulées comme l'on pouvait s'y attendre. En revanche, on n'observe pas de différence d'intensité entre les bandes des cellules traitées au LPS uniquement et celles qui ont été exposées à

l'oxPAPC. En effet, on s'attendait à observer des bandes de plus faible intensité pour les cellules qui avaient été traitées avec de l'oxPAPC (Figure 21).



**Figure 21 : Effet de l'oxPAPC et de la stimulation au LPS sur la quantité de dimères de TLR4 présents sur les membranes des cellules.** Western blot réalisé avec un gel polyacrylamide 7%. Cellules transfectées avec les plasmides TLR4- HA et TLR4-Flag ou avec le plasmide TLR4-Flag seul, ou avec le plasmide TLR4-HA seul. Cellules non traitées ou non avec LPS et/ou oxPAPC. Tampon de lyse E1A1X. Immunoprécipitation de HA avec l'anticorps monoclonal anti-HA et tampon de lavage E1A 500. Les membranes cellulaires sont incubées avec l'anticorps primaire anti-Flag.

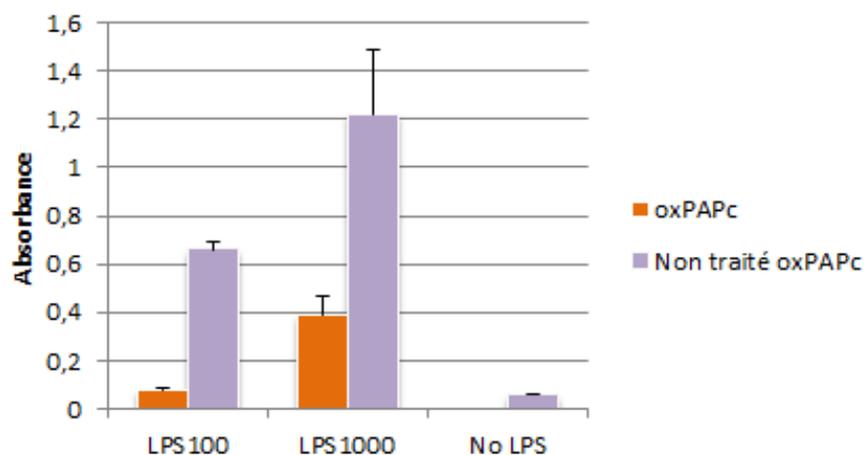
Cependant, avec toutes les manipulations effectuées avant de mettre les échantillons dans les puits de migration du gel d'électrophorèse peut-être que la quantité de protéines dans chaque puit n'est pas la même et empêcherait de visualiser une différence. Les membranes sont donc incubées avec un anticorps primaire anti-HA. En effet, l'immunoprécipitation étant réalisée avec des anticorps monoclonaux anti-HA, l'anticorps primaire devrait se fixer sur tous les récepteurs marqués HA. Le signal est très fort, et à l'aide du logiciel ImageLab les quantités dans chaque puit ont été mesurées. Dans chaque puit du nouveau gel polyacrylamide la quantité d'échantillon normalisée est placée. Malgré une normalisation des quantités les résultats sont toujours aussi peu concluants (Figure 22).



**Figure 22 : Effet de l'oxPAPC et de la stimulation au LPS sur la quantité de dimères de TLR4 présents sur les membranes des cellules après normalisation des quantités.** Western blot réalisé avec un gel polyacrylamide 7%. Cellules transfectées avec les plasmides TLR4- HA et TLR4-Flag ou avec le plasmide TLR4-Flag seul, ou avec le plasmide TLR4-HA seul. Cellules traitées ou non avec LPS et/ou oxPAPC. Tampon de lyse E1A1X. Immunoprécipitation de HA avec l'anticorps monoclonal anti-HA et tampon de lavage E1A 500. Les membranes cellulaires sont incubées avec l'anticorps primaire anti-Flag.

Cette série d'expériences a été répétée en co-transfectant (en plus de TLR4-HA et TLR4-Flag) le co-récepteur MD2 dans les cellules. Comme physiologiquement le LPS se lie avec le co-récepteur MD2 pour créer l'interface de dimérisation qui va permettre la dimérisation du récepteur TLR4, nous avons pensé que la présence de MD2 était peut-être nécessaire pour observer une augmentation de la quantité de dimères sur les membranes cellulaires lors de stimulation au LPS. Les résultats ont été similaires, nous n'avons pas observé d'augmentation d'intensité des bandes protéiques provenant des cellules qui avaient été traitées avec le LPS.

En parallèle, à chaque utilisation d'un lot d'oxPAPC, un contrôle de son effet sur la réponse immunitaire a été réalisé sur les cellules THP1. En effet, nous voulons contrôler que le LPS stimule bien les voies de signalisation du TLR4 tandis que l'oxPAPC les inhibe. Rappelons que le facteur de transcription NF- $\kappa$ B fait partie de la cascade de signalisation activée lors de la dimérisation du TLR4 et qu'il active l'expression des gènes codant pour les cytokines inflammatoires et ceux codant pour les interférons de type I. Ainsi, en mesurant la quantité de facteurs dans les cellules on étudie la réponse immunitaire de ces dernières. Les cellules THP1 sont un bon modèle pour effectuer cette mesure puisqu'elles possèdent un gène rapporteur phosphatase-alkaline embryonnaire (SEAP) contrôlé par NF- $\kappa$ B. La SEAP est détectable avec le Quanti-Blue™. L'activité de la SEAP dépendant de l'activation de NF- $\kappa$ B est mesurée par absorbance. Plus l'absorbance est élevée plus l'activité NF- $\kappa$ B est augmentée et donc plus la réponse immunitaire du TLR4 à un stimulus est forte. On observe sur l'histogramme qu'en présence de LPS l'absorbance et donc la quantité de NF- $\kappa$ B est augmentée. En présence d'oxPAPC l'absorbance est en moyenne cinq fois moins élevée. Ainsi, lorsque les cellules sont traitées avec l'oxPAPC la réponse NF- $\kappa$ B des cellules est moins importante, l'oxPAPC utilisé pour les expériences a bien un effet inhibiteur comme attendu (Figure 23).



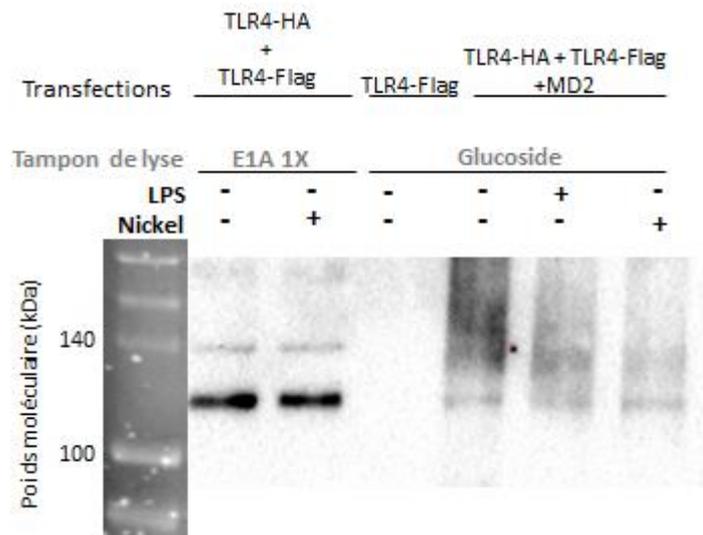
**Figure 23 : Histogramme représentant la réponse NF-kB dans les cellules THP1.** Les cellules THP1 ont soit été stimulées avec du LPS à 100ng/ml (LPS100), à 1000ng/ml (LPS1000) ou non stimulées. En orange, cellules ayant été traitées avec de l'oxPAPc, en violet cellules non traitées.

### **3. Le nickel stimulerait la dimérisation de TLR4 indépendamment de MD2.**

Une équipe de chercheur a mis en évidence la formation de dimères de TLR4 par co-immunoprécipitation en stimulant les cellules avec une solution contenant du nickel. Ils ont même montré que ce mécanisme était indépendant de MD2 (Raghavan et al. 2012). Comme la stimulation au LPS dans les expériences précédentes ne nous a pas permis de conclure, nous avons décidé d'utiliser un autre stimulus de la dimérisation décrit dans la littérature. Nous avons également voulu essayer un nouveau tampon de lyse contenant du glucose et du glycérol qui permettrait une meilleure stabilisation des interactions protéine-protéine et permettrait donc une meilleure visualisation des dimères sur le western blot.

Les cellules étaient cultivées en boîte de 100mm de diamètre, dans un milieu sans antibiotiques, puis transfectées par les plasmides TLR4-HA et TLR4-Flag ou par les plasmides TLR4-HA, TLR4-Flag et MD2 ou par TLR4-Flag seul. Ensuite, les cellules ont été stimulées avec une solution de nickel ou de LPS. Les cellules ont été lysées avec le tampon glucoside ou E1A 1X et l'immunoprécipitation est réalisée avec les anticorps monoclonaux anti-HA. On cherche toujours à détecter Flag par immunoblotting. On n'observe pas de différence d'intensité entre les cellules qui n'ont pas été stimulées et celles stimulées avec du nickel. Donc l'utilisation du nickel ne semble pas avoir augmenté la quantité de dimères de TLR4 sur les membranes des cellules. En ce qui concerne les cellules qui ont été lysées avec le tampon glucoside et transfectée avec trois plasmides, on n'observe quasiment pas les bandes à 120 kDa. Le tampon glucoside n'a pas permis une meilleure visualisation des dimères.

De plus, on n'observe pas d'augmentation d'épaisseur de la bande protéique sur les cellules qui ont été transfectées avec le plasmide permettant l'expression du co-récepteur MD2 et stimulées avec le LPS comme on aurait pu s'y attendre (Figure 24).



**Figure 24 : Effet de la stimulation au nickel et de la stimulation au LPS sur la quantité de dimères de TLR4 présents sur les membranes des cellules.** Western blot réalisé avec un gel polyacrylamide 7%. Cellules transfectées TLR4-HA et TLR4-Flag, TLR4-Flag seul, ou TLR4-HA, -Flag et MD2. Cellules traitées avec une solution de nickel ou avec du LPS ou non traitées. Cellules lysées avec le tampon E1A 1X ou le tampon glucoside. Immunoprécipitation de HA avec l'anticorps monoclonal anti-HA et tampon de lavage E1A 500. Les membranes cellulaires sont incubées avec l'anticorps primaire anti-Flag.

Nous avons donc réussi avec le tampon de lyse E1A1X à co-immunoprécipiter TLR4-Flag mais nous n'avons pas réussi à observer une augmentation d'intensité des bandes protéiques lorsque les cellules ont été traitées avec le LPS. Nous avons donc décidé d'utiliser le même tampon de lyse utilisé dans l'étude de (Raghavan et al. 2012). Dans cette étude ils ont réussi à co-immunoprécipiter TLR4-Flag et à montrer une augmentation de l'intensité des bandes protéiques lors de stimulation avec du LPS, du nickel ou du cobalt. Nous n'avons non seulement pas observé de modification de l'intensité des bandes protéiques mais nous n'avons même pas réussi à co-immunoprécipité TLR4-Flag.

Ainsi, nous n'avons pas réussi, avec la technique de co-immunoprécipitation, à mettre en évidence une modification de la quantité des dimères de TLR4 à la surface des cellules dans des conditions stimulatrices ou inhibitrices.

### **C. Détection des dimères par FRET.**

Afin de tester une autre technique permettant de mettre en évidence les dimères TLR4, nous avons réalisé des expériences de FRET. Ces expériences ont été réalisées avec des macrophages immortalisés de souris qui expriment des niveaux physiologiques de TLR4 non marqués par une étiquette. Ces cellules sont utilisées car elles permettent la détection des dimères de TLR4 dans des conditions plus proche de la réalité puisque les macrophages sont des cellules de l'immunité sur lesquelles sont naturellement présents les TLR4.

Les macrophages de souris ont été mis en culture dans des boîtes de bactériologie, dans leur milieu de culture. Nous avons essayé de détecter les dimères en mesurant le FRET par cytométrie de flux. Lors de la première expérience nous avons vérifié qu'il était possible de détecter un signal de fluorescence en ajoutant l'anticorps anti-TLR4 Alexa Fluor 488 sur les récepteurs TLR4. En réglant le laser incident du cytomètre de flux sur le spectre d'excitation de l'anticorps (488 nm-495nm), l'appareil a correctement détecté l'émission d'énergie du fluorophore à 519 nanomètre. Le protocole de marquage et de détection du TLR4 par cytométrie de flux est donc fonctionnel.

Pour pouvoir interpréter un signal FRET, il faut avoir la fluorescence du donneur seul. Cependant, si l'on mesure le signal avec des cellules n'ayant que le fluorochrome donneur puis que l'on mesure le signal avec des cellules mises en contact avec deux fluorochromes on obtient une diminution de la fluorescence du donneur artificielle. En effet, en considérant que la répartition des anticorps est équivalente, lorsque l'on met les cellules en contact avec deux anticorps 50% des récepteurs possèdent le fluorochrome donneur et 50% l'accepteur. Ainsi, on obtiendrait une diminution de moitié de la fluorescence du donneur qui n'aurait rien à voir avec un signal FRET.

Pour s'affranchir de ce biais, nous avons pour la condition « donneur seul », ajouté avec l'anticorps anti-TLR4-Alexa Fluor 488, l'anticorps anti-TLR4-biotine qui va se fixer sur les récepteurs TLR4 équitablement (50% le donneur - 50% la biotine) La biotine n'est pas fluorescente, on obtient donc dans cette condition la fluorescence du donneur seul. Puis, sur une autre condition il est possible de fixer un autre fluorochrome ou un « quencher » (ou agent d'extinction) sur la biotine (Figure

25). Le « quencher » à l'inverse du fluorochrome qui émet de l'énergie lorsqu'il est excité va absorber l'énergie émise. Ainsi, il y a FRET lorsque la fluorescence du donneur seul est plus élevée que celle avec le donneur et le « quencher ».

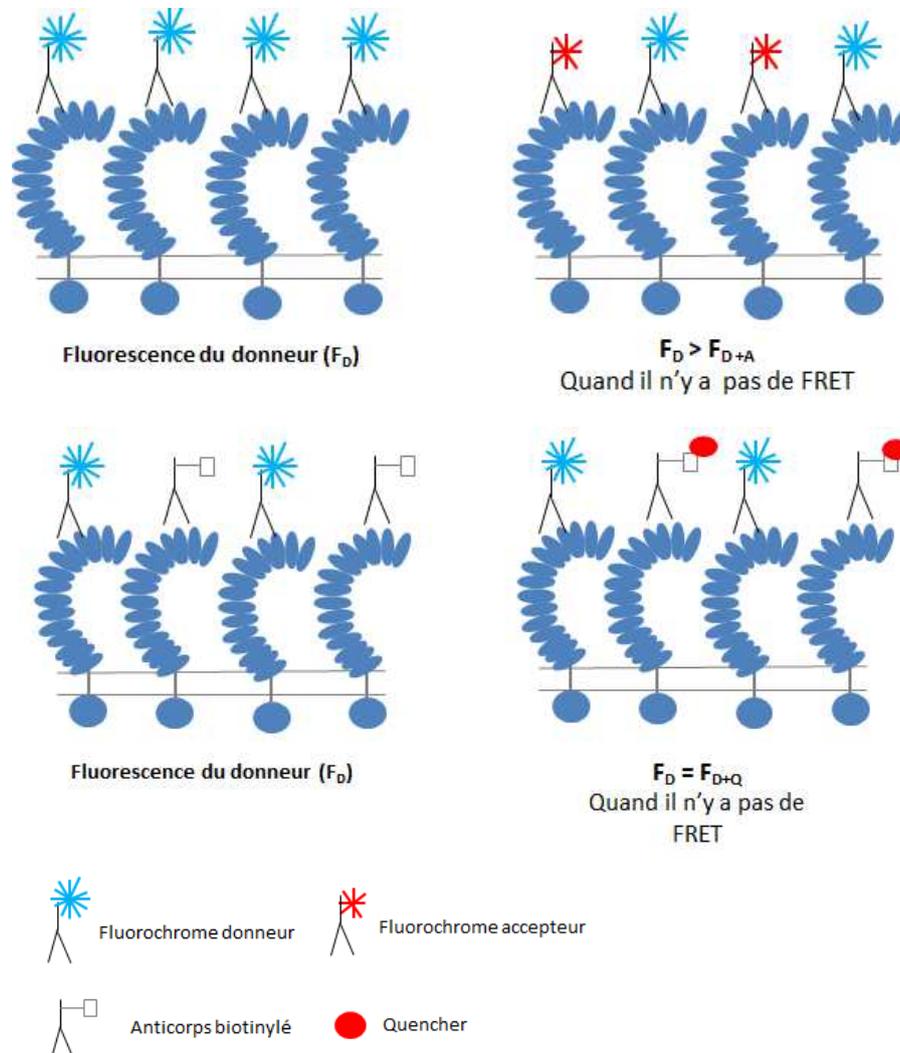
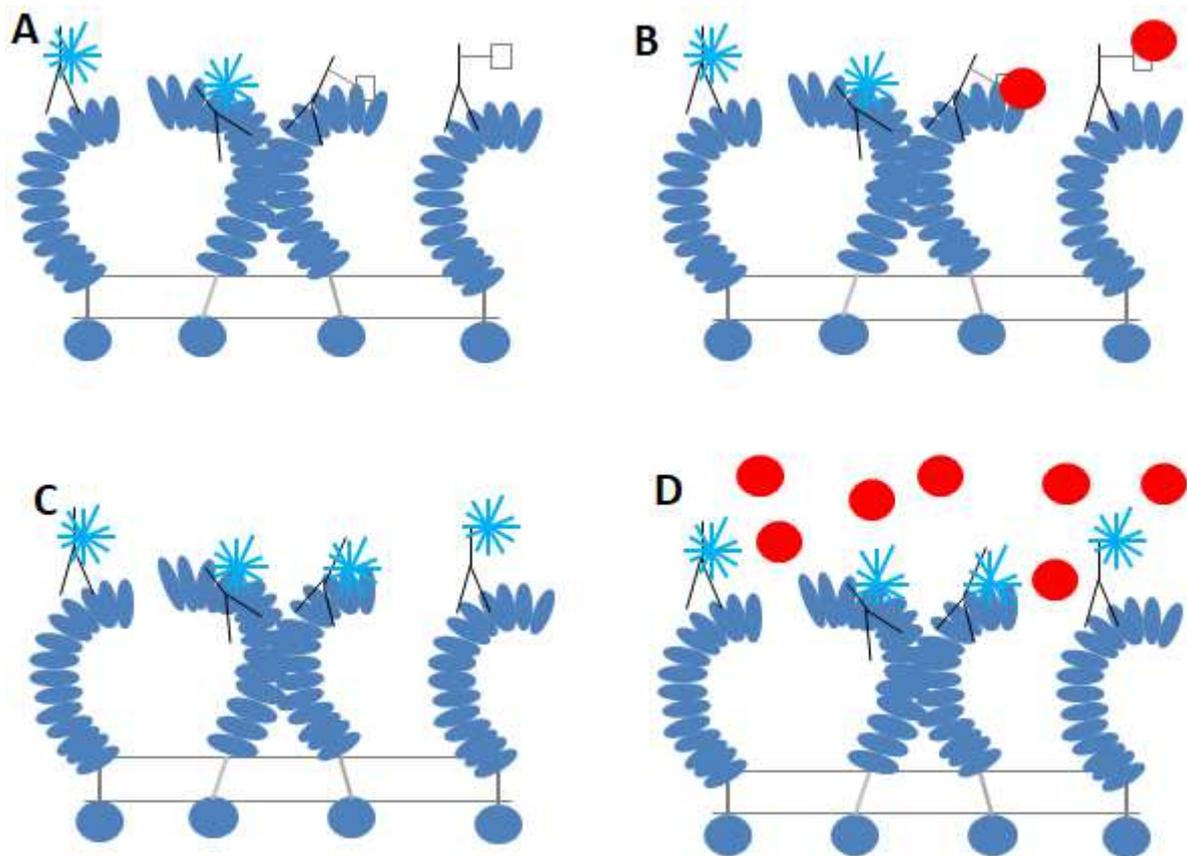


Figure 25 : Schéma représentant l'intérêt d'utiliser un anticorps biotinylé pour s'affranchir des biais.

Nous avons donc soumis les macrophages à quatre conditions différentes :

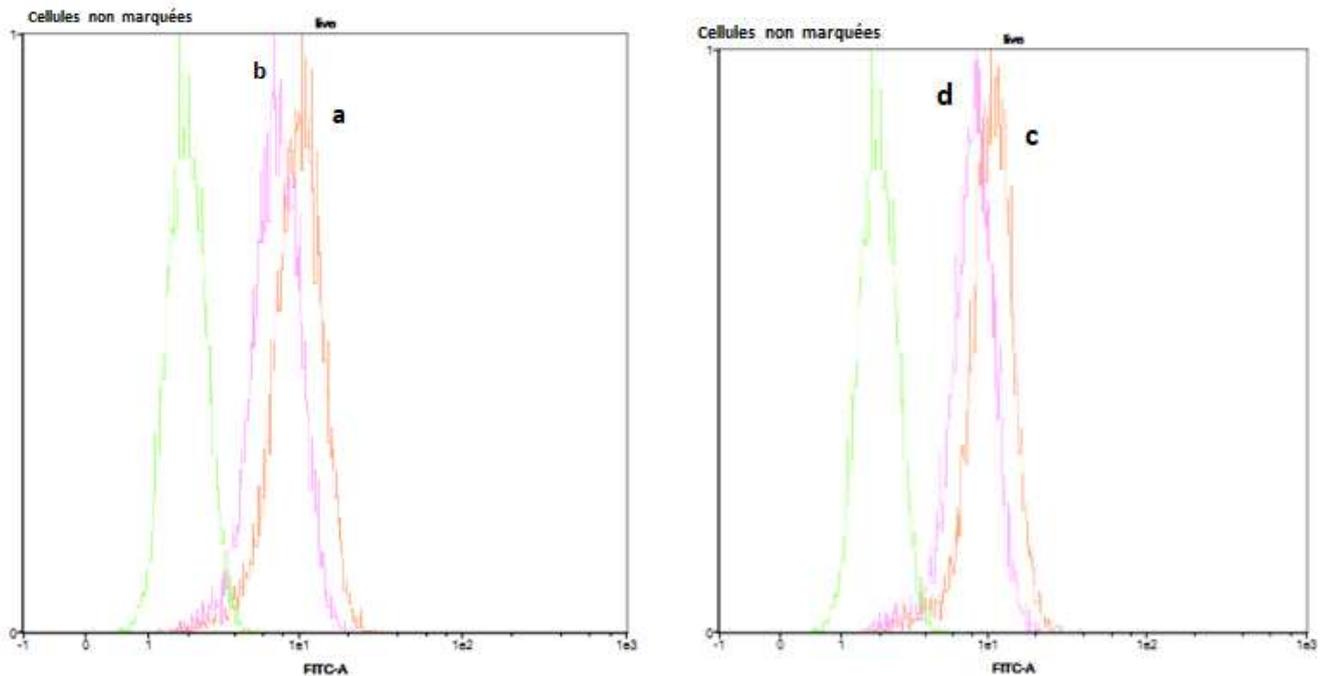
- Les cellules étaient incubées avec l'anticorps donneur et l'anticorps biotinylé.
- Les cellules étaient incubées avec l'anticorps donneur et l'anticorps biotinylé, puis incubées avec le réactif Streptavidine-ATTO-Q 514 (« quencher ») qui s'est fixé sur l'anticorps biotinylé.
- Les cellules étaient incubées avec l'anticorps donneur seul
- Les cellules étaient incubées avec l'anticorps donneur seul et le « quencher » AttoQ a été rajouté dans la solution juste avant de faire la mesure (Figure 26).



**Figure 26 : Schéma représentant les différentes conditions de l'expérience FRET.** Les cellules macrophages sont lavées avec le tampon FACS puis fixées avec du au paraformaldéhyde. **A/** Cellules marquées avec l'anticorps anti-TLR4-Alexa fluor 488 au  $\frac{1}{2}$  et l'anticorps anti-TLR4-biotine au  $\frac{1}{20}$ . **B/** Cellules marquées avec l'anticorps anti-TLR4-Alexa Fluor 488 au  $\frac{1}{2}$  l'anticorps anti-TLR4-biotine au  $\frac{1}{20}$  puis marquage avec Streptavidine-ATTO-Q 514 au  $\frac{1}{200}$ . **C/** Cellules marquées avec l'anticorps anti-TLR4-Alexa fluor au  $\frac{1}{2}$  seul. **D/** Cellules marquées avec l'anticorps anti-TLR4-Alexa fluor au  $\frac{1}{2}$  seul et le « quencher » AttoQ est rajouté en solution.

Sur les graphiques effectués par le cytomètre de flux on peut observer une nette différence entre les deux pics de fluorescence des cellules non marquées et des cellules marquées avec l'anticorps anti-TLR4-Alexa Fluor 488. De plus, on observe une différence entre le pic des cellules ne possédant que l'anticorps donneur et celles possédant le donneur et le réactif Streptavidine ATTO-Q 514 fixé sur l'anticorps biotinylé. Nous pourrions conclure que l'on observe du FRET. Cependant, on observe la même différence entre le pic de fluorescence des cellules marquées avec l'anticorps anti-TLR4-Alexa Fluor 488 et le pic de celles auquel a été rajouté le « quencher » AttoQ directement en solution et non fixé sur l'anticorps biotinylé (Figure 27). Ainsi, la différence observée n'est probablement pas du FRET mais due à une diminution du signal Alexa Fluor indépendante du FRET.

Nous n'avons donc pas réussi à mettre en évidence la présence de dimères préformés inactifs au sein des macrophages de souris par la technique du FRET.



**Figure 27 : Graphiques de fluorescence mesurée par cytométrie de flux.** Les cellules macrophages sont lavées avec le tampon FACS puis fixées avec du paraformaldéhyde. Cellules marquées avec l'anticorps anti-TLR4-Alexa fluor 488 au  $\frac{1}{2}$  et l'anticorps biotinylé au  $\frac{1}{20}$  (**a**), ou marquées avec l'anticorps anti-TLR4-Alexa Fluor 488 au  $\frac{1}{2}$  la biotine au  $\frac{1}{20}$  puis marquage avec le réactif Streptavidine ATTO-Q 514 au  $\frac{1}{200}$  (**b**), ou marquées avec l'anticorps anti-TLR4-Alexa Fluor 488 au  $\frac{1}{2}$  seul (**c,d**). L'attoQ est rajouté en solution dans la condition **d**.

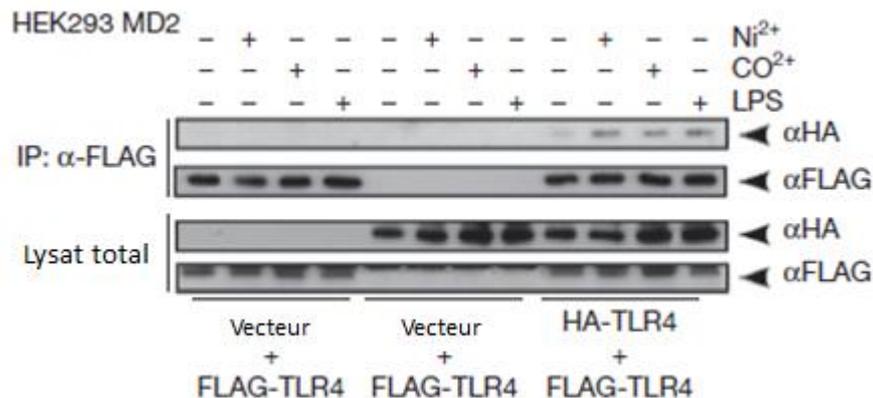
### III. Discussion

L'un des objectifs de notre étude était de développer des méthodes d'analyse nous permettant de détecter la présence de dimères préformés au niveau des membranes des cellules exprimant le TLR4. Nous avons réussi avec la technique de co-immunoprécipitation à mettre en évidence l'interaction entre les deux protéines transmembranaires. Nous ne sommes en revanche pas parvenus à montrer que dans des conditions stimulantes (LPS) ou inhibitrices (oxPAPC) la quantité de dimères au sein de la membrane lipidique augmente ou diminue. Plusieurs éléments peuvent expliquer pourquoi nous n'avons pas réussi à visualiser sur le western blot de différences d'intensité entre les bandes protéiques des cellules stimulées avec LPS ou stimulées avec oxPAPC.

Nous avons dans un premier temps voulu traiter au LPS des cellules ne possédant pas le co-récepteur MD2. Or, la dimérisation et l'activation du TLR4 par le LPS est dépendante de MD2. Cependant, nous savions également que lorsque le LPS est utilisé à forte concentration la dimérisation du récepteur est possible. De plus, nous voulions montrer que l'effet de l'oxPAPC sur la dimérisation était indépendant de MD2. Même si nous avons réussi une fois à observer une augmentation de la quantité de dimère lorsque les cellules étaient traitées au LPS nous ne l'avons pas retrouvé par la suite. Nous avons donc réalisé les mêmes expériences en rajoutant le co-récepteur MD2 au sein des cellules (résultats non présentés). Nous n'avons pas observé d'augmentation de la quantité de dimères dans ces conditions-là.

Les interactions entre les monomères formant le dimère ne sont pas covalentes, elles sont donc difficile à mettre en évidence. La composition du tampon de lyse peut avoir une influence sur les liaisons entre deux protéines. Le tampon E1A 1X nous a permis de détecter les dimères mais ne nous a permis d'observer une augmentation de ces derniers qu'une seule fois. Nous avons donc décidé de changer le tampon de lyse en utilisant un tampon contenant un dérivé du glucose appelé tampon glucoside. En effet, le glucose permettrait une meilleure stabilisation des interactions entre les protéines. Nous avons utilisé le même tampon qui avait été utilisé dans une étude mettant en évidence l'influence du nickel, du cobalt et du LPS sur la quantité de dimères de TLR4 au sein des membranes (Raghavan et al. 2012). Dans cette étude, les chercheurs ont observé une augmentation d'intensité des

bandes protéiques sur le western blot lorsque les cellules étaient stimulées avec le nickel, le cobalt ou le LPS par rapport aux cellules qui n'étaient pas stimulées (Figure 28). Dans notre étude, le tampon contenant du glucose ne nous a pas permis de voir un effet de LPS ou d'oxPAPC sur la quantité de dimère. La détection des dimères sans traitement était également moins bonne. Nous n'arrivons pas à expliquer pourquoi nous n'avons pas réussi à observer les mêmes résultats qu'eux.



**Figure 28 : Exemple de co-immunoprécipitation suite à différents traitements sur le TLR4.** Western blot tiré de Raghavan et al. (2012). Les cellules étaient transfectées avec des plasmides TLR4-HA et TLR4-Flag puis stimulées avec du nickel, du cobalt ou du LPS pendant 30 minutes (Raghavan et al. 2012).

Il était essentiel pour nous d'avoir une méthode robuste nous permettant de voir une augmentation de la quantité des dimères à la surface des cellules lorsqu'ils étaient stimulés par leur ligand naturel le LPS pour pouvoir réaliser notre étude sur les lipides et notamment l'oxPAPC. C'est pour cela que cette approche n'a pas été poursuivie.

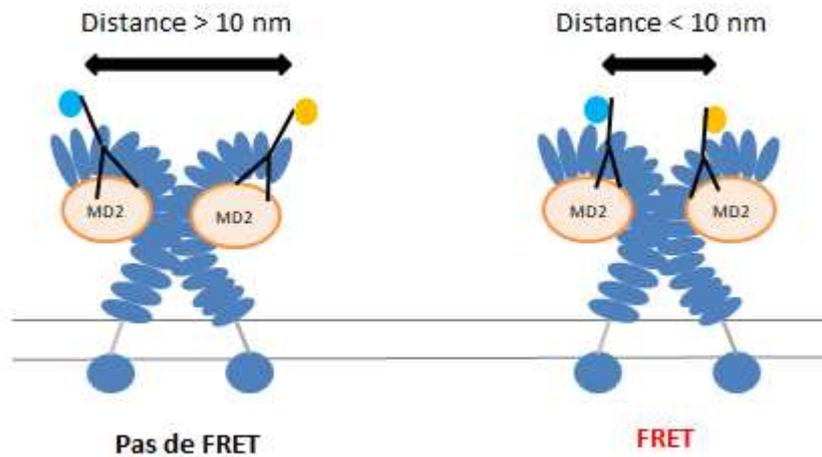
Nous aurions pu essayer, si nous avions eu le temps, d'utiliser la technique de « cross-linking ». Cette méthode a l'avantage de permettre l'étude d'interactions fugaces entre deux protéines comme dans le cas de la dimérisation. Cependant, il est possible d'obtenir des interactions non spécifiques en utilisant un « cross-linker » ce qui s'observera sur le western blot par la présence de nombreux artefacts.

Pour les techniques de co-immunoprécipitation et de « cross-linking », nous sommes obligés d'utiliser des protéines marquées par une étiquette. Nous avons donc dû pour cela utiliser des plasmides qui sur-expriment le récepteur TLR4 à la surface des cellules. La surexpression des TLR4 au sein des cellules induit leur dimérisation sans la présence d'un ligand (Lee et al. 2004). On aurait alors à la surface des cellules transfectées tous les récepteurs sous forme dimérisé. Cette information pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas pu observer

d'augmentation de la quantité de dimère lorsque les cellules étaient stimulées au LPS. Mais cela n'explique pas pourquoi nous n'avons pas pu observer un effet de l'oxPAPC. Il était donc intéressant d'utiliser une technique qui nous permettait d'étudier la dimérisation du TLR4 dans des conditions physiologiques.

La plupart des études qui étudient la dimérisation du récepteur observe non pas le dimère directement mais la conséquence de la dimérisation. Lorsque le TLR4 est sous forme dimérisée active, il est ensuite endocyté dans la cellule. Une étude a par exemple observé le pourcentage de TLR4 à la surface des cellules stimulées par le LPS en fonction du temps, en marquant les cellules exprimant physiologiquement le récepteur par FACS et en utilisant la cytométrie en flux (Zanoni et al. 2011). Cette étude n'observe donc pas la dimérisation du récepteur mais l'endocytose de ce dernier suite à sa dimérisation. Cependant, le FRET semble une bonne technique pour observer les dimères de TLR4 exprimés de manière physiologique à la surface des cellules.

Pour les expériences de FRET, nous avons utilisé des cellules macrophages de souris qui expriment naturellement le récepteur TLR4 avec le co-récepteur MD2. Dans ces conditions, nous espérons mettre en évidence la présence de dimères préformés inactifs de TLR4. Nous ne sommes malheureusement pas parvenus à détecter un signal de FRET, ce qui ne veut pas forcément dire que les dimères préformés n'étaient pas présent au sein des cellules. Les anticorps que nous avons utilisés pour le marquage font entre 10 et 15 nanomètres. Or, pour qu'il y ait un signal FRET il ne faut pas que la distance physique entre les deux anticorps portant le fluorochrome excède 10 nanomètres. On peut imaginer alors que si les anticorps ne se fixent pas sur les protéines dans une certaine conformation il est possible de ne pas observer de FRET (Figure 29).



**Figure 29 : Schéma représentant les fixations possibles des anticorps et la répercussion sur la détection de FRET ou non.**

Il est également possible que la quantité de dimères préformés à la surface des cellules n'était pas suffisante pour détecter du FRET. Il aurait été intéressant d'essayer ce protocole en augmentant l'expression des TLR4 à la surface des cellules en stimulant les macrophages avec l'interféron gamma. On aurait également pu forcer la dimérisation des TLR4 en les sur-exprimant pour obtenir un contrôle positif et adapter le protocole. Ces deux méthodes auraient donc normalement permis d'augmenter la quantité de dimères de TLR4 à la surface des cellules. Nous n'avons malheureusement pas eu le temps nécessaire pour explorer ces idées et établir un protocole de détection des dimères avec la technique de FRET.

La dimérisation est un phénomène intéressant et important pour la régulation de la réponse inflammatoire. Etudier les effets de molécules sur la dimérisation du récepteur est compliqué car de nos jours, aucune étude expérimentale n'a permis d'étudier l'organisation complète de la structure du récepteur sous forme dimérisée (domaine extracellulaire, transmembranaire, intracellulaire) dans une structure physiologique. Or, pour comprendre les mécanismes intervenants sur la régulation de la dimérisation du récepteur c'est important. A l'heure actuelle, seuls des modélisations moléculaires informatiques de dimères construits au sein d'une membrane composée de lipides tendant à refléter les conditions physiologiques sont étudiées. Les résultats observés donnent des renseignements de plus en plus précis sur les changements de conformation et les interactions entre les trois domaines du TLR4. Ils ont notamment montré que les interactions protéine-protéine et lipide-protéine entre le domaine transmembranaire et le domaine intracellulaire sont cruciaux pour moduler la réponse du récepteur (Patra et al. 2018). Cependant, ces

modèles restent informatiques et l'on peut se demander si les conclusions tirées de ces modélisations peuvent s'appliquer sur des modèles biologiques.



## CONCLUSION

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, plus de 650 millions de personnes étaient obèses en 2016. L'obésité qui se traduit par un taux élevés de lipides circulants est associée à de nombreuses maladies comme le diabète de type 2, l'athérosclérose et autres maladies cardiovasculaires, la stéatose hépatique et même certains cancers. Les lipides de l'hôte sont reconnus de nos jours pour moduler la signalisation inflammatoire dépendant de récepteurs comme le TLR4. Ce sont les molécules de l'inflammation qui seraient en partie responsable de la formation des maladies associées à l'obésité. Ainsi, les mécanismes par lesquels les lipides activent ou inhibent le récepteur TLR4 sont très étudiés et les hypothèses émises par les scientifiques font débat.

Nous avons supposé que les lipides de l'hôte pourraient moduler la dimérisation du TLR4 en s'intégrant dans la membrane plasmique et ainsi moduler sa signalisation. Pour cela, nous avons développé des méthodes nous permettant de détecter les dimères de TLR4. Nous avons réussi avec la co-immunoprécipitation à détecter les homodimères de TLR4 à la surface des cellules. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à montrer qu'une stimulation du récepteur avec du LPS ou de l'oxPAPC modifiait le pourcentage de dimères à la surface des cellules ce qui était notre hypothèse. Pour pouvoir réaliser de l'immunoprécipitation nous avons dû marquer le récepteur avec une étiquette reconnaissable ce qui nous a conduit à utiliser des cellules dans lesquels le récepteurs était sur-exprimé. Nous avons donc par la suite tenté de développer une méthode nous permettant de détecter les dimères préformés inactifs des TLR4 dans des cellules où ils sont exprimés physiologiquement. Nous avons pour cela utilisé la technique de FRET sur des macrophages de souris, nous n'avons cependant pas réussi à mettre en évidence la présence de dimères préformés stables à la surface de ces cellules.

L'étude de la dimérisation ainsi que les effets des lipides sur cette dernière est compliquée. De nos jours il n'existe aucune étude expérimentale ayant permis d'étudier la structure complète du récepteur TLR4 et de sa forme dimérisée. Il existe seulement des modélisations informatiques et les conclusions tirées de ces modélisations doivent être vérifiées dans un modèle biologique sur cellules vivantes.

**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 **Manon RAHIER** intitulée « **Développement de méthodes d'analyses de la dimérisation du récepteur TLR4** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.



**Fait à Toulouse, le novembre 2018**  
**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 Christophe PASQUIER**



**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

Mlle Manon RAHIER  
a été admis(e) sur concours en : 2013  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 04/07/2017  
a validé son année d'approfondissement le : 11/10/2018  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

## 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*. Février 2006. Vol. 124, n° 4, pp. 783-801.

BANNING Carina, VOTTELER Jörg, HOFFMANN Dirk, KOPPENSTEINER Herwig, WARMER Martin, REIMER Rudolph, KIRCHHOFF Frank, SCHUBERT Ulrich, HAUBER Joachim et SCHINDLER Michael, 2010. A Flow Cytometry-Based FRET Assay to Identify and Analyse Protein-Protein Interactions in Living Cells. *PLOS ONE*. 22 février 2010. Vol. 5, n° 2, pp. e9344.

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*. Septembre 2002. Vol. 419, n° 6902, pp. 77-81.

BRYANT Clare E., GAY Nick J., HEYMANS Stephane, SACRE Sandra, SCHAEFER Liliana et MIDWOOD Kim S., 2015. Advances in Toll-like receptor biology: Modes of activation by diverse stimuli. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 3 septembre 2015. Vol. 50, n° 5, pp. 359-379.

COSKUN U., GRZYBEK M., DRECHSEL D. et SIMONS K., 2011. Regulation of human EGF receptor by lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 31 mai 2011. Vol. 108, n° 22, pp. 9044-9048.

*Crosslinking Reagents Technical Handbook*, 2012. [en ligne]. Thermo Fisher Scientific. [Consulté le 28 août 2018]. Disponible à l'adresse : <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602163-Crosslinking-Reagents-Handbook.pdf>

ELLULU Mohammed S., PATIMAH Ismail, KHAZA'AI Huzwah, RAHMAT Asmah et ABED Yehia, 2017. Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Archives of Medical Science*. 2017. Vol. 4, pp. 851-863.

ERRIDGE Clett, KENNEDY Simon, SPICKETT Corinne M. et WEBB David 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.

FAN Yang-Yi, LY Lan H., BARHOUMI Rola, MCMURRAY David N. et CHAPKIN Robert S., 2004. Dietary docosahexaenoic acid suppresses T cell protein kinase C

theta lipid raft recruitment and IL-2 production. *Journal of Immunology*. 15 novembre 2004. Vol. 173, n° 10, pp. 6151-6160.

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

GANGULY Dipyaman, CHAMILOS Georgios, LANDE Roberto, GREGORIO Josh, MELLER Stephan, FACCHINETTI Valeria, HOMEY Bernhard, BARRAT Franck J., ZAL Tomasz et GILLIET Michel, 2009. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *The Journal of Experimental Medicine*. 31 août 2009. Vol. 206, n° 9, pp. 1983-1994.

GAO Dong et LI Wang, 2017. Structures and recognition modes of toll-like receptors. *Proteins*. 2017. Vol. 85, n° 1, pp. 3-9.

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*. Août 2014. Vol. 14, n° 8, pp. 546-558.

GIJSBERS Abril, NISHIGAKI Takuya et SÁNCHEZ-PUIG Nuria, 2016. Fluorescence Anisotropy as a Tool to Study Protein-protein Interactions. *Journal of Visualized Experiments*. 21 octobre 2016. N° 116, pp 1-9.

GONDOKARYONO Srie Prihianti, USHIO Hiroko, NIYONSABA François, HARA Mutsuko, TAKENAKA Hiroshi, JAYAWARDANA Sumanasiri T. M., IKEDA Shigaku, OKUMURA Ko et OGAWA Hideoki, 2007. The extra domain A of fibronectin stimulates murine mast cells via Toll-like receptor 4. *Journal of Leukocyte Biology*. septembre 2007. Vol. 82, n° 3, pp. 657-665.

GRADINARU Claudiu C., MARUSHCHAK Denys O., SAMIM Masood et KRULL Ulrich J., 2010. Fluorescence anisotropy: from single molecules to live cells. *Analyst*. 22 février 2010. Vol. 135, n° 3, pp. 452-459.

HANSSON Göran K., 2005. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine*. 21 avril 2005. Vol. 352, n° 16, pp. 1685-1695.

HWANG Daniel H., KIM Jeong-A. et LEE Joo Young, 2016. Mechanisms for the activation of Toll-like receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosahexaenoic acid. *European Journal of Pharmacology*. Août 2016. Vol. 785, pp. 24-35.

ILLÁN-GÓMEZ Fátima, GONZÁLVEZ-ORTEGA Manuel, OREA-SOLER Isabel, ALCARAZ-TAFALLA Ma Soledad, ARAGÓN-ALONSO Aurora, PASCUAL-DÍAZ Mercedes, PÉREZ-PAREDES Matías et LOZANO-ALMELA Ma Luisa, 2012. Obesity and inflammation: change in adiponectin, C-reactive protein, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 after bariatric surgery. *Obesity Surgery*. Juin 2012. Vol. 22, n° 6, pp. 950-955.

KARGAS Vasileios, MARZINEK Jan K., HOLDBROOK Daniel A., YIN Hang, FORD Robert C. et BOND Peter J., 2017. A polar SxxS motif drives assembly of the transmembrane domains of Toll-like receptor 4. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. Octobre 2017. Vol. 1859, n° 10, pp. 2086-2095.

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.

KÖNNER AC. 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.

KOVACS Erika, ZORN Julie Anne, HUANG Yongjian, BARROS Tiago et KURIYAN John, 2015. A structural perspective on the regulation of the epidermal growth factor receptor. *Annual Review of Biochemistry*. 2015. Vol. 84, pp. 739-764.

LANDE Roberto, GREGORIO Josh, FACCHINETTI Valeria, CHATTERJEE Bithi, WANG Yi-Hong, HOMEY Bernhard, CAO Wei, WANG Yui-Hsi, SU Bing, NESTLE Frank O., ZAL Tomasz, MELLMAN Ira, SCHRÖDER Jens-Michael, LIU Yong-Jun et GILLIET Michel, 2007. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*. 4 octobre 2007. Vol. 449, n° 7162, pp. 564-569.

LATZ Eicke, SCHOENEMEYER Annett, VISINTIN Alberto, FITZGERALD Katherine A., MONKS Brian G., KNETTER Cathrine F., LIEN Egil, NILSEN Nadra J., ESPEVIK Terje et GOLENBOCK Douglas T., 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature Immunology*. février 2004. Vol. 5, n° 2, pp. 190-198.

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 Joo Y., ZHAO Ling, YOUN Hyung S., WEATHERILL Amy R., TAPPING Richard, FENG Lili, LEE Won H., FITZGERALD Katherine A. et HWANG Daniel 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.

LI Hongbing, PANINA Svetlana, KAUR Amandeep, RUANO María J., SÁNCHEZ-GONZÁLEZ Pablo, LA COUR Jonas M., STEPHAN Alexander, OLESEN Uffe H., BERCHTOLD Martin W. et VILLALOBO Antonio, 2012. Regulation of the ligand-dependent activation of the epidermal growth factor receptor by calmodulin. *The Journal of Biological Chemistry*. 27 janvier 2012. Vol. 287, n° 5, pp. 3273-3281.

MAEDA Ryo, SATO Takeshi, OKAMOTO Kenji, YANAGAWA Masataka et SAKO Yasushi, 2018. Lipid-Protein Interplay in Dimerization of Juxtamembrane Domains of

Epidermal Growth Factor Receptor. *Biophysical Journal*. février 2018. Vol. 114, n° 4, pp. 893-903.

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.

MILLIEN Valentine Onger, LU Wen, SHAW Joanne, YUAN Xiaoyi, MAK Garbo, ROBERTS Luz, SONG Li-Zhen, KNIGHT J. Morgan, CREIGHTON Chad J., LUONG Amber, KHERADMAND Farrah et CORRY David B., 2013. Cleavage of fibrinogen by proteinases elicits allergic responses through Toll-like receptor 4. *Science (New York, N.Y.)*. 16 août 2013. Vol. 341, n° 6147, pp. 792-796.

MINANG J. T., ARESTRÖM I., TROYE-BLOMBERG M., LUNDEBERG L. et AHLBORG N., 2006. Nickel, cobalt, chromium, palladium and gold induce a mixed Th1- and Th2-type cytokine response in vitro in subjects with contact allergy to the respective metals. *Clinical and Experimental Immunology*. décembre 2006. Vol. 146, n° 3, pp. 417-426.

MORETH Kristin, FREY Helena, HUBO, Mario, ZENG-BROUWERS Jinyang, NASTASE Madalina-Viviana, HSIEH Louise Tzung-Harn, HACENI Riad, PFEILSCHIFTER Josef, IOZZO Renato V. et SCHAEFER Liliana, 2014. Biglycan-triggered TLR-2- and TLR-4-signaling exacerbates the pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Matrix Biology*. Avril 2014. Vol. 35, pp. 143-151.

MORIKI Takanori, MARUYAMA Hiroko et MARUYAMA Ichi N, 2001. Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain<sup>11</sup> Edited by B. Holland. *Journal of Molecular Biology*. Août 2001. Vol. 311, n° 5, pp. 1011-1026.

OH Da Young, TALUKDAR Saswata, BAE Eun Ju, IMAMURA Takeshi, MORINAGA Hidetaka, FAN WuQiang, LI Pingping, LU Wendell J., WATKINS Steven M. et OLEFSKY Jerrold M., 2010. GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell*. Septembre 2010. Vol. 142, n° 5, pp. 687-698.

OKAMURA Y., WATARI M., JERUD E. S., YOUNG D. W., ISHIZAKA S. T., ROSE J., CHOW J. C. et STRAUSS J. F., 2001. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *The Journal of Biological Chemistry*. 30 mars 2001. Vol. 276, n° 13, pp. 10229-10233.

PATEL Lisha, SUN Weiyong, GLASSON Sonya S, MORRIS Elisabeth A, FLANNERY Carl R et CHOCKALINGAM Priya S, 2011. Tenascin-C induces inflammatory mediators and matrix degradation in osteoarthritic cartilage. *BMC Musculoskeletal Disorders* [en ligne]. Décembre 2011. Vol. 12, n° 1. Disponible à l'adresse : <http://bmcmusculoskeletaldisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2474-12-164>

PATRA Mahesh Chandra, KWON Hyuk-Kwon, BATOOL Maria et CHOI Sangdun, 2018. Computational Insight Into the Structural Organization of Full-Length Toll-Like

Receptor 4 Dimer in a Model Phospholipid Bilayer. *Frontiers in Immunology* [en ligne]. 12 mars 2018. Disponible à l'adresse : [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5857566/Toll-like receptors](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5857566/Toll-like%20receptors)

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*. Décembre 2012. Vol. 13, n° 12, pp. 1109-1115.

SCHMIDT Marc, RAGHAVAN Badrinarayanan, MÜLLER Verena, VOGL Thomas, FEJER György, TCHAPCHET Sandrine, KECK Simone, KALIS Christoph, NIELSEN Peter J., GALANOS Chris, ROTH Johannes, SKERRA Arne, MARTIN Stefan F., FREUDENBERG Marina A. et GOEBELER Matthias, 2010. Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nature Immunology*. Septembre 2010. Vol. 11, n° 9, pp. 814-819.

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

STAIGER H., STAIGER K., STEFAN N., WAHL H. G., MACHICAO F., KELLERER M. et HARING H.-U., 2004. Palmitate-Induced Interleukin-6 Expression in Human Coronary Artery Endothelial Cells. *Diabetes*. 1 décembre 2004. Vol. 53, n° 12, pp. 3209-3216.

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.

TAN Xiaojun, LAMBERT Paul F., RAPRAEGER Alan C. et ANDERSON Richard A., 2016. Stress-Induced EGFR Trafficking: Mechanisms, Functions, and Therapeutic Implications. *Trends in Cell Biology*. 2016. Vol. 26, n° 5, pp. 352-366.

TANJI H., OHTO U., SHIBATA T., MIYAKE K. et SHIMIZU, T., 2013. Structural Reorganization of the Toll-Like Receptor 8 Dimer Induced by Agonistic Ligands. *Science*. 22 mars 2013. Vol. 339, n° 6126, pp. 1426-1429.

TOTH P. T., 2004. Regulation of CXCR4 Receptor Dimerization by the Chemokine SDF-1 and the HIV-1 Coat Protein gp120: A Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Study. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2 avril 2004. Vol. 310, n° 1, pp. 8-17.

TROMPETTE Aurelien, DIVANOVIC Senad, VISINTIN Alberto, BLANCHARD Carine, HEGDE Rashmi S., MADAN Rajat, THORNE Peter S., WILLS-KARP Marsha, GIOANNINI Theresa L., WEISS Jerry P. et KARP Christopher L., 2009. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature*. 29 janvier 2009. Vol. 457, n° 7229, pp. 585-588.

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.

VINKENBORG Jan L., EVERS Toon H., REULEN Sanne W. A., MEIJER E. W. et MERKX Maarten, 2007. Enhanced sensitivity of FRET-based protease sensors by redesign of the GFP dimerization interface. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*. 9 juillet 2007. Vol. 8, n° 10, pp. 1119-1121.

VOLMER R., VAN DER PLOEG K. et RON D., 2013. Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 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*. Juillet 2003. Vol. 23, pp. 1197-1203.

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*. 15 décembre 2003. Vol. 112, n° 12, pp. 1796-1808.

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.

ZANONI Ivan, OSTUNI Renato, MAREK Lorri R., BARRESI Simona, BARBALAT Roman, BARTON Gregory M., GRANUCCI Francesca et KAGAN Jonathan C., 2011. CD14 Controls the LPS-Induced Endocytosis of Toll-like Receptor 4. *Cell*. Novembre 2011. Vol. 147, n° 4, pp. 868-880.

ZANONI Ivan, TAN Yunhao, DI GIOIA Marco, SPRINGSTEAD James R. et KAGAN Jonathan C., 2017. By Capturing Inflammatory Lipids Released from Dying Cells, the Receptor CD14 Induces Inflammasome-Dependent Phagocyte Hyperactivation. *Immunity*. octobre 2017. Vol. 47, n° 4, pp. 697- 709.e3

**TOULOUSE, 2018**

**Nom : RAHIER**

**Prénom : Manon**

**TITRE** : Développement de méthodes d'analyse de la dimérisation du récepteur TLR4

**RESUME** : Le récepteur transmembranaire TLR4 est capable de se lier au LPS. La signalisation dépendant du TLR4 est un élément clé de la réponse immunitaire innée. La dimérisation du récepteur TLR4 est indispensable pour la signalisation qui permet la synthèse de molécules de l'inflammation. Les lipides de l'hôte sont aujourd'hui reconnus pour moduler la signalisation dépendant du TLR4. Nous avons émis l'hypothèse que les lipides de l'hôte pourraient moduler la dimérisation du TLR4 en s'intégrant dans la membrane plasmique et ainsi moduler sa signalisation. Dans ce travail, nous avons développé des méthodes nous permettant d'analyser la dimérisation du TLR4 et d'observer les effets des lipides sur ce mécanisme. Nous avons utilisé les techniques de co-immunoprécipitation et de FRET qui n'ont malheureusement pas permis de mettre en évidence une augmentation ou une diminution de la dimérisation en présence de LPS ou du lipide oxydé oxPAPC. Ce travail révèle qu'il est difficile d'étudier comment les lipides modulent la dimérisation du TLR4. Afin de l'étudier, il est nécessaire à l'heure actuelle d'avoir recours à des simulations réalisées à l'aide de modélisations informatiques.

**MOTS CLES**: TLR4, dimérisation, lipides, co-immunoprécipitation, FRET

**TITLE**: Development of analytic methods to study the dimerization of the TLR4 receptor.

**SUMMARY**: The transmembrane receptor TLR4 is able to bind to LPS. TLR4-dependent signalling is key to the innate immune response. Dimerization of TLR4 is critical to signalling leading to the synthesis of inflammatory molecules. Host lipids have been shown to modulate TLR4-dependent signalling. We hypothesized that plasma membrane integration of host lipids could modulate TLR4 dimerization and therefore TLR4-dependent signalling. In this work, we have developed experimental methods to measure TLR4 dimerization and the effects of lipids on this mechanism. We used co-immunoprecipitation and FRET techniques, which unfortunately did not provide evidence of an increase or decrease in TLR4 dimerization in the presence of LPS or in the presence of the oxidized lipid oxPAPC. This work underlines the difficulties in studying how lipids could modulate TLR4 dimerization. To study this, it is still necessary to rely on simulations based on bio-informatical modelling.

**KEYWORDS**: TLR4, dimerization, co-immunoprecipitation, FRET