

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

ÉTUDE DU RÔLE DE LA SNARE SEC22B DANS LA RÉPONSE PRO-INFLAMMTOIRE ET ANTIMICROBIENNE CHEZ LES CELLULES DENDRITIQUES

Par
Renaud Dion

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Immunologie et Virologie

Jury d'évaluation

Président du jury	Mme. Maritza Jaramillo Patino, Ph. D. INRS - Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie
Examineur externe	Mme. Tatiana Scorza, Ph. D. Université du Québec à Montréal
Directeur de recherche	M. Albert Descoteaux, Ph. D. INRS – Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier grandement mon directeur de recherche, le professeur Albert Descoteaux, de m'avoir permis d'intégrer son équipe et de m'avoir guidé professionnellement au long de mes études. Il a été d'une grande aide lors de mes recherches d'emplois et une de mes références lors de mes entretiens avec des employeurs potentiels. Grâce à cette référence, j'ai décroché un emploi et je suis très reconnaissant de la première impression qu'il a pu confirmer. Tout au long de ces 3 dernières années, je me suis épanoui et développé une confiance en mes capacités et mes raisonnements scientifiques grâce à cette équipe. À l'ensemble de mon jury pour avoir lu, corrigé et ajouté leur commentaire afin de hausser la qualité de mon mémoire.

Je tiens à souligner aussi toute l'importance que mes collègues ont pu apporter à mon développement psychologique et dans ma démarche scientifique. J'ai développé un œil critique et trouvé des pistes de solution à mes problèmes avec cette aide précieuse. Merci Christine pour nos conversations philosophiques, Guillermo pour ton mentorat ainsi que ta collaboration aux expériences et aux analyses, Pierre-André, Olivier, Kevin et Roman pour leur soutien moral et leur amitié sans limite. Carolina, Julien, Kevin le Français, Tamara, Felipe, Matthias, Hamlet, Alix, le petit Olivier et Annie pour leur écoute et leur aide au laboratoire Descoteaux, mais aussi à Aymeric pour sa collaboration aux analyses d'IMAGE Stream, Sasha, Akil, Mélina et Linh du laboratoire de Simona Stäger pour vos réponses à mes questionnements et de votre écoute. L'ambiance chaleureuse au laboratoire des Leishmaniacs et l'ouverture sur vos expériences de vie m'ont fait grandir sur tous les points. Toutes les joies et les peines, pour toutes les activités

et les sorties de laboratoire, en passant par le chalet et les congrès. Elles ont toutes été mémorables. Noot-Noot.

Je veux mentionner aussi le support au quotidien de ma famille et des nombreuses soirées passées à pratiquer mes nombreuses présentations orales tout au long de mes études. Tous les mots d'encouragements afin de me remettre sur pied furent d'une grande aide. Je ne peux pas exprimer comment tout l'amour que j'ai reçu tout au long de ma vie m'a permis d'être l'homme que je suis aujourd'hui et surtout à travers les changements de cette dernière année. Le pilier familial a été une base très solide. Je peux me compter très chanceux d'avoir une mère et un père attentionné et compréhensif qui continuerons de l'être pour les décennies à venir. Merci pour tout.

J'ai été physiquement absents ces dernières années pour la majorité de mes amis, mais cela ne m'a pas empêché de vous écrire par messagerie ou de vous appeler pour prendre de vos nouvelles. Mon sensei Mychel Brodeur fut aussi un grand ami et un modèle dans ma vie et je tenais à le remercier de m'avoir soutenu durant mon cheminement personnel au cours de ma maîtrise.

Ceci ne serait pas complet sans remercier ma copine Jennifer que j'adore tant. L'amour que j'éprouve pour celle qui à faire fondre mon cœur m'a donné tout l'espoir de croire que l'amour véritable existe encore. Pour tous ces mots d'encouragements et de support tout au long de cette période de stress intense, je te remercie de faire partie de ma vie et je souhaite bâtir une vie avec toi mon amour. Lika et Lavendi pour toujours. Merci à tous

RÉSUMÉ

Les cellules dendritiques sont au cœur de la reconnaissance des pathogènes lors d'une infection. Ces derniers ont développé la capacité de contrôler certaines signalisations clés afin de survivre dans l'hôte. Les SNAREs sont une cible de choix pour déréguler la sécrétion des médiateurs de l'inflammation et des molécules microbicides afin de survivre. Nous avons utilisé le lipopolysaccharide (LPS) comme inducteur de l'inflammation chez des lignées de cellules dendritiques déficientes en Sec22b (SH-ARN), une SNARE impliquée dans le transport vésiculaire. Une diminution dans la sécrétion de l'oxyde nitrique du TNF et d'IL-6 a été observée par ELISA. Par Western Blot et qPCR nous avons démontré que les niveaux protéiques et que les transcrits d'ARN totaux de iNOS étaient plus faibles dans les cellules dendritiques déficientes en Sec22b de même que les transcrit totaux de TNF et l'IL-6 par qPCR. Une investigation dans la signalisation des TLR avec une cinétique des MAPK nous a permis de déterminer l'inhibiteur du NFκB serait une des causes de cette baisse d'ARN. Pendant l'inflammation, de nombreux gènes sont régulés par plusieurs facteurs de transcription, par exemple NF-κB. La translocation au noyau de ce dernier a été évaluée par microscopie confocale et par Image Stream en présence de LPS. Nous avons observé qu'en absence de Sec22b, il y a une diminution de la translocation de NF-κB au noyau. Cet effet est en corrélation avec la diminution des transcrits totaux et donc de la production protéique d'iNOS, TNF et IL-6. Ensemble ces données démontrent un nouveau rôle pour la protéine Sec22b, soit la production et la sécrétion des médiateurs inflammatoires TNF, IL-6 et l'oxyde nitrique.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	V
LISTE DES ABRÉVIATIONS	IX
LISTE DES FIGURES	XI
SECTION 1 : REVUE DE LITTÉRATURE	15
LES MACROPHAGES	17
LES CELLULES DENDRITIQUES	18
CHAPITRE 1 : LES CYTOKINES	20
1.1 L'IL-1A ET L'IL-1B.....	22
1.2 LA SIGNALISATION DE L'IL-1	24
1.3 L'IL-6	25
1.4 LA SIGNALISATION D'IL-6.....	27
1.5 LE TNF	28
1.6 LA SIGNALISATION DU TNF.....	28
1.7 L'OXYDE NITRIQUE	31
1.8 LA RÉGULATION DE L'OXYDE NITRIQUE	32
CHAPITRE 2 : L'INFLAMMATION	34
2.1 LES TLRs	35
2.2 SIGNALISATION DES TLRs.....	36
2.3 PROCESSUS DE LA RÉPONSE INNÉE.....	38
CHAPITRE 3 : LES SNARES	41
3.1 TYPES DE SNARES	43
3.2 SEC22B.....	46
SECTION 2 : RÉSULTATS	49
PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS	51
MATÉRIEL ET MÉTHODES	52

4.1	CULTURE CELLULAIRE	52
4.1.1	RAW 264.7	52
4.1.2	JAWSII	52
4.2	RÉCOLTE DE LA MOELLE OSSEUSE	53
4.2.1	<i>Différenciation des macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMM)</i>	53
4.2.2	<i>Différenciation de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDC)</i>	54
4.3	ÉLECTROPHORÈSE ET WESTERN-BLOT	54
4.4	MICROSCOPIE CONFOCALE PAR IMMUNOFLUORESCENCE	56
4.5	IMAGERIE DE CYTOMÉTRIE EN FLUX	57
4.6	PRODUCTION DES LENTIVIRUS ET TRANSDUCTION SHARN KNOCKDOWN SEC22B	58
4.7	TRAITEMENT SIARN CONTRE SEC22B.....	58
4.8	ELISA (IL-6 ET TNF)	59
4.9	L'EXTRACTION D'ARN, RT-PCR ET QPCR.....	59
4.10	STIMULATION AU LPS OU AGONISTE.....	61
4.11	STIMULATION AU LPS EN PRÉSENCE D'INHIBITEURS	61
4.12	QUANTIFICATION DE L'OXYDE NITRIQUE	61
	RÉSULTATS.....	63
	DISCUSSION	76
	CONCLUSION	81
	RÉFÉRENCES.....	83

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
AKT : Protéine kinase B
ANOVA : Analyse de la variance
AP1 : Protéine activatrice
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ATF : Activateur de facteur de transcription
B-actine : Beta-actine; isoforme de l'actine
BF : *Brightfield*
BMM : Macrophages dérivés de la moelle osseuse
BSA : L'albumine de sérum bovin
CAD : DNase activé par une caspase
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
COX-2 : Cyclooxygénase 2
CPA : Cellules présentatrices d'antigènes
CpG : Oligodéoxynucléotide CpG
CREB : cyclic AMP-responsive element-binding protein
DISC : *death-inducing signaling complex*
DMEM : *Dulbecco's modified Eagle medium*
ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*
ERK : *Extracellular signal-regulated kinase; a MAP kinase*
ERGIC : Compartiment intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et le Golgi
HEK 293T : Cellule embryonnaire du rein humain avec l'expression de l'antigène SV40 large T
JAWSII : Cellule dendritique de la souris, *mus musculus*
JNK : *c-Jun N-terminal kinase; a MAP kinase*
LCM : *L929 conditioned medium*
LPS : Lipopolysaccharide, lipoglycan
HBSS : *Hank's balanced salt solution*
HSP : *Heat shock proteins*
IFN- γ : Interféron Gamma
IL : Interleukine
IKK : kinase d'I κ B
I κ B : *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor*
iNOS : l'oxyde nitrique synthétase inductible
IRAK : kinase associée au récepteur IL-1

IRF1 : Facteur de régulation de l'interféron 1
MAL : protéine adaptatrice comme MYD88
MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*
MEK3/7 : *Mitogen-activated protein kinase kinase*
MYD88 : facteur de différenciation myéloïde 88
NF-κB : nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK : *Natural Killer*
NKT : *Natural killer T cell*
NLR : *NOD-like receptor*
NO : Oxyde nitrique
Sec22b : *Vesicle- trafficking protein Sec22b*
shARN : Petit ARN en épingle à cheveux (short-hairpin)
shARN-SCR/SCRA : Petit ARN en épingle à cheveux ciblant une séquence ne codant aucun gène
shARN-Sec22b : Petit ARN en épingle à cheveux ciblant le gène Sec22b
SNARE : *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*
SNAP-25 : *Synaptosomal nerve-associated protein 25*
STAT : Signal de transduction et activateur de la transcription
RAW 264.7 : Macrophages murin transformés avec le virus leucémique murin
RLR : *RIG like receptor*
RIP : Receptor-interacting protein kinases
p38 : *p38 mitogen-activated protein kinase*
PAMPs : *Pattern-associated molecular pattern*
PRR : *Pattern recognition receptor*
PCR : Réaction en chaîne par polymérase
RNS : *Reactive nitrogen species*
ROS : *Reactive oxygen species*
RT-PCR : Transcription inverse suivie par PCR
qPCR : Réaction en chaîne par polymérase quantitative
TBS : *Tris buffered saline*
TIR : Récepteur Toll/interleukine 1
TNF : Facteur de nécrose tumorale
TLR : *Toll-like receptor*
TRAF1/2 : Facteur 1/2 associé au récepteur de TNF
TRAM : *TRIF related-adaptator molecule*
TRIF : *domain-containing adaptor-inducing interferon-β*
SNAREs : *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor*
VAMP : *Vesicle Associated Membrane Protein*

Les termes en anglais et en latin sont en italiques. Ceux dans le texte sont entre parenthèse

LISTE DES FIGURES

Revue de littérature

- Figure 1.1 Les signaux métaboliques engendrant la polarisation des macrophages et leur effet métaboliques sur l'organisme** adapté de (S. K. Biswas *et al.*, 2012) page 19
- Figure 1.2 Voie de signalisation de l'IL-1** adapté de (Turner *et al.*, 2014) page 23
- Figure 1.3 Voie de signalisation du TNF** adapté de (Turner *et al.*, 2014) page 30
- Figure 1.4 Les voies de signalisation des différents TLR (*Toll like receptor*)** adapté de (O'Neill *et al.*, 2013) page 37
- Figure 1.5 Cinétique de la réaction immunitaire** adapté de (Julier *et al.*, 2017) page 39
- Figure 1.6 Type de sécrétion** adapté de (Stow *et al.*, 2013) page 42
- Figure 1.7 Complexe de fusion de SNARE** adapté de (Han *et al.*, 2017) page 45

Résultats

- Figure 2.1 L'inhibition du transport protéique diminue la production de l'oxyde nitrique dans les cellules dendritiques et dans les macrophages.** page 64
- Figure 2.2 La SNARE sec22b contrôle le niveau de production d'iNOS du TNF et d'IL-6** page 67
- Figure 2.3 L'absence de la SNARE sec22b module le niveau protéique et le niveau d'ARN messenger d'iNOS et des cytokines** page 69
- Figure 2.4 La régulation des MAPK au niveau protéique est perturbée par une diminution de la SNARE Sec22b** page 71
- Figure 2.5 La translocation de NF- κ B en contexte inflammatoire est diminuée en absence de Sec22b** page 73
- Figure 2.6 Le traitement siARN contre Sec22b diminue la production d'oxyde nitrique et diminue le niveau protéique d'iNOS** page 75

Liste des Tableaux

Revue de Littérature

Tableau 1.1 Famille de cytokines selon leur effet principal dans la réponse immunitaire
adaptée de (Turner *et al.*, 2014) page 21

Matériel et méthodes

Tableau 4.1 Listes des anticorps utilisés page 55

Tableau 4.2 Amorces pour les différents PCR ou qPCR page 59-60

SECTION 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

LES MACROPHAGES

Les macrophages, découverts par Elie Metchnikoff pour leur rôle de phagocytose (Tauber, 2003) ne sont pas les seuls phagocytes professionnels, il y a notamment les neutrophiles et les cellules dendritiques. Les macrophages protègent l'organisme des pathogènes en reconnaissant différents motifs à la surface des pathogènes (PAMP) ou le dommage des cellules intrinsèques (DAMP). Les récepteurs Toll-like (TLR) et les récepteurs C-lectin (CLR) sont des exemples de types de récepteurs liés à la membrane plasmique. En plus, il existe aussi des mécanismes de reconnaissance des motifs à l'intérieur de la cellule, utilisés après une phagocytose ou à la reconnaissance des virus. Ces récepteurs sont respectivement les récepteurs NOD-like (NLR) et les récepteurs RIG-I-like (RLR) (Takeuchi *et al.*, 2010). Les macrophages maintiennent aussi l'homéostasie de l'organisme en reconnaissant et en retirant les cellules apoptotiques et en réparant les tissus endommagés (Gordon *et al.*, 2017). Les récepteurs de cytokines sont primordiaux à leur surface pour recevoir différents signaux d'activation ou d'inhibition pour réguler leur métabolisme en M1 (voie classique) ou M2 (voie alternative) comme illustre la figure 1.1 afin de répondre convenablement au micro environnement et communiquer aux cellules avoisinantes un danger, un stress important, recruter des cellules professionnelles pour combattre les pathogènes, grâce aux cytokines et chimiokines qu'elles peuvent sécréter (Subhra K. Biswas *et al.*, 2010). Les macrophages peuvent lors d'une infection présenter des antigènes à leur surface comme les cellules dendritiques afin de stimuler les cellules T par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (S. K. Biswas *et al.*, 2012).

LES CELLULES DENDRITIQUES

Les cellules dendritiques proviennent des cellules hématopoïétiques comme toutes les cellules myéloïdes et les lymphocytes. Les cellules dendritiques relient le système immunitaire inné au système immunitaire adaptatif. Leur rôle primordial est de se rendre au site de l'infection pour phagocyter les microbes et présenter aux cellules T les peptides microbiens liés aux CMH I ou CMH II. De plus, une costimulation de leurs récepteurs avec les ligands des cellules T confirme l'activation de ces dernières pour une réponse adaptative efficace avec la sécrétion de cytokines régulant l'inflammation et en induisant l'apoptose des cellules T effectrices trop réactives (Qian *et al.*, 2018). Les cellules dendritiques ont aussi un rôle important dans la sécrétion du TNF et de l'oxyde nitrique contre des pathogènes comme *Listeria monocytogenes*, *Brucella melitensis*, *Leishmania major* et *Trypanosoma brucei* (Qian *et al.*, 2018). Les cellules dendritiques tout comme les macrophages ont des TLRs pour reconnaître les PAMPs et ensuite les phagocyter pour les présenter à leur surface (Collins *et al.*, 2015). Les cellules dendritiques peuvent ainsi présenter les antigènes aux T naïves afin des activés en Th1, Th2 ou T régulateur avec des signaux de costimulation, le CMH de classe II et des signaux sous formes solubles : les cytokines (Collins *et al.*, 2015). Ces dernières doivent être sécrétées par la machinerie de transport cellulaire commune à toutes les cellules. Ce transport est facilité par des protéines SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) médiant la fusion membranaire des différentes organelles comme le réticulum endoplasmique, le Golgi, la membrane plasmique et tous les compartiments dans le cytoplasme entre autres les endosomes, les lysosomes et les phagosomes (Collins *et al.*, 2015).

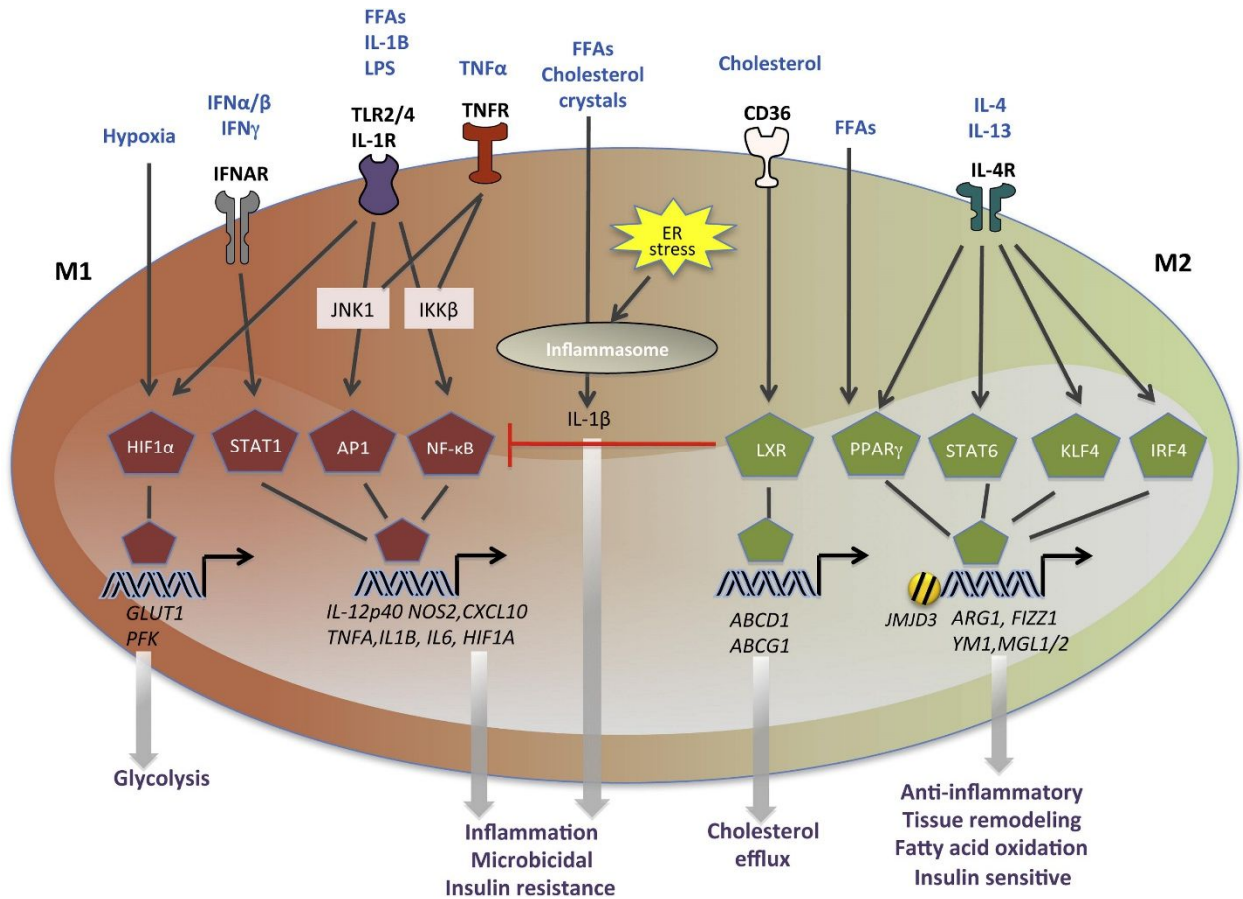


Figure 1.1 Les signaux métaboliques engendrant la polarisation des macrophages et leur effet métabolique sur l'organisme. L'interféron gamma et le LPS par leur récepteur IFNAR et le TLR4 respectivement activent les facteurs de transcription NF-κB via IKKβ, AP1, IRF3, STAT1 menant à une transcription des gènes M1. Par des signaux de danger endogènes, ceci cause un stress au réticulum endoplasmique menant à l'expression de la cytokine IL-1β via l'inflammasome. En opposition, les cytokines IL-4 et IL-13 par leur récepteur IL-4R activent STAT6, KLF4, IRF4 et PPARγ ainsi que l'histone JMJD3 vers la transcription de gènes M2 en inhibant ou régulant à la baisse entre autres l'inflammation. KLF4 : *Krupper-like factor 4*; PPARγ : *Peroxisome proliferator-activated receptor*; IRF3 : *Interferon Regulatory Factor 3*; JMJD3 : *histone demethylase Jumonji domain-containing 3*. Adapté de (S. K. Biswas et al., 2012)

CHAPITRE 1 : LES CYTOKINES

Les cytokines sont de petites protéines entre 5 et 20 kDa qui regroupent les chimiokines, les interleukines, les interférons, les facteurs de croissance transformants et les facteurs de nécrose tumorale (Turner *et al.*, 2014). Elles sont les principales molécules qui modulent les signaux intracellulaires qui peuvent être paracrines, endocrines, juxtacrines ou autocrines et sont des joueurs clés dans la régulation de la réponse immunitaire et la réponse inflammatoire (J. M. Zhang *et al.*, 2007). Étant donné que ces cytokines ont des effets à différent niveau dans une réponse immunitaire il est possible de les regrouper en trois catégories distinctes soit leur effets sur cellules de l'immunité adaptative, la régulation pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires (catégories énumérées dans le Tableau 1.1 (Turner *et al.*, 2014). Les membres clés de la famille produisant les cytokines pro-inflammatoires sont l'IL-1, l'IL-6 et le TNF nommé aussi TNF α (tableau 1.1)

Tableau 1.1 Famille de cytokines selon leur effet principal dans la réponse immunitaire

Famille	Membres	
Immunité adaptative	Common γ chain receptor ligands	IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21
	Common β chain (CD131) receptor ligands	IL-3, IL-5, GM-CSF
	Shared IL-2 β chain (CD122)	IL-2, IL-15
	Shared receptors	IL-13 (IL-13R–IL-4R complex) TSLP (TSLPR–IL-7R complex)
Régulation pro-inflammatoire	IL-1	IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-36Ra, IL-37 and IL-1Hy2
	IL-6	IL-6, IL-11, IL-31, CNTF, CT-1, LIF, OPN, OSM
	TNF α	TNF α , TNF β , BAFF, APRIL
	IL-17	IL-17A-F, IL-25 (IL-17E)
	Type I IFN	IFN α , IFN β , IFN ω , IFN κ , Limitin
	Type II IFN	IFN γ
	Type III IFN	IFN λ 1 (IL-29), IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B)
Régulation anti-inflammatoire	IL-12	IL-12, IL-23, IL-27, IL-35
	IL-10	IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, IL-29

Abréviations: CNTF, ciliary neurotrophic factor; CT-1, cardiotrophin-1; GM-CSF, granulocyte macrophage-colony stimulating factor; IFN, interféron; LIF, leukaemia inhibitory factor; OPN, osteopontin; OSM, oncostatin M; TNF α , tumour necrosis factor α ; TSLP, thymic stromal lymphopoietin. Adapté de (Turner *et al.*, 2014).

1.1 L'IL-1 α et l'IL-1 β

Tout d'abord, lorsqu'on parle d'IL-1 on doit comprendre qu'elle comprend l'IL-1 α et l'IL-1 β , nommé IL-1RF1 et IL-1RF2, respectivement (Acuner Ozbabacan *et al.*, 2014). L'IL-1 α est produite constitutivement dans les cellules de l'organisme (Dinarello, 2009), tandis que l'IL-1 β est produite suite à une reconnaissance du récepteur pour des motifs sur des pathogènes (PPR) entre autres les Récepteurs Toll-Like (TLR) qui sont utilisés entre autres par les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules T, les cellules B, les cellules NK (natural-killer), les cellules épithéliales et les fibroblastes (Kawasaki *et al.*, 2014). De plus, les lymphocytes B et les cellules NK (natural-killer) peuvent aussi synthétiser de l'IL-1 (Dinarello, 2009). Cette cytokine pro-inflammatoire est reconnue pour son rôle de médiateur de l'inflammation dans l'organisme, elle contribue aussi à la différenciation des Th17, elle est un stimulateur des cellules T CD4⁺ (Dinarello, 2009) (Santarlaschi *et al.*, 2013). Durant l'apoptose, IL-1 β peut être régulé par la caspase 8 tandis que, l'IL-1 α est sécrétée durant la nécrose (England *et al.*, 2014). Les deux interleukines IL-1 α et IL-1 β se lient à leur récepteur IL-1R de type I sur un des 3 domaines immunoglobulines en N-terminal causant l'hétérodimérisation avec la protéine accessoire IL-1RAcP (Santarlaschi *et al.*, 2013). La protéine adaptatrice MyD88 (facteur de différenciation myéloïde 88) est alors recrutée du côté C-terminal par le domaine Toll/IL-1 (TIR) avec IRAK (l'association de la kinase au récepteur IL-1) et TRAF6 (le facteur de nécrose tumorale receptor-associated factor 6) transférant le signal dans la voie de signalisation de NF κ B (facteur nucléaire- κ B), d'AP-1 (protéine activatrice 1), JNK (c-JUN kinase N-terminal) et de la MAPK p38 (protéine kinase mitogène activé) (figure 1.2) (Arend *et al.*, 2008). Le récepteur IL-1Ra est en compétition avec le IL-1R pour lier l'IL-1. Si l'IL-1Ra est lié avec l'IL-1 aucun signal n'est envoyé à la cellule (Santarlaschi *et al.*, 2013). Il existe aussi un

récepteur IL-1R de type II qui fonctionne comme celui de type I, mais qui ne peut envoyer de signal intracellulaire. Ce récepteur de type II est exprimé de manière constitutive à la surface des neutrophiles, des cellules B, des monocytes et des macrophages. Ayant une affinité plus grande que le récepteur de type I, il est utilisé comme régulateur de la réponse à l'IL-1 entre autres dans certaines maladies auto-immunes, l'arthrite inflammatoire et l'endométriose pour contrôler les niveaux d'inflammation (Peters *et al.*, 2013, Santarlasci *et al.*, 2013).

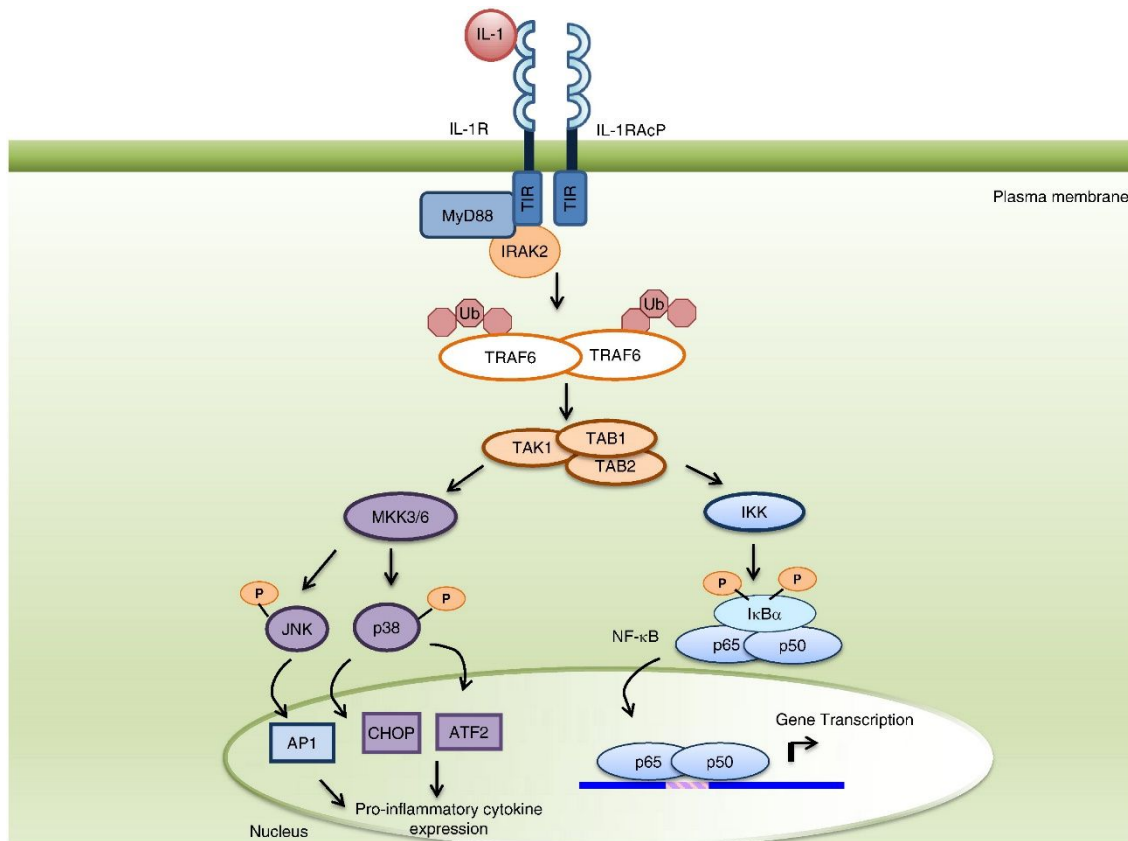


Figure 1.2 Voie de signalisation de l'IL-1. L'IL-1 se lie au récepteur IL-1R se liant à l'IL-1RAcP pour transduire le signal via le domaine TIR et MyD88 recrute et active la kinase associée au récepteur IL-1 (IRAKs). Cette dernière favorise la poly ubiquitination du facteur de nécrose tumorale receptor-associated factor 6 (TRAF6) qui alors interagit avec le complexe formé de TAK, TAB1 et TAB2 permet la phosphorylation d'IκBα et la libération des sous-unités de NF-κB

résultant en leur translocation au noyau et ainsi favorisant la transcription de gènes pro-inflammatoires. En même temps l'activation du complexe TAK, TAB1 et TAB2 phosphoryle et active les MAPKs, JNK et p38 qui eux phosphorylent d'autres facteurs de transcription augmentant la transcription de gènes pro-inflammatoires. MAPK: *mitogen-activated protein kinase*; TAB1: *TAK1 binding protein 1*; TAB2: *TAK1 binding protein 2*; TAK1: *transforming growth factor β -activated kinase 1*. Adapté de (Turner *et al.*, 2014)

1.2 La signalisation de l'IL-1

À la suite de la transcription du gène d'IL-1 β dans le noyau, l'ARN messenger est traduit dans le cytoplasme sur des polyribosomes liés au cytosquelette sous la forme de pro-IL-1 β utilisé à l'intérieur de la cellule (Stevenson *et al.*, 1992). Contrairement aux protéines sécrétées conventionnellement par le trafic vésiculaire par le Golgi vers la membrane plasmique l'IL-1 a un mécanisme de sécrétion alternatif via les exosomes, des microvésicules ou à l'aide de la caspase-1 et l'inflammasome. (Lopez-Castejon *et al.*, 2011). Des expériences antérieures ont démontré que dans les monocytes stimulés avec du LPS en présence de brefeldin A, inhibant le mécanisme de sécrétion du réticulum-Golgi (RE-Golgi), IL-1 β était toujours sécrétée prouvant que cette protéine utilise un mécanisme alternatif pour sa sécrétion (Rubartelli *et al.*, 1990).

Le complexe de l'inflammasome comprend la protéine NLRP3 liée à une protéine adaptatrice ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal CARD) qui recrute la pro-caspase-1, car elle ne contient pas le motif habituel de recrutement nommé CARD (caspase

activating recruitment domain). Ce complexe active le clivage de la pro-caspase en caspase-1 (Jo *et al.*, 2016). La caspase-1 clive à son tour la pro-IL-1 β en IL-1 β soit dans le cytosol ou dans un lysosome spécialisé pour la sécrétion qui est relâché à l'extérieur de la cellule (Dinarello, 2009). L'ATP extracellulaire agissant via le récepteur P2X7 peut aussi stimuler la formation de l'inflammasome et ainsi convertir la pro-IL-1 β en IL-1 β mature pour la sécrétion (Lopez-Castejon *et al.*, 2011).

1.3 L'IL-6

IL-6 est une cytokine sécrétée par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) entre autres les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules B, mais aussi par les cellules endothéliales, les fibroblastes et les astrocytes (Dienz *et al.*, 2009) (P. C. Heinrich *et al.*, 1990). Cette cytokine est importante dans l'hématopoïèse, dans la maturation finale des cellules B et l'activation des cellules T dans la réponse adaptative, autant que la réponse innée (Garbers *et al.*, 2018). L'IL-6 est reconnue par le récepteur IL-6R α , ce dernier est retrouvé à la surface des hépatocytes, des leucocytes et des cellules épithéliales (Scheller *et al.*, 2011).

Lorsque la cytokine est liée à son récepteur IL-6R α , la sous-unité gp130 (IL-6R β), retrouvée à la surface de toutes les cellules se lie et se dimérise formant un complexe pouvant recruter la protéine JAK (Janus kinase) qui phosphoryle la tyrosine du domaine SH2 de gp130. Ensuite le SHP-2 se lie à cette tyrosine phosphorylée et amorce la cascade Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) qui transloque le signal ultimement au noyau pour la transcription de gène cible (Scheller *et al.*, 2011). Aussi après sa phosphorylation, la sous-unité gp130 peut recruter STAT3 (signal de

transduction et activateur de transcription) qui après une dimérisation sera transloquée au noyau pour la transcription de gènes cible (Peter C. Heinrich *et al.*, 2003). La voie PI3K/AKT est aussi une voie pour la signalisation d'IL-6. Une autre voie de signalisation comprenant la SRC kinase YES et SCR amène à la phosphorylation du facteur de transcription YAP1 qui est ensuite transloquée au noyau, et transcrits des gènes reliés à la croissance cellulaire et à la prolifération (Garbers *et al.*, 2018).

Malgré l'absence de récepteur IL-6R sur la majorité des cellules, le signal peut être transmis par une signalisation en *trans*. La désintégrine métalloprotéinase 17 (ADAM17) peut couper le récepteur IL-6R devenant soluble (sIL-6R) (Scheller *et al.*, 2011). Ce récepteur maintenant accessible peut ainsi, lorsque lié à son substrat (IL-6), transduire le signal à l'aide des sous-unité gp130 à la surface des cellules ne possédant pas le récepteur IL-6R (Scheller *et al.*, 2011). La présentation en *trans* existe aussi comme un autre moyen de signalisation entre une cellule dendritique utilisant le récepteur IL-6R membranaire pour lier les 2 sous-unité gp130 de la cellule T pour transduire le signal à celle-ci durant sa différenciation en Th17 (Garbers *et al.*, 2018, Heink *et al.*, 2017).

L' inhibition du signal ne se fait que lorsque le récepteur soluble IL-6R lie l'IL-6 et les sous-unités solubles gp130 ne pouvant transduire le signal à la cellule (Scheller *et al.*, 2011).

1.4 La signalisation d'IL-6

Les majorités des mécanismes de sécrétion suivent une sécrétion dite conventionnelle. Ce que nous entendons par conventionnelle c'est que du réticulum endoplasmique la protéine voyage dans des vésicules sur les microtubules vers le *cis*-Golgi qui ensuite la redistribuera du *trans Golgi* suivant les SNARE spécifiques vers les endosomes spécifiques ou jusqu'à la membrane plasmique (Stow *et al.*, 2013). Il est important de noter que la cytokine IL-6 peut être sécrétée conjointement avec TNF dans les endosomes de recyclage, mais que l'IL-6 est dans un sous compartiment résultant de la fusion membranaire à l'endosome de recyclage. Celle-ci ne fusionnera pas avec la vésicule du TNF et sera séparée de celle-ci. Ces vésicules ayant des SNARE (soluble NSF (*N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment) protein receptor) médient la fusion membranaire entre les organelles de la cellule, pour être dirigées spécifiquement vers l'endosome de recyclage qui par la suite sera redistribué vers la membrane plasmique pour le TNF et l'IL-6 (Manderson *et al.*, 2007). Par contre, l'IL-6 dans l'endosome de recyclage est dans un sous compartiment séparé du TNF, car ils ne sont pas relâchés aux mêmes sites de la membrane plasmique (Stow *et al.*, 2013). L'IL-6 est relâchée à la coupe phagocytaire comme le TNF, mais aussi à la surface basolatérale d'où l'explication qu'ils y auraient des sous-compartiments dans les endosome recyclés (Manderson *et al.*, 2007).

1.5 Le TNF

Le TNF est la cytokine la plus étudiée dans le système immunitaire (Brenner *et al.*, 2015). Il a un rôle central dans la régulation de l'inflammation durant la réponse immunitaire. Le TNF est aussi connu pour son rôle dans l'homéostasie des cellules soit la prolifération, l'apoptose et la nécrose (MacEwan, 2002). Il peut aussi induire la réponse antivirale et la réponse innée (Turner *et al.*, 2014) (Brenner *et al.*, 2015). Cette cytokine est aussi impliquée lorsqu'elle est dérégulée dans certaines maladies neurologiques comme la maladie d'Alzheimer et du Parkinson induisant la destruction des neurones par une inflammation chronique. L'inflammation dérégulée par une abondance de TNF entraînant une inflammation persistante peut entraîner des maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde la maladie de Crohn, le psoriasis, le Behcet's syndrome (Turner *et al.*, 2014). Le TNF est sécrété en majorité par les macrophages, mais, aussi par les monocytes, les cellules T, les cellules NK, les fibroblastes et les neurones (Turner *et al.*, 2014).

1.6 La signalisation du TNF

Les deux récepteurs pour la signalisation du TNF sont le TNFR1 et TNFR2. Le premier est exprimé à la surface de chaque cellule mammifère tandis que, le deuxième est strictement retrouvé à la surface des cellules immunitaires et des cellules endothéliales (Faustman *et al.*, 2010). Les récepteurs TNFR1 et le TNFR2 lient le TNF soluble via leur domaine cystéine extracellulaire (*pre-ligand assembly domain*; PLAD). Le TNFR1 a comme particularité d'avoir un domaine de mort (*death domain*; DD) pouvant être inhibé par un *silencer* (SODD) lorsque le ligand n'est pas lié au récepteur (Jiang *et al.*, 1999). TNFR1 recrute TRAF5 ou TRAF2 et TNFR2 recrute au TRAF1 ou TRAF2

(TNFR-associated factor) formant le complexe I (figure 1.3). À partir de ce complexe, les deux récepteurs peuvent activer les mêmes voies métaboliques. Ces voies incluent une protéine kinase qui interagit avec un récepteur (RIP) qui elle active la kinase d'I κ B (IKK) phosphorylant l'inhibiteur I κ B permet la translocation de NF- κ B (p65/p50) au noyau pour la transcription de gènes (Brenner *et al.*, 2015, Turner *et al.*, 2014). Le complexe I peut aussi activer la voie des MAPK : MEK1/MEK7/JNK activant AP1 (c-Jun et Fos) et MEK3/6/p38 activant plusieurs facteurs de transcription (ATF) (Turner *et al.*, 2014) menant tous à une régulation à la hausse de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et l'IL-8 (Brenner *et al.*, 2015). Comme moyen de régulation, la désintégrine métalloprotéinase 17, peut couper l'ectodomaine du récepteur TNFR1 contrôlant l'activité du TNF vers une internalisation du récepteur menant à l'activation de la voie apoptotique par le complexe II (Sakimoto *et al.*, 2009) (figure 1.3) (Turner *et al.*, 2014). Ce complexe II aussi appelé (*death-inducing signaling complex; DISC*) comprend FADD et la pro-caspase 8 qui s'active en caspase 8 et activera à son tour les caspases 3, 4 et 7. La caspase 3 active une DNase dégradant l'ADN (CAD) menant à l'apoptose de la cellule (figure 1.3) (Enari *et al.*, 1998, Sedger *et al.*, 2014).

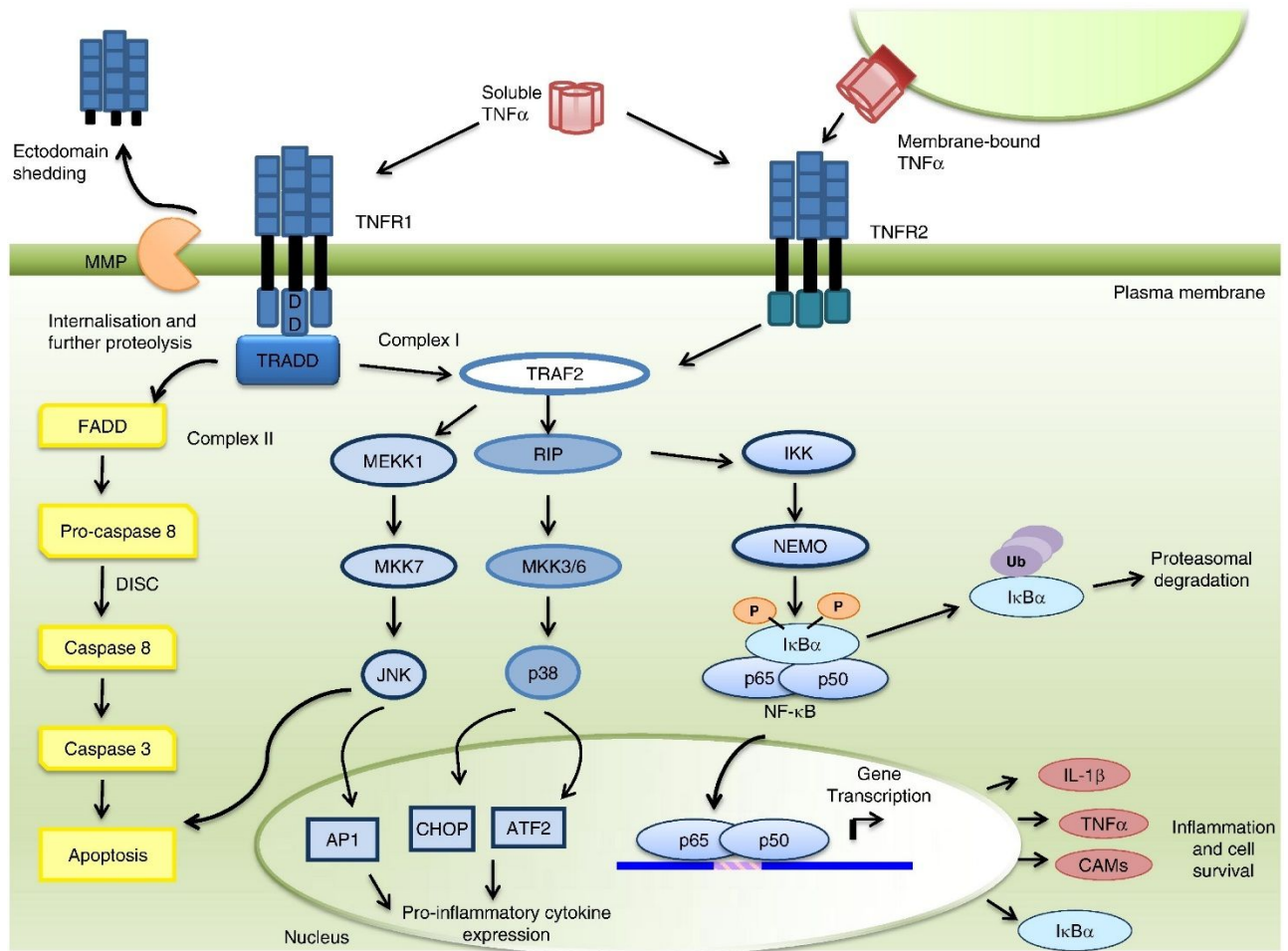


Figure 1.3 Voie de signalisation du TNF. Lorsque le TNF soluble se lie au récepteur TNFR1, une métalloprotéase clive sa partie extracellulaire et le récepteur s'internalise et peut former deux complexes. Si une lyse protéique du récepteur internalisé s'enchaîne, le complexe II se forme (TRADD/FADD) et signale à travers la voie pro-caspase8 l'apoptose de la cellule. Si celui-ci reste intact le récepteur avant son internalisation forme le complexe I (TRADD/TRAF2/RIP) menant à une phosphorylation de MAPK (mitogen-activated protein kinase) ultimement menant à la phosphorylation des facteurs de transcription AP1, CHOP et AFT2 et à la transcription de gènes pro-inflammatoires. De plus, le complexe I peut activer IKK résultant en la phosphorylation et l'ubiquitination d'IκBα et la libération des sous-unités de NF-κB p65/p50 résultant en leur

translocation au noyau et ainsi favorisant la transcription de gènes pro-inflammatoires. CAMs, *cellular adhesion molecules*; DISC, *death-inducing signalling complex*; FADD: *Fas-associated death domain protein*; JNK: *Jun N-terminal kinase*; MMP: métalloprotéase; RIP: *receptor-interacting protein*; TRADD, *TNFR1-associated death domain protein*; TRAF2, *TNFR-associated protein 2*. Adapté de (Turner *et al.*, 2014)

1.7 L'oxyde nitrique

L'oxyde nitrique est un gaz endogène synthétisé par des enzymes NOS (synthase d'oxyde nitrique) à partir de la L-arginase (Guzik *et al.*, 2003). Différents isoformes existent au sein de l'organisme : nNOS ou NOS1 dans les neurones, eNOS ou NOS3 dans les cellules endothéliales sont exprimés de manière constitutive, tandis qu'iNOS ou NOS2 sont induits par l'inflammation dans les macrophages. Cette induction peut être soutenue pendant plusieurs heures, contrairement au nNOS et à l'eNOS qui sont dépendants de la concentration intracellulaire du calcium pour leur production (Korde Choudhari *et al.*, 2013). L'oxyde nitrique en petite quantité régule la réaction anti-inflammatoire, la vasodilatation, la neurotransmission atypique, la pression sanguine dans le système nerveux central et à des propriétés anti-oxydants. Par contre, lorsque sa concentration augmente il réagit avec l'oxygène O_2 et O_2^- formant des composés comme le peroxy-nitrate ($ONOO^-$) détruisant l'ADN des microorganismes, menant à la mort de la cellule (Guzik *et al.*, 2003, Korde Choudhari *et al.*, 2013). Un haut taux d'oxyde nitrique limite les enzymes (*iron-sulfur cluster*) comme ceux du complexe I et II responsable de la respiration mitochondriale, la ribonucléotide réductase qui contrôle le taux de synthèse de l'ADN (Förstermann *et al.*, 2011). L'oxyde nitrique peut aussi affecter la signalisation des MAPK comme

JNK, STAT et la voie de NF- κ B pouvant les inhiber ou les activer (Guzik *et al.*, 2003). Les maladies inflammatoires et auto-immunes ont comme similitude, une activation accrue des macrophages et des neutrophiles pouvant diffuser et produire d'importante quantité soutenue d'oxyde nitrique dans le système. Plusieurs maladies neurologies dégénératives comme l'Alzheimer et le Parkinson sont aussi en partie dû à une hausse de l'oxyde nitrique (Förstermann *et al.*, 2011).

1.8 La régulation de l'oxyde nitrique

L'oxyde nitrique est librement diffusible, très réactif, et synthétisée à la demande. Par conséquent, la régulation de sa production est le seul moyen de contrôler ses effets (Dawson *et al.*, 1995). L'oxyde nitrique a une multitude de cibles dont les MAPK, les métalloprotéase, les caspases, les protéines G, les protéines phosphatases et les protéines tyrosine kinase (Bogdan, 2001). L'enzyme iNOS est la seule enzyme régulant sa production accrue et soutenue, qui est indépendante du niveau de calcium intracellulaire. Sa régulation est liée à celle de l'enzyme régi par plusieurs facteurs de transcription comme le NF- κ B, AP-1, STAT1 et IRF1. L'oxyde nitrique régule à la hausse le NF- κ B qui augmente la production de l'oxyde nitrique et lorsque sa concentration est haute l'effet inverse est observé (Bogdan, 2001). Le TGF- β est un régulateur post-transcriptionnel d'iNOS, en déstabilisant l'ARNm d'iNOS sans affecter sa transcription l'enzyme est moins synthétisé donc la protéine est moins produite (Bogdan, 2001, Vodovotz *et al.*, 1993). Le protéasome est aussi un facteur diminuant le niveau de l'enzyme est aussi réguler par le protéasome limitant ainsi une concentration trop élevée dans le système (Bogdan, 2001). Inversement plusieurs facteurs régulent l'expression d'iNOS à la hausse les plus connus et les plus étudiés sont l'interféron gamma (IFN- γ) et le LPS (Bogdan, 2001). Les lipoprotéines, la flagelline,

et l'ADN de certaines bactéries et protozoaires peuvent augmenter la régulation de cette enzyme pour induire l'oxyde nitrique (Bogdan, 2001).

CHAPITRE 2 : L'INFLAMMATION

L'inflammation est un mécanisme de défense contre les micro-organismes envahissant notre système en plus d'être un mécanisme de réparation tissulaire. Cependant, lorsque l'inflammation est exacerbée, ceci peut causer des dommages tissulaires ou des maladies inflammatoires chroniques (Iwasaki *et al.*, 2015). Pour efficacement éliminer ces corps étrangers, le système inné doit reconnaître ces pathogènes. C'est Charles Janeway Jr. en 1989 a établi que le système inné reconnaît grâce à des récepteurs de motifs moléculaires (PRR) des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) (Iwasaki *et al.*, 2015). Les cellules endommagées sont aussi perçues par les PRR en reconnaissant les motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs) (Kawasaki *et al.*, 2014). Les signaux provenant de ces récepteurs doivent être régulés vigoureusement afin de transmettre le message afin que les cellules produisent et sécrètent différentes cytokines, afin de recruter les cellules du système immunitaire. Ceci prépare le système adaptatif à contrer le pathogène si l'immunité innée n'est pas suffisante pour contrôler sa prolifération. Par contre, plusieurs maladies sont liées à une inflammation chronique comme l'Alzheimer, le choc anaphylactique, l'asthme, les nombreuses arthrites inflammatoires, vasculites, la maladie de Crohn, la sclérose en plaques, etc. (Nathan, 2002). En plus, plusieurs dommages fait par les dérivés réactifs de l'oxygène et du nitrogène (*reactive oxygen species*) ROS et (*reactive nitrogen species*) RNS touche l'ADN des cellules souches, utilisé pour la réparation des tissus, entraîne la croissance potentielle de cellules cancéreuses (Ohnishi *et al.*, 2013) (Murata, 2018). Pour ces raisons il est important d'étudier les phénomènes de l'inflammation en lien avec les pathogènes et les maladies afin de créer des liens entre les différents mécanismes utilisés par l'hôte et les pathogènes.

2.1 Les TLRs

Les TLRs (*toll like receptor*) font partie de la grande famille des récepteurs reconnaissant les motifs des pathogènes (PRR) les mieux caractérisés. Certaines sont à la surface membranaire comme TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR10. Tandis que TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, sont dans l'endosome pour l'humain (Kawai *et al.*, 2010). La plupart des TLR lient leurs substrats et homodimérisent pour la transduction du signal à travers une cascade de signalisation sauf pour le TLR3. Le TLR1-2 et 6 reconnaissent en majorité des lipoprotéines, peptidoglycan de bactéries et le zymosan (Kawasaki *et al.*, 2014). Le TLR3 reconnaît l'ARN double-brins des virus ainsi que l'ARN messager des cellules endommagées (Kawasaki *et al.*, 2014). Le TLR4 connu comme le récepteur du LPS à la surface des bactéries gram négative (Mohammad Hosseini *et al.*, 2015). Le TLR5 a comme cible la flagelline des bactéries tandis que le TLR7 et 8 reconnaissent l'ARN simple brin de certains virus (Mohammad Hosseini *et al.*, 2015). Le TLR9 se lie à des séquences d'oligodéoxynucléotides CpG non méthylés, étant plus fréquents dans les bactéries, les virus et le protozoaire que dans les cellules des vertébrés (Mohammad Hosseini *et al.*, 2015). Tous les TLRs sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique et sont transportés au Golgi où ils sont dirigés à la membrane ou à l'endosome (Kawasaki *et al.*, 2014). Étant donné que les TLR7 8 et 9 peuvent reconnaître des motifs de nucléotides disponibles à l'intérieur de la cellule une dérégulation dans leur transport ou dans leur activité peuvent causer des réactions auto-immunitaires (Kawasaki *et al.*, 2014). Les cellules dendritiques possèdent tous les TLRs, étant les principales cellules présentatrices d'antigènes du système immunitaire (Mohammad Hosseini *et al.*, 2015). Les cellules T expriment les TLR2, 3, 4, 5, 7 et 8. Quant à elles les cellules B ont comme récepteurs les TLR1, 6, 7 et 9. Les macrophages expriment les TLR1, 2, 3, 4, 6, 7 et 9. Les

monocytes et les cellules NK et les neutrophiles ont aussi leurs TLRs spécifiques (Mohammad Hosseini *et al.*, 2015).

2.2 Signalisation des TLRs

Après avoir lié leur ligand les TLRs recrutent tous le domaine TIR (*Toll/interleukin 1 receptor*) avec soit TRIF (*domain-containing adaptor-inducing interferon- β*) et TRAM (*TRIF related-adaptator molecule*) ou MYD88 (facteur de différenciation myéloïde 88) et MAL (protéine adaptatrice comme MYD88) (O'Neill *et al.*, 2013). Le récepteur TLR4 peut être endocyté pour réguler ces molécules adaptatrices impliquées dans sa signalisation (O'Neill *et al.*, 2013). La cascade de signalisation utilise les mêmes molécules adaptatrices, soit les TRAF comme dans la signalisation du TNF et les IRAK reliés au récepteur de l'IL-1 (O'Neill *et al.*, 2013). La suite de la cascade de signalisation réutilise les MAPK retrouvés dans la signalisation des cytokines. Au final les facteurs de transcription restent aussi les mêmes, soit NF- κ B, AP1, CREB (*cyclic AMP-responsive element-binding protein*) et les IRF (facteur de l'interféron) représentés sur la figure 1.4 afin d'augmenter la production des cytokines pro-inflammatoires afin de décimer les pathogènes envahissants ainsi que l'interféron de type I (Kawasaki *et al.*, 2014, O'Neill *et al.*, 2013). Lorsque cette signalisation est sujette à des déficiences par exemple une déficience en IRAK4 ou en MYD88 utilisés par la plupart des TLRs augmente drastiquement la récurrence des infections à *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (Yang *et al.*, 2005).

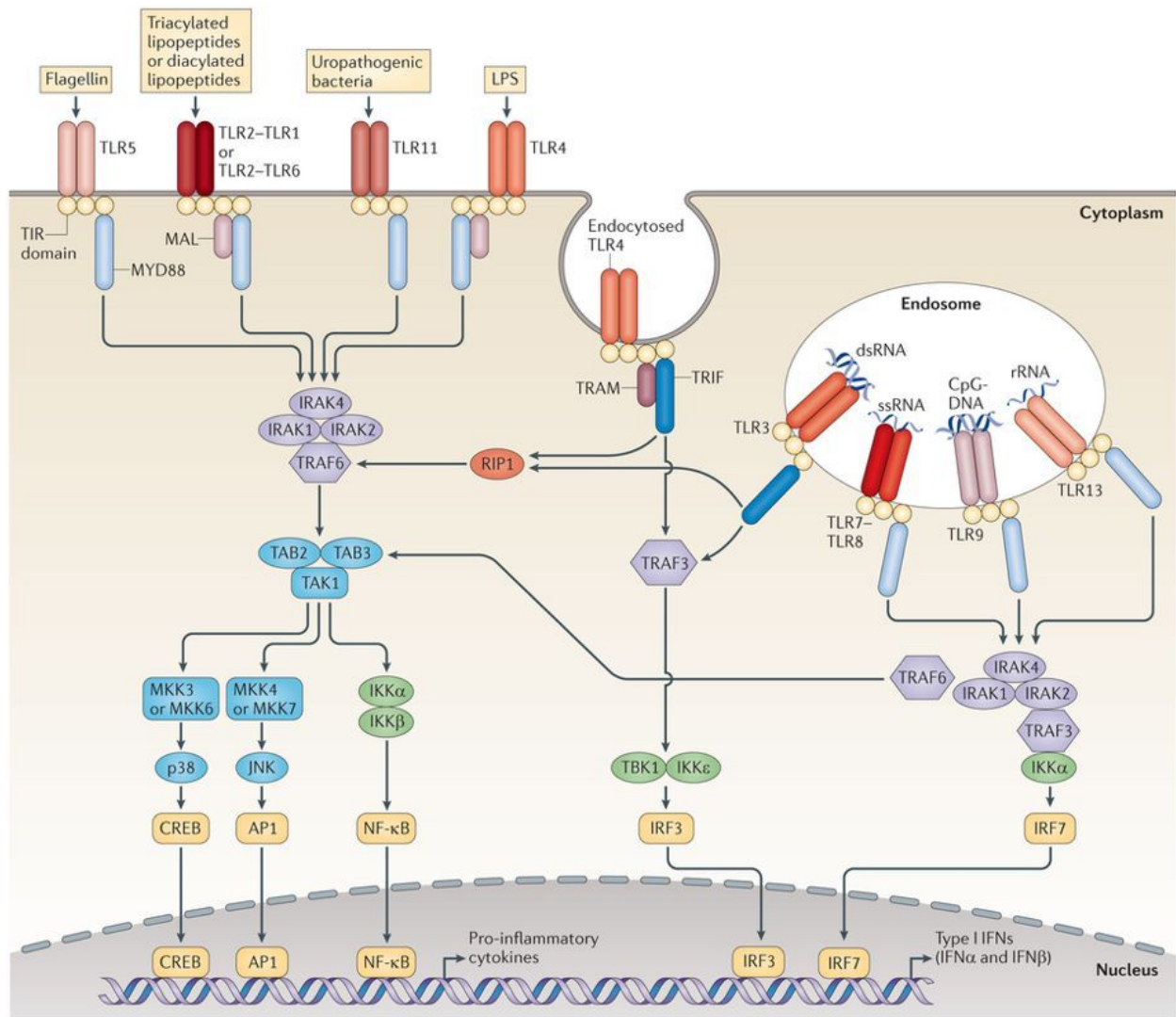


Figure 1.4 Les voies de signalisation des différents TLR (*Toll like receptor*) Les TLR4, 5 et 11 se dimérise et TLR2 fait des hétérodimères avec TLR1 ou TLR6 liant leur ligands à la surface de la cellule. Les TLR 3, 7-8, 9 et 13 sont dans l'endosome reconnaissant du matériel génétique des microbes ou dérivé de l'hôte. Suivant la stimulation du TLR4, les domaines TIR (récepteur Toll/interleukine 1) recrutent le facteur de différenciation myéloïde 88 (MYD88) et la protéine *MYD88-adaptator-like protein* (MAL) ou des *domain-containing adaptor-inducing interferon-β* (TRIF) et *TRIF related-adaptator molecule* (TRAM) si le récepteur est à la surface de la cellule ou

internalisé respectivement. L'interaction entre différentes kinases associées au récepteur IL-1 (IRAKs) et des facteurs associés au récepteur de TNF (TRAFs) active plusieurs *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) résultant à la phosphorylation des facteurs de transcription *cyclic AMP-responsive element-binding protein* (CREB) par *mitogen-activated protein kinase* (p38) et AP1 par JNK. D'autres familles de facteurs de transcription comme le NF- κ B et les facteurs de régulation de l'interféron (IRF) induisant la transcription de cytokines pro-inflammatoires et de l'interféron de type I. dsRNA, ARN double brin; IKK : *I κ B kinase*; LPS, lipopolysaccharide; MKK : *MAP kinase kinase*; RIP1 : *receptor-interacting protein 1*; rRNA, ARN ribosomal; ssRNA : ARN simple brin; TAB : *TAK1-binding protein*; TAK : *TGF β -activated kinase*; TBK1 : *TANK-binding kinase 1*. Adapté de (O'Neill *et al.*, 2013)

2.3 Processus de la réponse innée

Tout d'abord, pour avoir une réaction immunitaire il faut un microbe ou un dommage qui dérégule l'homéostasie. Lorsque ce dommage survient, plusieurs protéines reconnues par les DAMP comme entre autres les protéines HSP (heat shock protein), l'ATP extracellulaire ou l'ADN mitochondrial sont relâchées dans le milieu extracellulaire. Les macrophages résidents perçoivent avec leurs récepteurs PPR des PAMPs ou des DAMPs, les motifs conservés de l'envahisseur à leur surface ou le dommage respectivement (Julier *et al.*, 2017). Ceci induit une cascade de réaction qui aboutit à la sécrétion des chimiokines attirants au site de l'infection dans un ordre chronologique les neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les dendritiques (figure 1.5) (Julier *et al.*, 2017). Ceux-ci peuvent reconnaître grâce à leurs récepteurs TLRs, NLRs,

RLRs et les CLR différents composants des pathogènes et transduire une cascade de réaction activant le NF- κ B et les facteurs de transcription de l'interféron de type I (figure 1.4) pour stimuler la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires TNF, IL-1, IL-6, INF α , INF β et INF- γ (Turvey *et al.*, 2010). Pendant la signalisation, les APCs phagocytent les pathogènes reconnus afin de présenter à leur surface une multitude de peptides générés par leur digestion dans le lysosome afin d'induire par la suite une réponse adaptative des cellules T et B (Julier *et al.*, 2017).

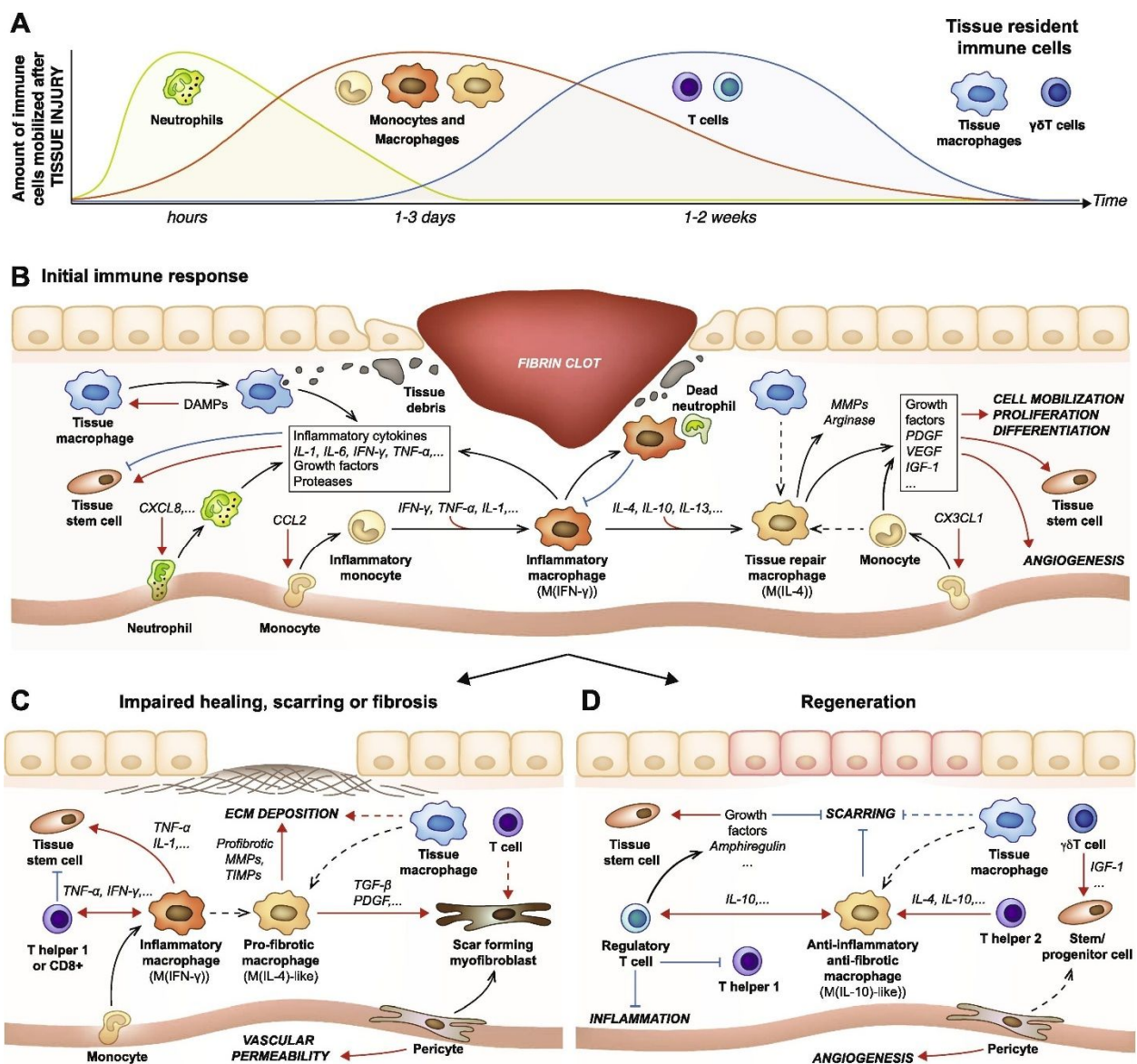


Figure 1.5 Cinétique de la réaction immunitaire. Les cellules responsables de la réponse immunitaire après une blessure à un tissu à travers le temps. Les macrophages et les cellules T gamma delta résidants mobilisent les autres cellules immunitaires. Dans l'ordre les neutrophiles, les macrophages/monocytes et les cellules T (A). L'ensemble de la réaction immunitaire dans l'ordre chronologique de gauche à droite les macrophages reconnaissent les motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs). Les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires à produire des cytokines pro-inflammatoires afin de recruter les monocytes/macrophages. Les macrophages *IFN- γ -like* gardent l'inflammation en place et les macrophages *IL-4-like* sont responsables de la réparation des tissus (B). Si l'inflammation perdure, les macrophages *IFN- γ -like* stimulent les cellules T qui inhibent via les cytokines inflammatoires la capacité de régénération des tissus. Les macrophages *IL-4 like* ont une activité pro-fibrose qui encourage la superposition de protéines de la matrice extracellulaire et aux cicatrices qui ne permettent pas la régénération complète du tissu (C). En opposition, si la régénération entraîne un phénotype anti-inflammatoire ou anti-fibrose avec des macrophage *IL-10-like* via des cytokines anti-inflammatoire comme IL-10 en synergie avec les Treg qui maintiennent ce phénotype avec la sécrétion de facteurs de croissance. Les cellules Th2 maintiennent ce phénotype pour aider à la régénération du tissu (D). Adaptée de (Julier *et al.*, 2017)

3 CHAPITRE 3 : LES SNARES

Les SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) sont de petites molécules qui assistent les différents types de sécrétions dans les cellules. Les vésicules voyagent conventionnellement du réticulum endoplasmique vers le ERGIC, puis vers le *cis* Golgi passant par le cistromae et arrivant au *trans* Golgi (Stow *et al.*, 2013). Du *trans* Golgi plusieurs voies s'offrent aux vésicules. Les cargos peuvent être transportés par les microtubules, par les vésicules ou via le lysosome sécrétoire (Stow *et al.*, 2013). Les SNARE médient 4 types de fusion membranaire. La première orchestre la fusion des vésicules ou des lysosomes sécrétoires avec la membrane plasmique; afin de recycler cette membrane vers le *trans* Golgi une endocytose est requise (Stow *et al.*, 2013) (Figure 1.6). Le voyage des vésicules sur les tubules est aussi médié par ce type de fusion membranaire. Donc, après la fusion, les protéines membranaires sont incorporées à la membrane plasmique. Le deuxième type de fusion, appelé le *kiss and run* comporte une étape de fusion partielle de la vésicule formant un pore relâchant dans le milieu extracellulaire les protéines solubles (Figure 1.6). Après cette étape, la vésicule se dissocie de la membrane plasmique et retourne vers le réseau de transport de la cellule (Stow *et al.*, 2013). Le troisième mécanisme de fusion reprend la notion de fusion partielle et de pore du *kiss and run* et ajoute à cela la possibilité qu'une autre vésicule fusionne la première ayant un accès au milieu extracellulaire, créant une chaîne de vésicules qui se fusionnent les unes avec les autres, relâchant ses protéines solubles par le même pore (Stow *et al.*, 2013) (Figure 1.6). Le dernier type de fusion comprend une fragmentation de la vésicule de départ en plusieurs petites vésicules qui voyagent sur les microtubules vers la membrane plasmique (Stow *et al.*, 2013) (Figure 1.6).

Modes of fusion at the cell surface

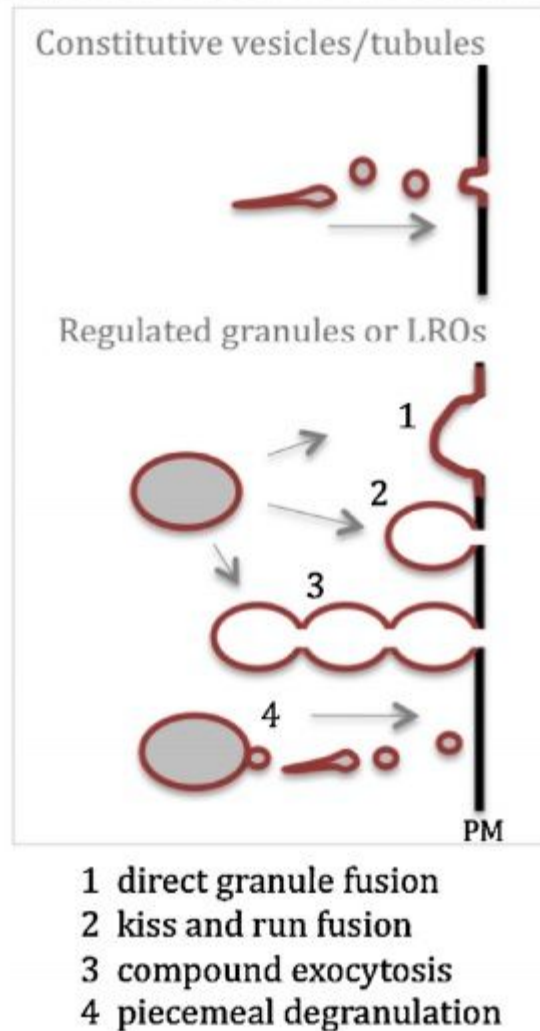


Figure 1.6 Type de sécrétion Les vésicules liées à la membrane ou celles voyageant sur les microtubules sont transportées à travers le réseau du trans-Golgi ou le réseau des endosomes. En liant la membrane plasmique, le contenu soluble est relâché et les protéines transmembranaires sont désormais à la membrane plasmique (1). Pour recycler les protéines adaptatrices du transport protéique, durant la fusion *kiss and run* la vésicule reste intacte et forme un pore temporaire pour relâcher les protéines solubles et se refermer afin de retourner à son compartiment d'origine (2). De la même manière qu'un *kiss and run*, les vésicules peuvent

se lier les une derrière les autres en chaîne pour créer un pore reliant l'intérieur de la vésicule avec l'extérieur de la cellule (3). Il est possible aussi qu'à partir d'une vésicule plusieurs plus petites vésicules se forment afin d'être acheminées par les kinésines à la périphérie de la cellule (4). Pour chacune de ces fusions membranaires les *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor* (SNAREs) médient le rapprochement des membranes afin de lier les bicouches lipidiques ensembles afin que leur contenu soient libérés ou encapsulés. Adapté de (Stow *et al.*, 2013)

3.1 Types de SNAREs

Les SNAREs ont été classées en 2 grandes catégories, soit ceux étant liée à la vésicule, les v-SNAREs ou liées à la cible (*target*) les t-SNAREs. De nos jours, elles sont classées soit en R-SNARE où le résidu arginine (R) est utilisé dans la formation du complexe et les Q-SNARE où le résidu glutamine (Q) est utilisé (Han *et al.*, 2017). Une classification plus arrondie en Qa, Qb et Qc prend en considération où elles sont situées dans le complexe des 4 super hélices (Han *et al.*, 2017). D'autres familles de protéines de fusion ont été aussi nommées selon leurs fonctions dans le complexe. La famille des VAMPs (Vesicle associated membrane proteins) est comme les v-SNARE, soit liée à la vésicule. La plupart des SNAREs ont un domaine transmembranaire en C-terminal leur permettant d'être ancrés dans la membrane de la vésicule ou de la membrane cible (Han *et al.*, 2017). Dans les synapses le complexe-SNARE le plus connu est le complexe des superhélices formées par un motif conservé SNARE de la synaptobrevin un de la syntaxin 1 et 2 motifs de la SNAP-25 (*Synaptosomal nerve-associated protein 25*) (Figure 1.7) (Han *et al.*, 2017).

La majorité des SNAREs ont seulement un motif SNARE pour former le complexe de fusion (*trans-SNARE complex* ou *SNAREpin*) et le complexe doit être formé par une R-SNARE une Qa, Qb et Qc pour fusionner les deux membranes (Collins *et al.*, 2015). Le complexe trans-SNARE est lorsque les SNAREs rapprochent les deux membranes afin d'expulser la partie hydrophile pour que les phospholipides de la bicouche membranaire puissent converger l'une vers l'autre pour former le complexe cis-SNARE où un canal relie les milieux intracellulaires de la vésicule et de l'organelle cible (Adnan *et al.*, 2019, Daste *et al.*, 2015, Lou *et al.*, 2016). Il existe au sein des SNARE un domaine *longin* qui appartient à certaines SNARE comme Ykt6, VAMP7 et Sec22b. Ce domaine a comme particularité non seulement de réguler le transport protéique, mais aussi de définir la localisation de la SNARE elle-même à travers les différentes organelles si elle possède le domaine transmembranaire en C-terminal (Daste *et al.*, 2015).

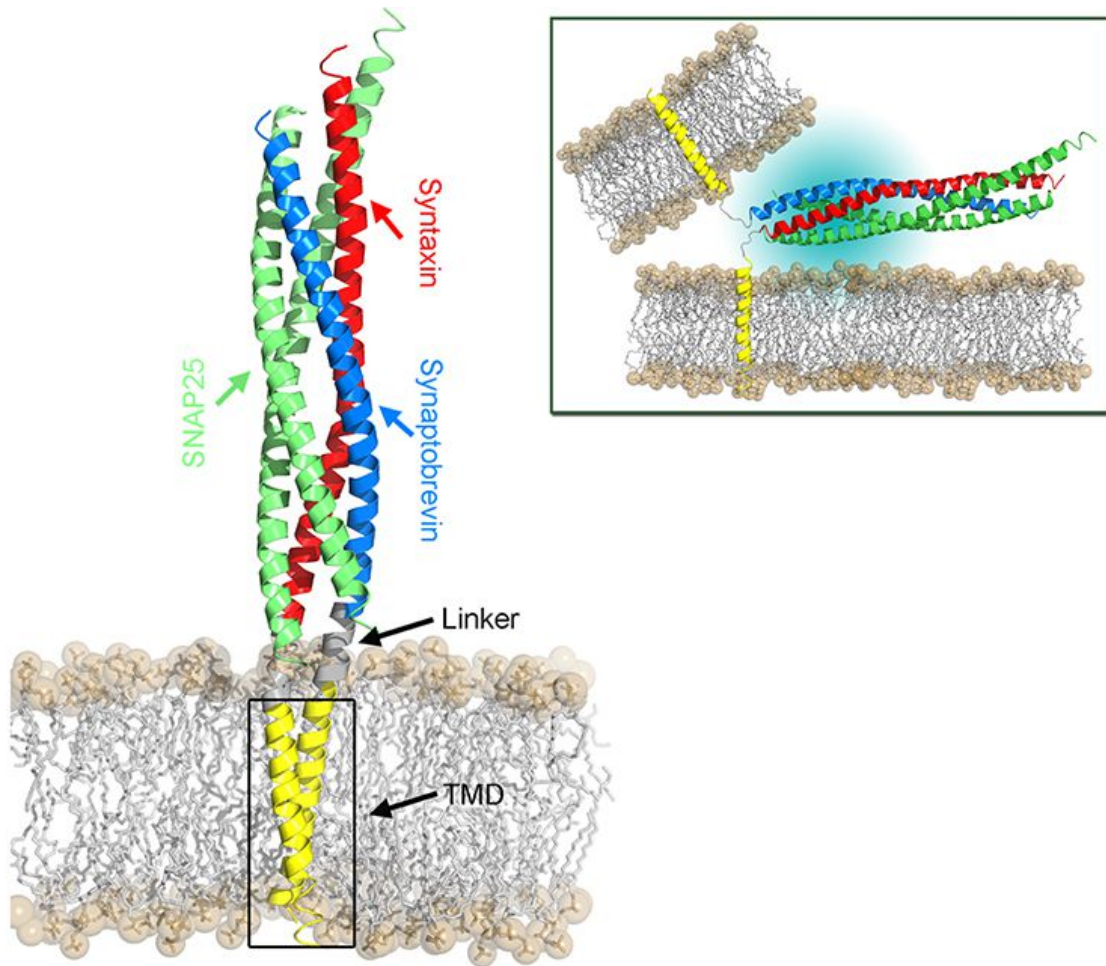


Figure 1.7 Complexe de fusion de SNARE. Le complexe *cis*-SNARE (PDB:3IPD) comprend deux protéines SNAP-25, une syntaxin et une synaptobrevin. Ces deux dernières sont constituées d'un domaine cytoplasmique (motif SNARE) et un domaine transmembranaire (TMD) lié par un *linker*. Lorsqu'une synaptobrevin d'une vésicule rencontre sa partenaire syntaxin elles forment ce complexe et les membranes hydrophobes se rapprochent formant le pore de fusion. L'image de droite montre le complexe avant la fusion. Adapté de (Han *et al.*, 2017)

3.2 Sec22b

La SNARE Sec22b est une R-SNARE (v-SNARE) localisée dans le ERGIC et aide au transport protéique antérograde et rétrograde entre le REG et le Golgi (Adnan *et al.*, 2019). Cette SNARE peut aussi voyager jusqu'à la membrane plasmique et se retrouver dans la membrane du phagosome. Dans les mammifères, la SNARE Sec22b a deux isoformes Sec22a et Sec22c qui ne contiennent pas le motif SNARE utilisé pour créer la fusion membranaire, mais participe tout de même aux transport protéique (Daste *et al.*, 2015). Le rôle de Sec22b, qui s'étend même à la biogenèse des autophagosomes, est crucial dans les neurones pour leur croissance (Daste *et al.*, 2015). Certains pathogènes intracellulaires comme *Leishmania*, *Legionella*, et *Toxoplasma gondii*, peuvent contrôler et recruter cette SNARE à leur avantage pour leur survie à l'intérieur de la vacuole parasitophore en retardant la maturation du phagolysosome et ainsi mieux s'adapter aux conditions et s'établir dans cette organelle (Cebrian *et al.*, 2011, Matte *et al.*, 2016). L'absence de celle-ci empêche la présentation croisée dans les cellules dendritiques lors d'une infection et augmente la survie du pathogène (Cebrian *et al.*, 2011). Sec22b joue aussi un rôle dans la fusion des autophagosomes à des vacuoles durant l'autophagie (Adnan *et al.*, 2019).

Les partenaires connus pour Sec22b pour le transport antérograde vers le Golgi comprennent synthaxin5, Bet1 et la membrin, qui forment la vésicule COPII (Adnan *et al.*, 2019), tandis que pour le transport rétrograde les t-SNARE utilisées sont Use1, Sec20 et la synthaxin 18 (Adnan *et al.*, 2019). Sec22b a aussi des partenaires à la membrane plasmique comme syntaxin 4. Avec la syntaxin 1A, Sec22b joue un rôle dans le développement des neurones en rapprochant de la

membrane plasmique au RE (Adnan *et al.*, 2019). De plus, Sec22b a été reliée avec d'autres SNARE (VAMP-2, SNAP25) a une régulation à la baisse du transport des vésicules dans les synapses de patients ayant la maladie d'Alzheimer (Berchtold *et al.*, 2013).

SECTION 2 : RÉSULTATS

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

La problématique de l'étude est que les parasites ont développé des stratégies pour altérer les fonctions des cellules hôtes afin de survivre et de proliférer. Une des nombreuses stratégies à leur disposition est de contrôler le système de sécrétion, afin de limiter les cytokines pro-inflammatoires et ainsi diminuer le recrutement des cellules du système immunitaire (Reddick *et al.*, 2014). Les protéines SNAREs médient la fusion des membranes des différentes organelles et elles sont des cibles de clivage par la toxine *botulinum* (Botox) produite par la bactérie *Clostridium botulinum* et la toxine tétanique par la bactérie *Clostridium tetani* (Binz *et al.*, 2010). pour dérégler la sécrétion de différents médiateurs d'inflammation. Nous nous sommes concentrés sur ces SNAREs, plus précisément Sec22b, car lorsque son expression est diminuée, nous observons une diminution de la survie de *Leishmania* (mécanisme non connu) dans les cellules infectées (Young *et al.*, 2019). Notre étude se concentre sur l'effet de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires sur les cellules dendritiques dans lesquelles l'expression protéique de Sec22b est très réduite. Pour ce faire nous avons comme objectifs :

1. Étudier le transport protéique de médiateurs inflammatoires dans les cellules dendritiques dans un contexte inflammatoire.
2. Étudier l'effet du *knock-down* de la protéine SNARE Sec22b sur la sécrétion de médiateurs inflammatoires dans la lignée de cellules dendritiques JAWSII.
3. Analyser par quels mécanismes ou voies de signalisation Sec22b intervient lors de la sécrétion des médiateurs inflammatoires.

4 MATÉRIEL ET MÉTHODES

4.1 Culture cellulaire

4.1.1 RAW 264.7

La lignée cellulaire de macrophages murins leucémiques Raw 264.7 (TIB-71; American Type Culture Collection (ATCC)) a été cultivée dans du DMEM (Life Technologies) complété avec de la L-glutamine (Life Technologies) auquel il a été ajouté 10% de sérum de veau foetal (SVF) (Hyclone) inactivé à la chaleur pendant 30 min à 56°C, 20mM d'HEPES pH 7.4, de la pénicilline et de la streptomycine (100U/ml) (Life technologies). À l'avenir référé comme DMEM complet.

4.1.2 JAWSII

La lignée de cellules dendritiques murines JAWS II (CRL-11904; American Type Culture Collection (ATCC)) a été modifiée avec des petits ARN en épingle à cheveux (shARN) interférant avec le gène Sec22b ou un shARN aléatoire (Scr), ne ciblant aucun gène dans la cellule, nous a été donnée généreusement par le Dr. Sebastian Amigorena (CNRS centre national de la recherche scientifique, Institut Curie, France). Ces cellules ont été cultivées dans du RPMI 1640 (Life Technologies) complété avec de la L-glutamine (Life Technologies) avec 20% SVF et 10% GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) produit par la lignée cellulaire X63 en présence de 0.4mg/ml de puromycine.

4.2 Récolte de la moelle osseuse

Les macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMM) de souris 129B6 femelles âgés de 6 à 8 semaines (Charles River Laboratories) ont été différenciés, comme décrits précédemment [Descoteaux et Matlashewski 1989]. Les os du fémur et du tibia ont été récupérés et vidés avec une seringue montée d'une aiguille 26G (BD bioscience) contenant du milieu HBSS froid (Hank's Balanced Salt Solution) sans chlorure de calcium, sans chlorure magnésium, sans sulfate de magnésium, 20mM HEPES (Bioshop) pH 7.4 contenant de la pénicilline et de la streptomycine (100U/ml) (Life technologies). Elles ont été par la suite, centrifugées à 2000rpm pendant 7 min à 4°C et resuspendues dans 10ml de 0.17M NH₄Cl pH 7.4 sur glace pendant 7 min pour lyser les globules rouges. La réaction est arrêtée par l'ajout du double de HBSS. Les macrophages sont obtenus après une centrifugation à 2000rpm et resuspendus dans du DMEM complet (Life Technologies).

4.2.1 Différenciation des macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMM)

Les macrophages matures ont été adhérees et incubés pendant 24h à 37°C en présence de 5% CO₂ dans des pétris traités pour optimiser l'adhérence des cellules (Corning). Ensuite le surnageant contenant les précurseurs des BMM a été redistribué dans des pétris non adhérents (Sarstedt) pendant 6 jours. Afin de différencier les précurseurs de macrophages, il a été ajouté au DMEM complet 15% v/v de LCM (L929-cell Conditioned Medium) source de M-CSF (macrophage colony stimulating factor). Au jour 3,5 et 7, il est ajouté 1.5ml de LCM aux cellules. Après 6 jours de différenciation, au jour 8, on récupère les BMM sur glace dans du HBSS froid en

utilisant un grattoir. Afin de rendre les cellules quiescentes, avant les expériences, les cellules sont transférées dans des plaques à 6 ou 24 puits (Trueline) pendant 16h dans du DMEM complet sans LCM.

4.2.2 Différenciation de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDC)

Les cellules dendritiques ont été incubées dans du RPMI 1640 (Life Technologies) complété avec de la L-glutamine (Life Technologies) avec 10% SVF et 10% GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) produit par la lignée cellulaire X63. Après une incubation de 3 jours à 37°C en présence de 5% CO₂, 10ml de ce même milieu est ajouté au pétri. L'incubation se poursuit pendant 4 jours avant de récupérer les cellules dendritiques dans le surnageant. Afin de rendre les cellules quiescentes, avant les expériences, les cellules ont été transférées dans des plaques à 6 ou 24 puits (Trueline) pendant 16h après une centrifugation de 1200rpm pendant 7 minutes dans le RPMI contenant 10% SVF et 5% GM-CSF.

4.3 Électrophorèse et Western-Blot

Avant leur lyse, les macrophages ont été lavés dans du PBS contenant 1mM de sodium orthovanadate empêchant l'activité des phosphatases. Puis, les cellules ont été récupérées à l'aide d'un grattoir en présence de tampon de lyse contenant 1% Nonidet P-40 (Caledon), 50mM Tris-HCL (pH 7.5) (Bioshop), 150mM NaCl, 1mM EDTA (pH 8), et des inhibiteurs de protéases (Roche). Après une incubation à -70°C, les lysats ont été centrifugés à 15 000rpm 15 minutes afin de retirer tout débris cellulaire. Les échantillons ont été quantifiés avec la courbe standard de BCA (BiCinchoninic acid Assay) (Pierce, Rockford). Suite à leur séparation par SDS-PAGE, les

protéines ont été transférées sur une membrane nitrocellulose 0.45µM (GE Healthcare) pendant 30 min à 12 volts dans le Trans blot semi dry. La membrane a été bloquée 1h avec de la BSA 5% (albumine de sérum bovin) dans le tampon TBS 1X tween 0.1%, suivi d'une incubation à 4°C pendant la nuit dans l'anticorps primaire tableau 4.2, dilué dans une solution identique à celle du blocage. Le lendemain, après 3 séries de lavages, le 2^e anticorps HRP-conjugué approprié a été incubé pendant 1h à température ambiante. À la suite des 3 lavages, les membranes ont été incubées dans du ECL (GE Healthcare) et l'immuno détection des protéines est révélé par chimiluminescence sur des films (blue X-Ray film, Carestream). B-actine étant le contrôle de chargement. La densité est calculée sur la protéine à l'étude sur la β-actine.

Tableau 4.1 Listes des anticorps utilisés

INOS (D6B6S) Rabbit mAB #13120 Cell Signalling Technology (CST)	p38 MAPK (D13E1) Rabbit mAB #8690 CST	AKT Rabbit mAB #9272 CST
Sec22b Rabbit mAB #186003 Synaptic Systems	Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) Rabbit mAB #9101 CST	Phospho pKCa (gamma Thr514) Rabbit mAB #9379 CST
B-actin (D6A8) Rabbit mAB #8457 CST	p44/42 (ERK1/2) (137F5) Rabbit mAB #4695 CST	pKCa (D7E6E) Rabbit mAB #59754 CST
Phospho- SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Rabbit mAB #9251 CST	Phospho Stat1 (Tyr701) (D4A7) Rabbit mAB #7649 CST	IκKB (44D4) Rabbit mAB #4812 CST

JNK2 (56G8 Rabbit mAB #9258 CST	STAT1 (42H3) Rabbit mAB #9175 CST	NF- κ B p65 (D14E12) Rabbit mAB #8242 CST
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) Rabbit mAB #4511 CST	Phospho AKT (Ser473) (D9E) Rabbit mAB #4060 CST	Phospho-Tyrosine 1000 Rabbit mAB #8954 CST

4.4 Microscopie confocale par immunofluorescence

Suite aux différents traitements, les macrophages ou les cellules dendritiques ont été fixés sur des lamelles rondes avec 2% de paraformaldéhyde (Pierce, Rockford) pendant 20 min à température ambiante. Le blocage/perméabilisation des cellules a été fait pendant 17 minutes dans une solution contenant 1% Triton, 1% BSA, 2% de sérum de chèvre, 6% de lait écrémé en poudre et 50% de sérum de veau fœtal. Après 3 lavages au PBS 1X, les lamelles ont été incubées avec l'anticorps primaire (tableau 4.1) dilué dans du PBS 1X. Suite aux mêmes séries de lavage, un mélange de 2^e anticorps soit Alexa Fluor 488 goat anti-lapin ou anti-souris et Alexa Fluor 568 goat anti-lapin ou anti-souris (Molecular Probes) avec du DAPI (Molecular Probes) ont été dilué dans du PBS 1X et incubé durant 35 minutes dans le noir. Après les lavages, le Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates) a été utilisé pour monter les lames et sellé avec du vernis à ongles (Sally Hansen). Les images des macrophages ou cellules dendritiques ont été obtenues avec le microscope LSM780 (Carl Zeiss Microimaging) et un objectif de 63X. L'analyse des images, la colocalisation et les mesures des délimitations du noyau ou de la membrane cellulaire ont été effectuées avec le logiciel Zen 2012.

4.5 Imagerie de cytométrie en flux

Les cellules dendritiques ou macrophages stimulées ou non au LPS ont été fixés comme pour le confocale. Le tampon de perméabilisation contenant 0.1% azide, 5mM EDTA, 1% de sérum de cheval dans du PBS 1X avec 0.1% de saponine. Les étapes de lavages subséquentes ont compris une centrifugation à 1200rpm pendant 7 minutes. Pour bloquer les sites non spécifiques, 0,01mg/ml de 2.4G2 a été ajouté aux cellules pendant 10 minutes à 4°C. L'anticorps dirigé contre NF-κB p65 (#6956 CST) a été ajouté pendant 45 minutes à 4°C. Après lavage l'anticorps secondaire a été ajouté pendant 45 minutes à 4°C. Un lavage a été effectué et ensuite un autre lavage avec le même tampon sans saponine avant d'ajouter le DAPI 10 minutes à température pièce. Finalement, un dernier lavage a permis d'enlever l'excédent et le tout a été resuspendu dans un tube eppendorf pour l'analyse. Les cellules dendritiques ont été acquises utilisant l'ImageStreamX MKII cytométrie en flux et analysée avec le logiciel IDEAS (Amnis, Seattle, WA, USA). 50.000 cellules ont été acquises par imagerie et analysé à l'aide d'un masque délimitant le noyau de la cellule pour calculer un score de transfection du signal de NF-κB dans le noyau. Cette analyse mesure la corrélation de chaque pixel de DAPI et de NF-κB dans chaque cellule, un score >1 est une transfection au noyau et <1 à l'opposé est une absence de translocation au noyau. Des cellules individuelles ont été vérifiées pour valider la correspondance du score. Le pourcentage de cellules transloqué au noyau est ainsi calculé sur la population de cellules acquise.

4.6 Production des lentivirus et transduction shARN knockdown Sec22b

Les transfections shARN ont été effectuées comme décrits précédemment (Cebrian *et al.*, 2011). Sommairement, les plasmides codant pour les lentivirus qui expriment les shRNAs ont été obtenus de la librairie des regroupements de RNAi (The RNAi Consortium (TRC) (Moffat *et al.*, 2006). Les trois plasmides ont été transfectés dans les cellules HEK293T qui contient une mutation de l'antigène large T SV40 permettant aux cellules embryonnaires du rein de produire efficacement des rétrovirus contenant la région SV40 à l'origine de réplication.

Sec22b #1 (séquence cible

```
CCGGCCACTGTGTCTAGGCCCTATTCTCGAGAATAGGGCCTAGACACATGGTTTTTG)
```

Sec22b #2 (séquence cible

```
CCGGCCCTATTCTTCATCGAGTTTCTCGAGAACTCGATGAAGGAATAGGGTTTTTG)
```

La lignée cellulaire de cellules dendritiques JAWS-II (CRL-11904; American Type Culture Collection (ATCC) a été infecté par les virus et sélectionnée avec la puromycine (40µg/ml). Le niveau de knock-down de Sec22b a été observé par western-blot.

4.7 Traitement siARN contre Sec22b

5x10⁴ macrophages murins (RAW 264.7) ont été mises en contact avec 25nM total des siARN Sec22b (s73496 ambion), non targeting pool (D-001810-10-05 ON-TARGETplus thermo scientific) ou un siARN GFP (VINAB-000007) dont la séquence est 5'-AAGAACGGCAUCAAGGUGAACUU-3'. Les siARN sont mélangés au préalable dans un milieu OPTI-MEM I (Gibco 11058-021) réduit en

sérum, compléter avec de la L-glutamine et HEPES en présence d'un μ l de Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen 13778-030) par réaction pendant 20 minutes à température pièce. Ensuite le tout est ajouté aux cellules en plus de DMEM vierge. L'incubation dure 4h à 37°C. Par la suite, le milieu est échangé avec du milieu complet avec ou sans 100ng/ml de LPS pendant 24h. Le surnageant est récupéré pour l'analyse de l'oxyde nitrique et les cellules sont lysées voir la section western-blot.

4.8 ELISA (IL-6 et TNF)

Les kits d'ELISA ont été utilisés selon les directives des fabricants pour quantifier la sécrétion de l'IL-6 murin (BD OptiEIA BD Bioscience) et du TNF (Ready-SET-Go! TNF- α Kit; eBioscience)

4.9 L'extraction d'ARN, RT-PCR et qPCR

L'ARN a été extrait des cellules dendritiques JAWS II sh-ARN suite à la stimulation au LPS avec le TRIzol (Invitrogen) en suivant les directives du fabricant. Les transcriptions inverses ont été conduites comme précédemment décrites (Giroux *et al.*, 2003). Ensuite, les ADN complémentaires ont été utilisés pour les PCR ou les PCR en temps réel (qPCR) selon les amorces suivants :

Tableau 4.2 Amorces pour les différents PCR ou qPCR

HPRT	Sens 5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3'
	Antisens 5'-GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC-3'
iNOS (Q-PCR)	Sens 5'-CTGCTGGTGGTGACAAGCACATTT-3'

	Antisens 5'-ATGTCATGAGCAAAGGCGCAGAAC-3'
TNF (Q-PCR)	Sense 5'-GACGTGGAAGTGGCAGAAGAG- 3'
	Antisens 5'-TGCCACAAGCAGGAATGAGA-3'
IL-6 (Q-PCR)	Sens 5'-ACAACCACGGCCTTCCCTACTT-3'
	Antisens 5'-CACGATTTCCAGAGAACATGTG
IL-10 (RT-PCR)	Sens 5'-CTGCTATGCTGCCTGCTCTTA-3'
	Antisens 5'-CTGGAGTCCAGCAGACTCAAT-3'
IL-12 (RT-PCR)	Sens 5'-CGTGCTCATGGCTGGTGCAAAG-3'
	Antisens 5'-CTTCATCTGCAAGTTCTTGGGC-3'
COX-2 (RT-PCR)	Sens 5'-CCCCTTCTTGCGAAGTTTAATC-3'
	Antisens 5'-GCATCTGGACGAGGTTTTTCC-3'

Toutes les amorces sont de Integrated DNA technologies (IDT)

Les PCR ont été analysées par électrophorèse dans un gel d'agarose 1.8% (w/v) et pris en photo par l'Alphamager 3400 (Alpha Innotech) La qPCR a été réalisé suite à la transcription inverse en utilisant 10µl de SYBR green super mix Perfecta (Quanta), 7µl d'H₂O pour chromatographie de qualité HPLC autoclavée, et 1µl des oligonucléotides ci-dessus et 2µl de l'ADN complémentaire des cellules JAWS II sh-ARN Scr ou Sec22b stimulé ou non au LPS. Les conditions du PCR ont été les suivantes : 95°C pendant 10 minutes suivis de 40 cycles commençant par 10 sec à 95°C, 15 sec à 60°C et se terminant par 20 sec à 72°C. Après il y a une étape de 95°C pendant 1 minute, 72°C pendant 45 sec et 95°C pendant 30 sec terminant le PCR. L'acquisition a été effectuée sur la machine MX3000P (Stratagene).

4.10 Stimulation au LPS ou agoniste

Dans des plaques de 24 puits, 3×10^5 cellules BMM, BMDC ou JAWS II ont été ajoutés dans un volume total de 500 μ l de milieu RPMI avec 100ng/ml de LPS d'*E.coli* Serotype O127:B8 (Sigma-Aldrich) pendant 24h. Le surnageant est récolté et analysé en quantité de nitrite retrouvé avec la réaction de Griess et la convertir en quantité d'oxyde nitrique relâché à l'aide de la courbe standard. Les stimulations avec différents agonistes comme décrit ci-dessus avec 40 μ g/ml de Peptidoglycan (PGN) (Sigma-Aldrich), du Zymosan (Sigma-Aldrich) dans un ratio 1:15, de l'imiquimol (Sigma-Aldrich) 12.5 μ g/ml, et le CpG oligodéoxynucléotide (Sigma-Aldrich) 4 μ g/ml. Le contrôle est du milieu DMEM.

4.11 Stimulation au LPS en présence d'inhibiteurs

Pour les conditions utilisant des inhibiteurs ceux-ci ont été incubés avec les cellules pendant 2h avant la stimulation au LPS et pendant toute l'expérience. Les concentrations finales des inhibiteurs sont de 5 μ g/ml pour la Brefeldin A (Sigma-Aldrich), 5 μ M pour la Monensin (Sigma-Aldrich) et 100 μ M pour Retro-2 (Sigma-Aldrich). Le contrôle utilisé est le solvant dans lequel ces produits ont été resuspendus soit le DMSO dans les mêmes dilutions.

4.12 Quantification de l'oxyde nitrique

La réaction de Griess consiste à utiliser 100 μ l de surnageant d'un échantillon et le mettre en présence de 100 μ l d'un mélange final contenant 1% de sulfanilamide dans 2.5% d'acide phosphorique et 0,1% de N-(1-naphtyl) ethyl enediamine (Sigma-Aldrich). La réaction dure 30

minutes et l'absorbance est mesurée à 570nm. Le NaNO_2 est utilisé pour la courbe standard pour déterminer la quantité de NO_2^- sécrété par les cellules à ce temps précis.

RÉSULTATS

1. L'inhibition du transport protéique diminue la production de l'oxyde nitrique dans les cellules dendritiques et dans les macrophages

Pour définir les conditions de l'étude, afin d'accomplir nos objectifs, il était primordial d'avoir un contrôle positif connu qui altère la sécrétion des cytokines TNF, IL-6 et de l'oxyde nitrique dans les conditions inflammatoires tel que le LPS, dans les cellules dendritiques et les macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDC, BMM). Pour évaluer l'inhibition de la sécrétion des médiateurs inflammatoires sur les cellules dendritiques et les macrophages, nous avons préincubé pendant 2h les cellules avec des inhibiteurs chimiques du transport protéique. La brefeldin A bloque le transport des protéines du réticulum endoplasmique vers le Golgi, la monensin et le rétro-2 inhibent le transport protéique du cis-Golgi vers le trans-Golgi et de l'endosome vers le Golgi respectivement. Par la suite, le LPS a été ajouté pendant 24h. Puis le surnageant a été récupéré et analysé à l'aide de la réaction de Griess déterminant les niveaux de nitrites relâchés. Ceci indirectement nous informe de la quantité d'oxyde nitrique relâché. Le TNF et IL-6 ont été quantifiés à l'aide de la méthode ELISA. La brefeldin A, a diminuée grandement la sécrétion d'oxyde nitrite et de TNF, comme attendu (Figure 2.1A). La sécrétion de l'oxyde nitrique est diminuée dans les deux cas, mais pour le TNF, dans les BMM, il n'y avait pas de diminution statistiquement significative pour le rétro-2 et même une augmentation pour la monensin (Figure 2.1A). C'est pour cette raison que nous avons gardé la brefeldin A pour inhiber le transport protéique en majorité pour le reste de l'étude. Par la suite, nous avons continué notre

investigation en amont de l'oxyde nitrique soit sa production par l'enzyme iNOS. Par Western-Blot nous avons remarqué après analyse une diminution du niveau protéique d'iNOS par la brefeldin A après 24h d'incubation au LPS pour les BMDC et les BMM (Figure 2.1B). Donc, étant donné que la production de l'enzyme est altérée par l'inhibiteur de transport protéique la production de l'oxyde nitrique diminue et ainsi réduit sa sécrétion à l'extérieur de la cellule malgré un stimulus d'inflammation dans les BMM et les BMDC.

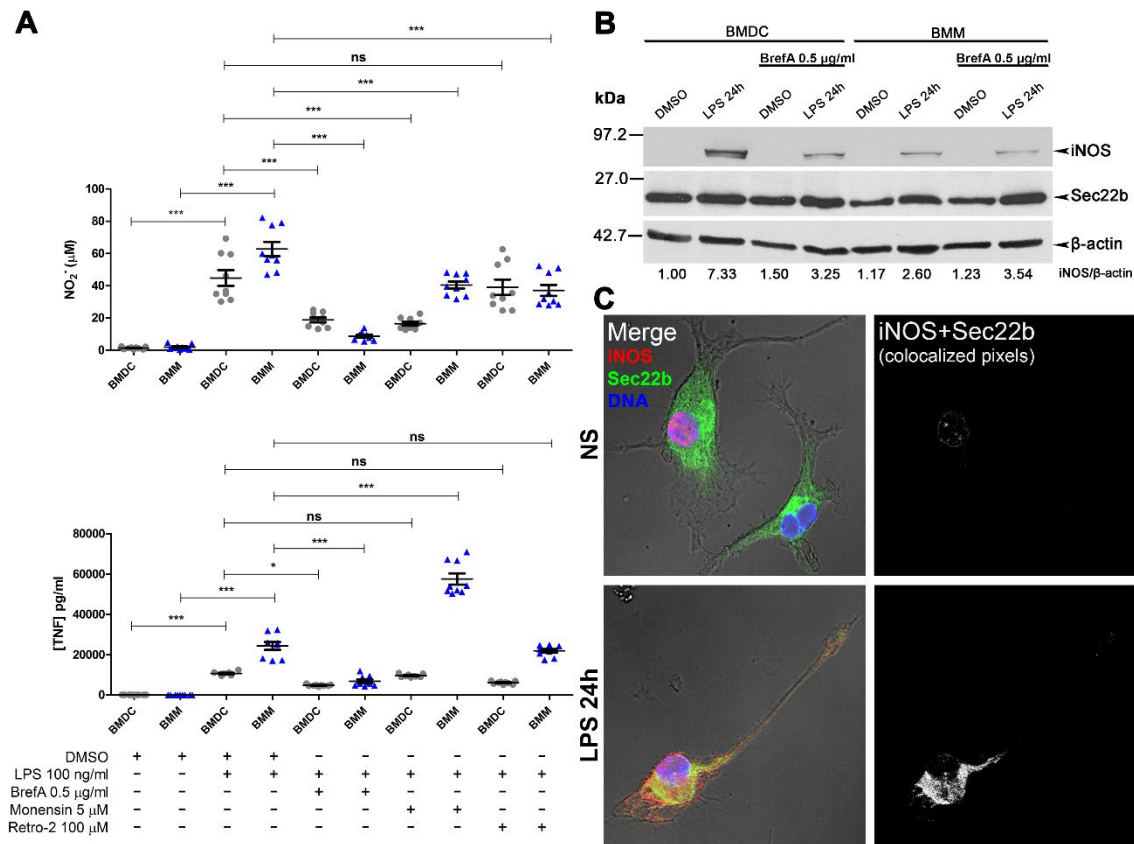


Figure 2.1 L'inhibition du transport protéique diminue la production de l'oxyde nitrique dans les cellules dendritiques et dans les macrophages.

Les cellules ont été pré-incubées 2h avec des inhibiteurs du transport protéique, entre le réticulum endoplasmique et le Golgi, avant d'être stimulé avec le LPS pendant 24h. La réaction

de Griess a été réalisé avec le surnageant de ces cellules et a été utilisé pour quantifier indirectement la sécrétion d'oxyde nitrique relâché. Le TNF a été quantifié à l'aide du test ELISA. LE DMSO est le contrôle des solvants des différents inhibiteurs (**A**). Le lysat de ces mêmes cellules a été analysé en Western-Blot pour le niveau protéique d'iNOS. La densité est l'intensité de la bande d'iNOS divisés par celle de β -actine (**B**). Par imagerie confocale des cellules dendritiques ont été marquées avec différents fluorochromes pour la colocalisation des pixels en blanc, d'iNOS en rouge et Sec22b en vert. Le DAPI est en bleu pour l'ADN (**C**). Les expériences ont été répliquées 3 fois et analysées statistiquement avec un test ANOVA *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, non significative; DMSO, dimethyl sulfoxide; BrefA, Brefeldin A.

2. La SNARE sec22b contrôle le niveau de sécrétion de l'oxyde nitrique du TNF et d'IL-6

Les protéines SNAREs sont responsables du transport des vésicules à l'intérieur de la cellule. Une de celles-ci, Sec22b est localisé au ERGIC, un compartiment associé au réticulum endoplasmique et au Golgi (Stow *et al.*, 2013). Par microscopie, nous avons voulu examiner si elle colocalisait avec iNOS pour lier l'effet rencontré par l'inhibition du transport protéique avec Sec22b (Figure 2.1C). Dans les BMDC la colocalisation des deux protéines en condition inflammatoire démontre une proximité suggérant que Sec22b pourrait réguler iNOS. De leur nature non immortalisés les BMDC de la moelle osseuse des souris, nous avons utilisé par souci de reproductibilité une lignée stable de cellules dendritiques (JAWSII), ayant été soumis à des sh-RNA avec le gène codant pour Sec22b et une lignée contrôle avec une séquence ne ciblant aucun gène (Scramble), gracieusement donné par le laboratoire du Dr. Sébastien Amigorena (CNRS centre national de la recherche scientifique, Institut Curie, France). Une cinétique de 2 à 24h en condition inflammatoire a été réalisée en observant la sécrétion de l'oxyde nitrique et des cytokines TNF

et IL-6 sur les JAWSII. La corrélation entre la diminution de la sécrétion et l'absence de Sec22b est statistiquement significative dès 12h de stimulation, et ce jusqu'à 24h (Figure 2.2A). Pour vérifier si cet effet était dû seulement au LPS nous avons testé différents agonistes de TLR (PGN et le zymosan pour le TLR 2, Imiquimol pour le TLR7 et le CpG pour le TLR 9) et chacun d'eux avait une sécrétion moindre en absence de Sec22b que son contrôle Scramble pour le relâchement d'oxyde nitrique (Figure 2.2B). Quant au TNF et le IL-6, seuls le PGN, le Zymosan et l'imiquimol ont une tendance similaire à la baisse en absence de Sec22b (Figure 2.2B). Par la suite, nous avons vérifié si les JAWS II se comportaient comme les BMDC et les BMM en présence d'inhibiteurs de transport protéique et qu'aucune synergie ou effet compensatoire se produisait. L'ajout d'inhibiteur, soit la brefeldin A, la monensin ou le rétro-2 à la lignée de cellules dendritiques JAWS II n'a pas influencé la sécrétion de NO, de TNF ou d'IL-6. La lignée de cellules dendritiques JAWS II *knocked down* en Sec22b sécrètent moins d'oxyde nitrique, de TNF et d'IL-6 que leur contrôle Scramble (Figure 2.2C). En somme ces résultats démontrent un effet important sur la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires quand l'expression de la SNARE Sec22b est réduite.

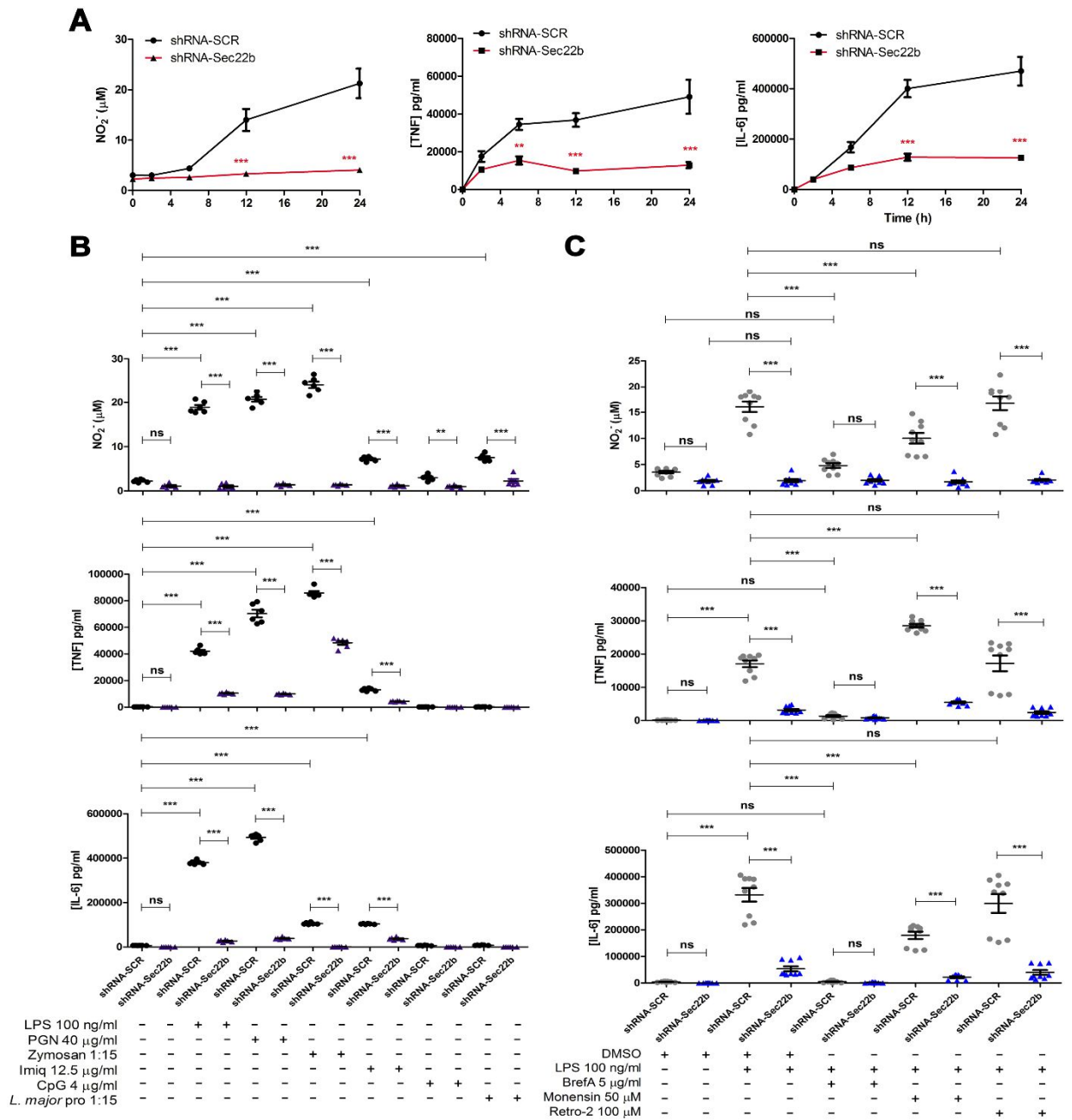


Figure 2.2 La SNARE sec22b contrôle le niveau de production d'iNOS du TNF et d'IL-6

Les cellules dendritiques JAWSII *knocked-down* en Sec22b ou contrôles ont subi une stimulation au LPS durant 2h, 6h, 12h et 24h (A). Les cellules dendritiques ont été incubées avec des agonistes de différents TLR pendant 1h (B). Les inhibiteurs de transport protéique ont été préincubés 2h avant la stimulation au LPS. Pour chaque figure, soit A B et C la sécrétion d'oxyde nitrique a été effectuée avec le surnageant des cellules avec la réaction de Griess, tandis que des tests ELISA

ont été conduits pour les cytokines TNF et IL-6 (C). Les expériences ont été répliquées 3 fois et analysées statistiquement avec un test ANOVA *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ ns, non significatif; DMSO, dimethyl sulfoxide; BrefA, Brefeldine A; PGN, peptidoglycan; Imiq, l'imiquimol; CpG, le motif CpG oligodéoxynucléotide; *L.major* pro, le parasite *Leishmania major* sous sa forme promastigote.

3. L'absence de la SNARE sec22b module le niveau protéique et d'ARN messenger d'iNOS et des cytokines

Afin de comprendre à quel niveau Sec22b régule les cytokines, les JAWSII ont été soumises aux mêmes conditions que les BMM et BMDC, soit une préincubation à la brefeldin A pendant 2h ainsi qu'une stimulation au LPS pendant 12h ou 24h, pour étudier sa relation avec l'enzyme iNOS. Suite aux Western-Blot, les niveaux protéiques d'iNOS furent réduits comme ceux par l'inhibition chimique par brefeldin A (Figure 2.3A). Suite à ces expériences, nous nous sommes dirigés encore plus en amont vers l'ARN messenger d'iNOS et des différentes cytokines soit TNF et IL-6. Après l'extraction de l'ARN et la conversion en ADN complémentaire, des qPCR en temps réel ont été conduites sur des segments de ces gènes. Les analyses ont démontré qu'en inhibant Sec22b, les niveaux d'expression des ARNm diminuent grandement pour *Nos2*, *Tnf*, *Il-6* (Figure 2.3B). Également, par RT-PCR d'autres cytokines pro-inflammatoires comme *Il-12* et l'enzyme *Cox-2* ont un niveau d'expression d'ARNm réduit y compris même la cytokine anti-inflammatoire *Il-10* (Figure 2.3C). En somme, la diminution de l'expression de Sec22b diminue les niveaux d'ARNm d'iNOS et des cytokines pro et anti-inflammatoires.

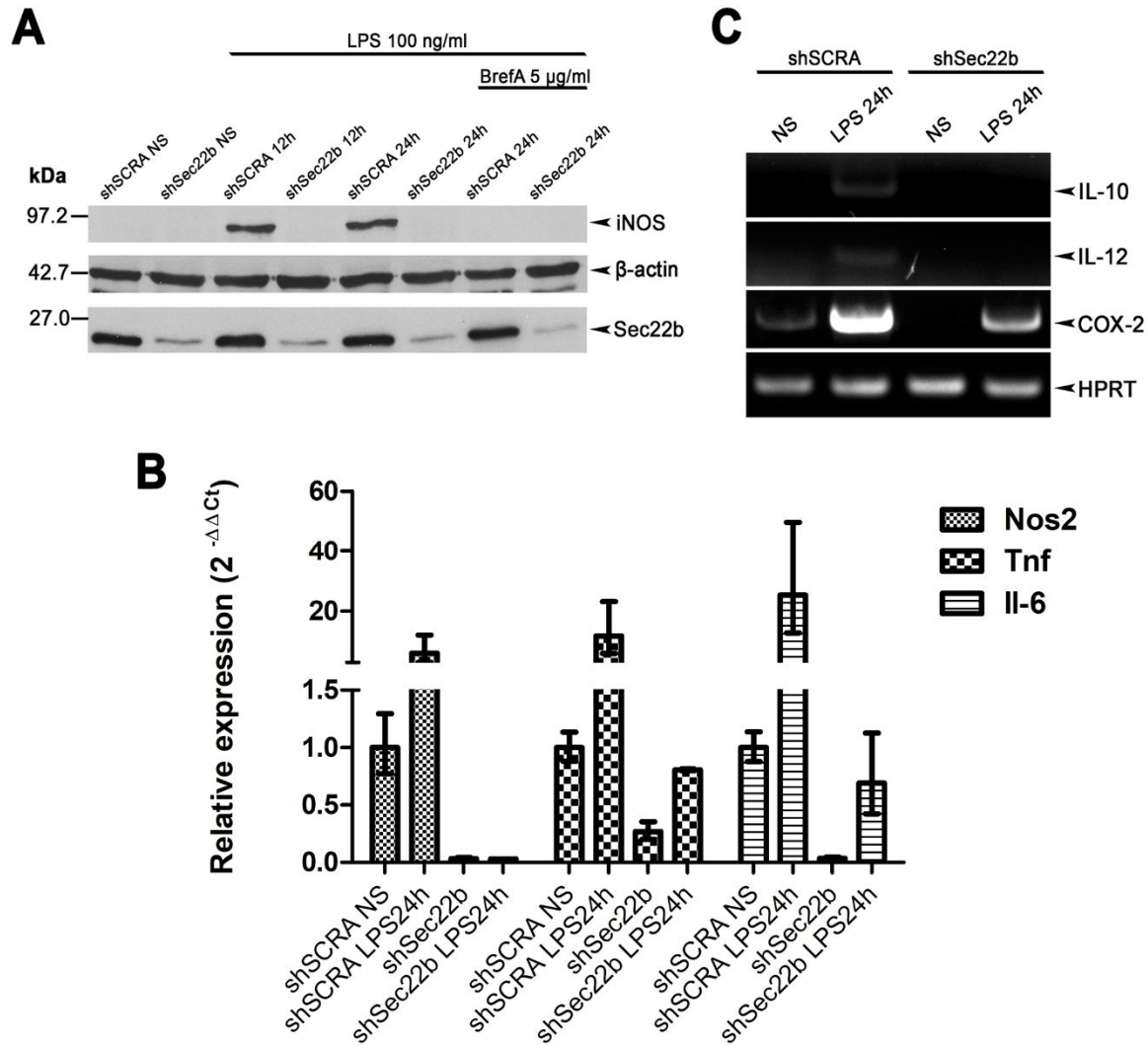


Figure 2.3 L'absence de la SNARE sec22b module le niveau protéique et le niveau d'ARN messager d'iNOS et des cytokines

Des cellules dendritiques ont été knock-down avec un shARN ciblant la SNARE Sec22b. Elles ont été préincubées 2h avec un inhibiteur de transport protéique, puis lysées et analysées par Western-Blot pour évaluer les niveaux protéiques d'iNOS (A). L'ARN des cellules dendritiques stimulées ou non au LPS a été récupéré et soumis à la transcription inverse pour quantifier par qPCR iNOS(*Nos2*), le TNF (*Tnf*) et l'IL-6 (*Il-6*) en triplicata (B). Ce même ARN a été utilisé aussi pour étudier le niveau d'ARN de différentes cytokines pro (IL-12) ou anti-inflammatoires (IL-10) (C). Le

gène constitutif *Hprt* a été le contrôle interne des expériences B et C. L'expérience en B représente un seul réplicat et ont été normalisé sur le shRNA aléatoire (Scr) non stimulé (NS).

4. La régulation des MAPK au niveau protéique est perturbée par une diminution de la SNARE Sec22b

Une fois que la diminution de l'expression d'ARN démontrée sur l'iNOS, le TNF et l'IL-6, nous avons évalué les mécanismes potentiels impliqués dans cette baisse de transcription. Dans la cascade de réaction suivant la reconnaissance du LPS par le TLR les MAPkinases sont les seconds messagers relayant l'information en aval. De ce fait, nous avons exploré dans des conditions inflammatoires le profil de phosphorylation des MAPK chez les cellules dendritiques, sur un intervalle variant de 15 minutes à 4 heures (Figure 2.4A). Après l'analyse, certaines kinases comme JNK, I κ B étaient moins phosphorylées dans les JAWSII sh-ARN contre Sec22b et d'autres comme pp38 était augmenté (Figure 2.4B). Le changement le plus flagrant était JNK et I κ B à 15 et 30 minutes malgré un test statistique concluant que les différences étaient non significatives (Figure 2.4B). Bref, le profil de phosphorylation de certaines MAPK au niveau protéique est altéré en absence de Sec22b.

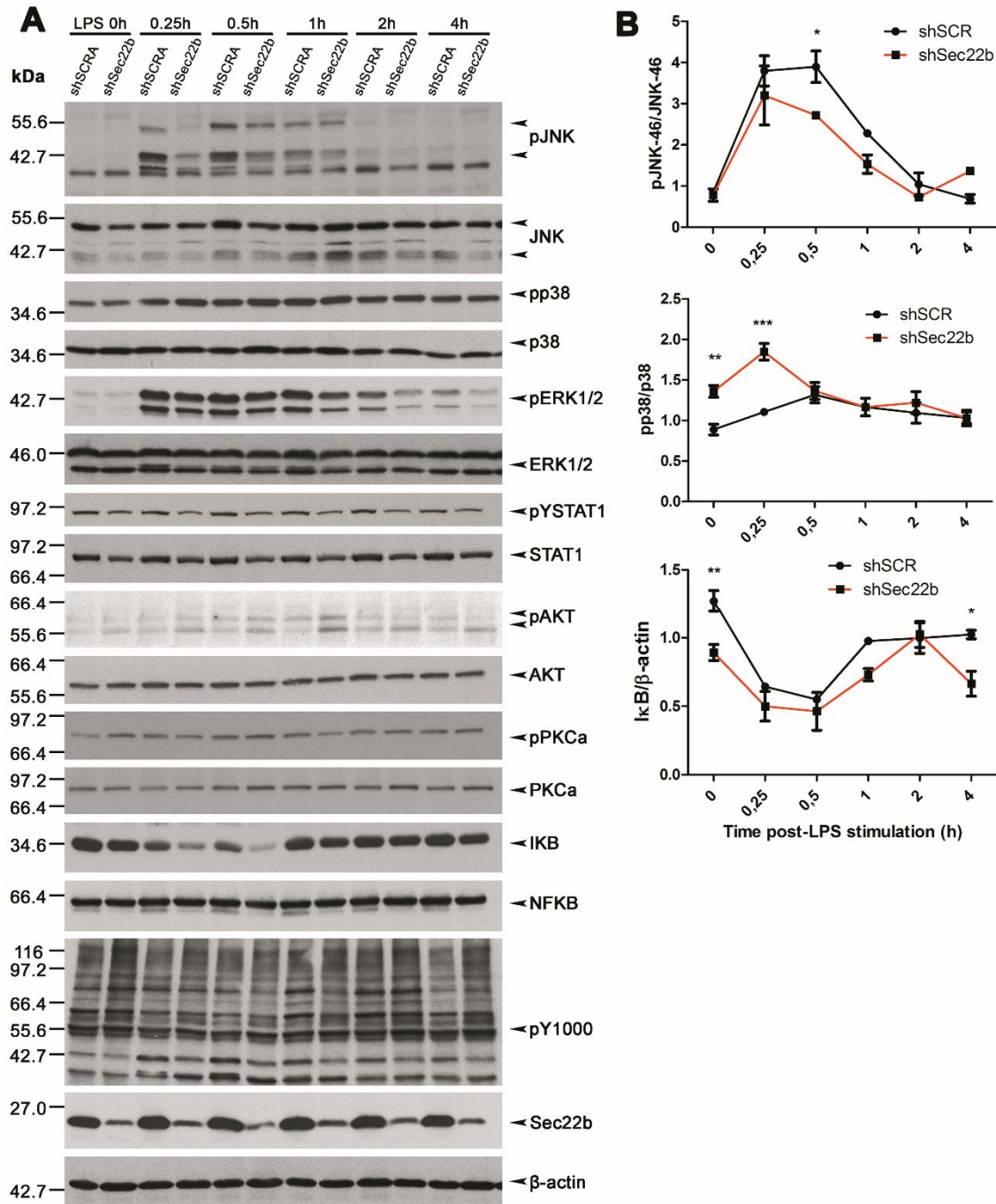


Figure 2.4 La régulation des MAPK au niveau protéique est perturbée par une diminution de la SNARE Sec22b

Les cellules dendritiques *knocked-down* pour Sec22b et contrôles ont été stimulés au LPS pendant 15 mins, 30 mins, 1h, 2h et 4h. Le niveau de protéines JNK, p38, ERK1/2, YSTAT, AKT, PKCa, I κ B, NF- κ B, Y1000 ainsi que leur état de phosphorylation ont été observés par Western Blot

et quantifiés par densitométrie avec la β -actin comme contrôle (**A**). La cinétique du ratio protéine phosphorylée/protéine totale ou protéine totale/ β -actin a été analysé statistiquement avec un test ANOVA *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. β -actine a été le témoin de chargement.

5. La translocation de NF- κ B au noyau en contexte inflammatoire est diminuée en absence de Sec22b

Suite aux analyses des niveaux de phosphorylation de JNK et d'I κ B en absence de Sec22b, nous avons été intéressés par le profil d'I κ B, l'inhibiteur du facteur de transcription NF- κ B. Quand il y a une dissociation, ce dernier est libre, et se transloque au noyau par des importines afin de promouvoir la transcription de certains gènes (Figure 1.1) (Fagerlund *et al.*, 2005). Nous avons utilisé l'immunofluorescence afin de monitorer par microscopie confocale la translocation au noyau de NF- κ B (Figure 2.5A). En comparant l'intensité du signal de NF- κ B au noyau contre celui dans toute la cellule nous avons remarqué qu'en absence de Sec22b il y avait moins de translocation de NF- κ B au noyau (Figure 2.5A), mais Sec22b et NF- κ B ne sont pas colocalisées au même endroit dans la cellule après une stimulation au LPS (Figure 2.5B). Nous avons aussi observé une diminution de la translocation de NF- κ B au noyau par imagerie confocale couplée à une FACS (Image Stream) afin de regarder cet effet sur une population de cellule plus élevée soit 50 000 dans ce cas-ci (Figure 2.5C). Ainsi, l'altération de la protéine Sec22b par sh-ARN diminue le niveau de translocation au noyau de NF- κ B en condition d'inflammation.

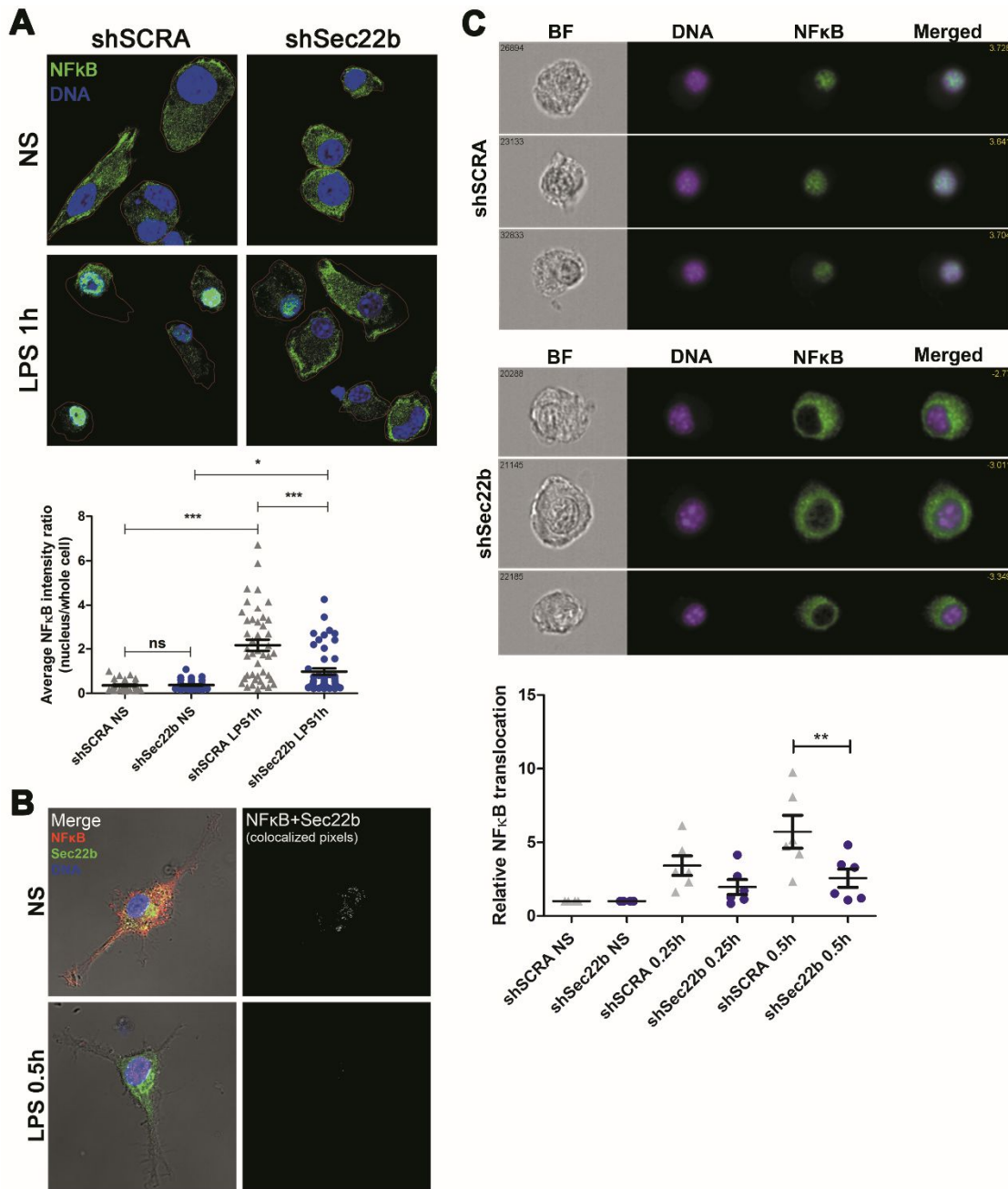


Figure 2.5 La translocation de NF- κ B en contexte inflammatoire est diminuée en absence de Sec22b

Les cellules dendritiques ont été stimulées avec le LPS pendant 1h et analysé par microscopie confocale l'aire de la cellule et du noyau a été délimitée sur le canal *Brightfield*. La moyenne du ratio de l'intensité du signal correspondant au NF- κ B (vert) dans le noyau comparé au signal contenu dans toute la cellule (A). Les cellules dendritiques stimulées au LPS 30 minutes ont été

analysées afin de colocaliser le signal de NF- κ B et celui de Sec22b. En condition de stimulation, la colocalisation des 2 protéines marquées diminue (**B**). Par cytométrie en flux couplé à un confocale prenant des photos individuelles de chaque cellule. Dans les cellules déficientes en Sec22b la translocation de NF- κ B au niveau du noyau diminue comparé aux cellules dendritiques shSCRA (**C**). Les données ont été analysées statistiquement avec un test ANOVA *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

6. Le traitement siARN contre Sec22b diminue la production d'oxyde nitrique et diminue le niveau protéique d'iNOS

Selon certains laboratoires, les tests sur les JAWSII avec un sh-ARN de Sec22b l'effet observé ne serait pas dû à la protéine, mais à des cibles différentes du sh-ARN (Wu *et al.*, 2017). Nous avons démontré par siARN sur des macrophages que la séquence ciblant le gène Sec22b (Figure 2.6) est bel et bien responsable du même effet observé tout au long de l'étude dans les cellules dendritiques. La diminution de la protéine iNOS suite au traitement au siARN contre Sec22b dans la lignée de macrophages RAW 264.7 (Figure 2.6A) a confirmé l'effet observé dans les cellules dendritiques (Figure 2.3A). Par la suite, le niveau d'oxyde nitrique fût analysé à l'aide du surnageant des cellules stimulées au LPS pendant 24h (Figure 2.6B). Les cellules ont sécrété moins de NO que celles n'ayant pas reçu de siARN. Nous avons vérifié aussi par Western-Blot le niveau protéique de Sec22b pour nous assurer que le traitement siARN avait bien fonctionné (Figure 2.6C). En somme la séquence d'ARN ciblé contre le gène de Sec22b dans les macrophages reproduit les mêmes observations que celles dans les cellules dendritiques.

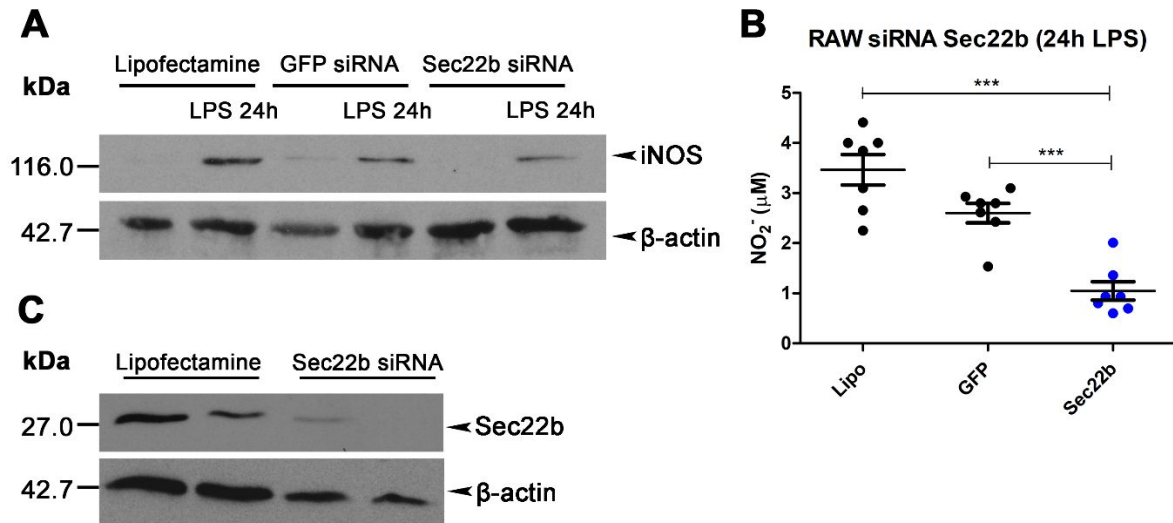


Figure 2.6 Le traitement siARN contre Sec22b diminue la production d'oxyde nitrique et diminue le niveau protéique d'iNOS

Des cellules RAW 264.7 ont subi un traitement au siARN dirigé contre les ARN messager codant pour la protéine Sec22b pendant 4h. Après une incubation au LPS pendant 24h les niveaux protéiques d'iNOS ont été observés par Western-Blot (A). Les niveaux d'oxyde nitrique ont été analysés à l'aide du surnageant de ces cellules par la réaction de Griess (B). La spécificité des ARN interférant a été observée en analysant les niveaux protéiques de Sec22b par Western-Blot (C). Les données ont été analysées statistiquement avec un test ANOVA *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Lipo, Lipofectamine; RAW, RAW 264.7.

DISCUSSION

Notre système immunitaire est très sophistiqué afin de combattre les pathogènes avec une multitude de stratégies à notre disposition. Les systèmes inné et adaptatif utilisent les cytokines et chimiokines pour signaler aux cellules immunitaires de se diriger au site de l'infection (Kawasaki *et al.*, 2014). Par contre, les pathogènes ont développés certains mécanismes pour déréguler cette signalisation et même prendre le contrôle de la machinerie de transport des protéines afin de ralentir l'efficacité des microbicides, et leur sécrétion, afin d'établir l'infection et proliférer au sein d'un milieu hostile à leur survie (Geiger *et al.*, 2016). En étudiant les SNAREs, protéines au cœur du transport et sécrétion des cytokines, nous pouvons approfondir nos connaissances sur les mécanismes d'actions qu'elles ont dans un contexte d'infection, afin de comprendre la dynamique et l'ampleur des dommages causés par un manque ou une dérégulation de celles-ci par les pathogènes (Matte *et al.*, 2016). L'inflammation est un moyen de détruire efficacement les pathogènes s'ils sont détectés correctement. Les cellules présentatrices d'antigènes (APC), comme les cellules dendritiques, lient le système inné au système adaptatif et de ce fait sont un bon modèle pour étudier la réaction inflammatoire ainsi que le relâchement des cytokines pour contrôler l'infection.

Avec le LPS, comme inducteur de l'inflammation par la voie signalétique du récepteur TLR4, (Park *et al.*, 2013), nous avons observé, dans les cellules dendritiques, en absence de Sec22b une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Le rôle de Sec22b n'est pas bien établi dans le mécanisme empêchant la survie de certains parasites intracellulaires (Cebrian *et*

al., 2011). En utilisant une lignée cellulaire déficiente majoritairement en Sec22b sh-RNA nous avons étudié l'effet qu'elle avait sur la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires TNF, IL-6 et l'oxyde nitrique. Il aurait été intéressant de continuer l'étude du profil de sécrétion d'autres cytokines comme le l'IFN- α ou l'IFN- γ pour observer si leur sécrétion est aussi liée à la SNARE Sec22b en condition d'inflammation.

Nous voulions nous assurer que la diminution de cette synthèse n'était pas due au récepteur TLR4 en particulier. Nous avons donc utilisé plusieurs agonistes des TLR connus pour induire une réponse inflammatoire soit le PGN et le zymosan pour le TLR2, l'Imiquimod pour le TLR7 et le CpG pour le TLR9 (Adams, 2009). Le parasite *Leishmania* a été utilisé pour recréer une infection médiée par le TLR 4 et 2 en utilisant le LPG (lipophosphoglycan) à sa surface (Tuon *et al.*, 2008). Le parasite ne veut pas provoquer l'inflammation pour survivre à l'intérieur de l'hôte, donc nous observons peu de stimulation IL-6 et de TNF à la figure 2.2B.

En utilisant comme contrôle plusieurs inhibiteurs connus pour les transports protéiques antérogrades et rétrogrades soit la Brefeldin A, la Monensin et la Rétro-2 (Mishev *et al.*, 2013) nous avons observé une baisse significative des cytokines relâchées par les macrophages et les cellules dendritiques seulement dans le cas de la Brefeldin A peut-être parce que d'autre SNARE peuvent compenser l'effet de Sec22b comme Ykt6 et donc créer une redondance dans les fonctions de ceux-ci (Liu *et al.*, 2002). De plus, l'effet de diminution est au niveau de l'ARN messenger donc la protéine n'est pas synthétisée en grande quantité observée par les Western-

Blot (Figure 2.3). Il est possible de croire que les cellules ne produisant pas de cytokines pro-inflammatoires ne devraient donc pas produire de cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 ou il n'est pas transporté à l'extérieur de la cellule aussi (Gandhi *et al.*, 2017). IL-12 est une cytokine aussi pro-inflammatoire seulement synthétisée lorsque les cellules dendritiques sont activées et présentent des antigènes à leur surface et permet la synthèse de l'IFN- γ (Fukao *et al.*, 2001). Selon ses observations, la SNARE Sec22b aurait plusieurs cytokines cibles à transporter. Il était possible que les dendritiques ne répondaient pas au signal du LPS. Pour ce faire nous avons utilisé COX-2, une enzyme induite par le LPS (Font-Nieves *et al.*, 2012) et qui est responsable de la synthèse des médiateurs inflammatoires prostaglandines (PG) et de leurs métabolites entre autres prostaglandine 2, (PGE₂) et prostaglandine D₂ (PGD₂) qui ne requiert aucun mode de sécrétion (Zarghi *et al.*, 2011).

Ayant, avec un degré de certitude, relié Sec22b avec la diminution de la sécrétion de ces cytokines nous voulions nous assurer que la production de ces cytokines n'était pas altérée malgré la déficience en Sec22b. Alors nous nous sommes concentrés sur les niveaux de l'ARN de ces médiateurs inflammatoires. Les voies de signalisation du TLR4 utilisent comme seconds messagers les MAPK pour transduire le signal jusqu'aux facteurs de transcription. Donc, nous avons investigué la plupart des MAPK clés dans la signalisation du TNF et d'IL-6. Nous avons observé quelques différences pour JNK et I κ B dans une cinétique transitoire très rapide (Figure 2.4). Il est toutefois notable que les niveaux de NF- κ B totaux ne changent pas malgré que son inhibiteur I κ B est moins présent en protéine, donc l'inhiberait moins et irait au noyau pour transcrire des gènes d'intérêt (Qian Zhang *et al.*, 2017).

La translocation au noyau de NF- κ B fût notre prochaine approche au niveau des cellules dendritiques en absence de Sec22b. Suite aux observations des niveaux protéiques d'I κ B total faible en absence de Sec22b comparé à des cellules dendritiques contrôles (Figure 2.4A), notre hypothèse est qu'en absence d'inhibiteur de NF- κ B il y aurait plus de translocation au noyau de NF- κ B. En revanche, le résultat démontre qu'en absence de Sec22b la translocation au noyau est diminuée par rapport aux cellules ayant Sec22b (Figure 2.5A). Cela suggère que la diminution de la production de l'ARN messager des médiateurs inflammatoires pourrait être, au moins en partie, une conséquence de la diminution de la translocation de NF- κ B au noyau en absence de Sec22b (Figure 2.3B), mais ne lie pas exactement la SNARE Sec22b au résultat. Étant donné que NF- κ B est transloqué au noyau par des importines, la SNARE ne peut pas jouer ce rôle (Fagerlund *et al.*, 2005).

Nous devons rechercher plus en profondeur au niveau signalétique comment l'absence de Sec22b peut induire une diminution de l'ARN messager de ces médiateurs de l'inflammation en lien avec une transcription diminuée par la voie de signalisation du LPS. Il est connu que l'inhibition de p38, ERK, JNK ou JAK2 est liée à une baisse du niveau d'ARN messager d'*Il-6* et *Nos2* (Peroval *et al.*, 2013). Nous avons corrélé que JNK pourrait être liée à cette diminution de l'ARN des cytokines, mais nous n'avons pas observé de changement significatif des protéines p38 et ERK phosphorylé ou non. D'autres expériences sur JNK ou en amont dans la cascade de réaction en condition inflammatoire en lien avec une absence de Sec22b ou d'autres SNAREs pourraient élucider ce changement observé dans la production des ARN messagers des cytokines

pro-inflammatoires. Nous n'avons pas confirmé les effets de Sec22b par une knock-in dans les cellules dendritiques, mais nous avons démontré que les niveaux de protéines d'iNOS et que la sécrétion d'oxyde nitrique était reproductible dans les macrophages murins RAW264.7 (Figure 2.6A-B). Des expériences futures devraient aussi se concentrer sur le lien que différentes SNAREs pourraient avoir sur la régulation de la production des cytokines en plus de leur rôle clé dans le transport des vésicules et des fusions membranaires.

CONCLUSION

En conclusion, durant une inflammation causée par le LPS dans les dendritiques nous avons observé une diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires TNF et IL-6 qui était reliée à une faible transcription de l'ARN messenger de ceux-ci. Cet effet est un phénotype de l'absence de Sec22b, mais nous n'avons pas encore toutes les parties de la signalisation causée par celle-ci. De nouvelles expériences devront être faites sur d'autres membres de la cascade de signalisation des TLRs pour relier le nouveau rôle de Sec22b dans la diminution de la sécrétion et de la production des médiateurs inflammatoires.

RÉFÉRENCES

- Acuner Ozbabacan SE, Gursoy A, Nussinov R & Keskin O (2014) The Structural Pathway of Interleukin 1 (IL-1) Initiated Signaling Reveals Mechanisms of Oncogenic Mutations and SNPs in Inflammation and Cancer. *PLOS Computational Biology* 10(2):e1003470.
- Adams S (2009) Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Immunotherapy* 1(6):949-964.
- Adnan M, Islam W, Zhang J, Zheng W & Lu G-D (2019) Diverse Role of SNARE Protein Sec22 in Vesicle Trafficking, Membrane Fusion, and Autophagy. *Cells* 8(4):337.
- Arend WP, Palmer G & Gabay C (2008) IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunological Reviews* 223(1):20-38.
- Berchtold NC, Coleman PD, Cribbs DH, Rogers J, Gillen DL & Cotman CW (2013) Synaptic genes are extensively downregulated across multiple brain regions in normal human aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 34(6):1653-1661.
- Binz T, Sikorra S & Mahrhold S (2010) Clostridial neurotoxins: mechanism of SNARE cleavage and outlook on potential substrate specificity reengineering. *Toxins (Basel)* 2(4):665-682.
- Biswas SK & Mantovani A (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology* 11:889.
- Biswas SK & Mantovani A (2012) Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell Metab* 15(4):432-437.
- Bogdan C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology* 2(10):907-916.
- Brenner D, Blaser H & Mak TW (2015) Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nature Reviews Immunology* 15:362.
- Cebrian I, Visentin G, Blanchard N, Jouve M, Bobard A, Moita C, Enninga J, Moita Luis F, Amigorena S & Savina A (2011) Sec22b Regulates Phagosomal Maturation and Antigen Crosspresentation by Dendritic Cells. *Cell* 147(6):1355-1368.
- Collins LE, DeCoursey J, Soledad di Luca M, Rochfort KD & Loscher CE (2015) An Emerging Role for SNARE Proteins in Dendritic Cell Function. *Frontiers in immunology* 6:133-133.
- Daste F, Galli T & Tareste D (2015) Structure and function of longin SNAREs. *Journal of Cell Science* 128(23):4263.
- Dawson TM & Dawson VL (1995) REVIEW ■ : Nitric Oxide: Actions and Pathological Roles. *The Neuroscientist* 1(1):7-18.
- Dienz O & Rincon M (2009) The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 130(1):27-33.
- Dinarello CA (2009) Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annual Review of Immunology* 27(1):519-550.

- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A & Nagata S (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391(6662):43-50.
- England H, Summersgill HR, Edey ME, Rothwell NJ & Brough D (2014) Release of interleukin-1 α or interleukin-1 β depends on mechanism of cell death. *J Biol Chem* 289(23):15942-15950.
- Fagerlund R, Kinnunen L, Köhler M, Julkunen I & Melén K (2005) NF- κ B Is Transported into the Nucleus by Importin α 3 and Importin α 4. *Journal of Biological Chemistry* 280(16):15942-15951.
- Faustman D & Davis M (2010) TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* 9:482.
- Font-Nieves M, Sans-Fons MG, Gorina R, Bonfill-Teixidor E, Salas-Pérdomo A, Márquez-Kisinousky L, Santalucia T & Planas AM (2012) Induction of COX-2 enzyme and down-regulation of COX-1 expression by lipopolysaccharide (LPS) control prostaglandin E2 production in astrocytes. *J Biol Chem* 287(9):6454-6468.
- Förstermann U & Sessa WC (2011) Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal* 33(7):829-837.
- Fukao T, Frucht DM, Yap G, Gadina M, O'Shea JJ & Koyasu S (2001) Inducible Expression of Stat4 in Dendritic Cells and Macrophages and Its Critical Role in Innate and Adaptive Immune Responses. *The Journal of Immunology* 166(7):4446.
- Gandhi J, Khera L, Gaur N, Paul C & Kaul R (2017) Role of Modulator of Inflammation Cyclooxygenase-2 in Gammaherpesvirus Mediated Tumorigenesis. *Front Microbiol* 8:538-538.
- Garbers C, Heink S, Korn T & Rose-John S (2018) Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nature Reviews Drug Discovery* 17:395.
- Geiger A, Bossard G, Sereno D, Pissarra J, Lemesre J-L, Vincendeau P & Holzmüller P (2016) Escaping Deleterious Immune Response in Their Hosts: Lessons from Trypanosomatids. *Frontiers in immunology* 7:212-212.
- Giroux M, Schmidt M & Descoteaux A (2003) IFN- γ -induced MHC class II expression: transactivation of class II transactivator promoter IV by IFN regulatory factor-1 is regulated by protein kinase C- α . *J Immunol* 171(8):4187-4194.
- Gordon S & Martinez-Pomares L (2017) Physiological roles of macrophages. *Pflügers Arch* 469(3-4):365-374.
- Guzik TJ, Korbout R & Adamek-Guzik T (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 54(4):469-487.
- Han J, Pluhackova K & Böckmann RA (2017) The Multifaceted Role of SNARE Proteins in Membrane Fusion. *Front Physiol* 8:5-5.
- Heink S, Yogev N, Garbers C, Herwerth M, Aly L, Gasperi C, Husterer V, Croxford AL, Möller-Hackbarth K, Bartsch HS, Sotlar K, Krebs S, Regen T, Blum H, Hemmer B, Misgeld T, Wunderlich TF, Hidalgo J, Oukka M, Rose-John S, Schmidt-Supprian M, Waisman A &

- Korn T (2017) Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic T(H)17 cells. *Nature immunology* 18(1):74-85.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G & Schaper F (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal* 374(Pt 1):1-20.
- Heinrich PC, Castell JV & Andus T (1990) Interleukin-6 and the acute phase response. *The Biochemical journal* 265(3):621-636.
- Iwasaki A & Medzhitov R (2015) Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology* 16:343.
- Jiang Y, Woronicz JD, Liu W & Goeddel DV (1999) Prevention of Constitutive TNF Receptor 1 Signaling by Silencer of Death Domains. *Science* 283(5401):543-546.
- Jo E-K, Kim JK, Shin D-M & Sasakawa C (2016) Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cellular & molecular immunology* 13(2):148-159.
- Julier Z, Park AJ, Briquez PS & Martino MM (2017) Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. *Acta Biomaterialia* 53:13-28.
- Kawai T & Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* 11:373.
- Kawasaki T & Kawai T (2014) Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology* 5:461-461.
- Korde Choudhari S, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR & Joshi V (2013) Nitric oxide and cancer: a review. *World Journal of Surgical Oncology* 11(1):118.
- Liu Y & Barlowe C (2002) Analysis of Sec22p in Endoplasmic Reticulum/Golgi Transport Reveals Cellular Redundancy in SNARE Protein Function. *Molecular Biology of the Cell* 13(9):3314-3324.
- Lopez-Castejon G & Brough D (2011) Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine & growth factor reviews* 22(4):189-195.
- Lou X & Shin Y-K (2016) SNARE zippering. *Biosci Rep* 36(3):e00327.
- MacEwan DJ (2002) TNF receptor subtype signalling: Differences and cellular consequences. *Cellular Signalling* 14(6):477-492.
- Manderson AP, Kay JG, Hammond LA, Brown DL & Stow JL (2007) Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNF α . *The Journal of cell biology* 178(1):57-69.
- Matte C & Descoteaux A (2016) Exploitation of the Host Cell Membrane Fusion Machinery by Leishmania Is Part of the Infection Process. *PLOS Pathogens* 12(12):e1005962.
- Mishev K, Dejonghe W & Russinova E (2013) Small Molecules for Dissecting Endomembrane Trafficking: A Cross-Systems View. *Chemistry & Biology* 20(4):475-486.
- Moffat J, Grueneberg DA, Yang X, Kim SY, Kloepfer AM, Hinkle G, Piqani B, Eisenhaure TM, Luo B, Grenier JK, Carpenter AE, Foo SY, Stewart SA, Stockwell BR, Hacohen N, Hahn WC, Lander ES, Sabatini DM & Root DE (2006) A Lentiviral RNAi Library for Human

- and Mouse Genes Applied to an Arrayed Viral High-Content Screen. *Cell* 124(6):1283-1298.
- Mohammad Hosseini A, Majidi J, Baradaran B & Yousefi M (2015) Toll-Like Receptors in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Adv Pharm Bull* 5(Suppl 1):605-614.
- Murata M (2018) Inflammation and cancer. *Environ Health Prev Med* 23(1):50-50.
- Nathan C (2002) Points of control in inflammation. *Nature* 420(6917):846-852.
- O'Neill LAJ, Golenbock D & Bowie AG (2013) The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 13:453.
- Ohnishi S, Ma N, Thanan R, Pinlaor S, Hammam O, Murata M & Kawanishi S (2013) DNA damage in inflammation-related carcinogenesis and cancer stem cells. *Oxid Med Cell Longev* 2013:387014-387014.
- Park BS & Lee J-O (2013) Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & Molecular Medicine* 45:e66.
- Peroval MY, Boyd AC, Young JR & Smith AL (2013) A critical role for MAPK signalling pathways in the transcriptional regulation of toll like receptors. *PLoS One* 8(2):e51243-e51243.
- Peters VA, Joesting JJ & Freund GG (2013) IL-1 receptor 2 (IL-1R2) and its role in immune regulation. *Brain Behav Immun* 32:1-8.
- Qian C & Cao X (2018) Dendritic cells in the regulation of immunity and inflammation. *Seminars in Immunology* 35:3-11.
- Reddick LE & Alto NM (2014) Bacteria fighting back: how pathogens target and subvert the host innate immune system. *Mol Cell* 54(2):321-328.
- Rubartelli A, Cozzolino F, Talio M & Sitia R (1990) A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *The EMBO journal* 9(5):1503-1510.
- Sakimoto T, Yamada A & Sawa M (2009) Release of Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor 1 from Corneal Epithelium by TNF- α -Converting Enzyme-Dependent Ectodomain Shedding. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50(10):4618-4621.
- Santarasci V, Cosmi L, Maggi L, Liotta F & Annunziato F (2013) IL-1 and T Helper Immune Responses. *Frontiers in Immunology* 4(182).
- Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D & Rose-John S (2011) The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813(5):878-888.
- Sedger LM & McDermott MF (2014) TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 25(4):453-472.
- Stevenson FT, Torrano F, Locksley RM & Lovett DH (1992) Interleukin 1: The patterns of translation and intracellular distribution support alternative secretory mechanisms. *Journal of Cellular Physiology* 152(2):223-231.

- Stow JL & Murray RZ (2013) Intracellular trafficking and secretion of inflammatory cytokines. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 24(3):227-239.
- Takeuchi O & Akira S (2010) Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140(6):805-820.
- Tauber AI (2003) Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4:897.
- Tuon FF, Amato VS, Bacha HA, AlMusawi T, Duarte MI & Amato Neto V (2008) Toll-Like Receptors and Leishmaniasis. *Infection and Immunity* 76(3):866.
- Turner MD, Nedjai B, Hurst T & Pennington DJ (2014) Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* 1843(11):2563-2582.
- Turvey SE & Broide DH (2010) Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125(2 Suppl 2):S24-S32.
- Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW & Nathan C (1993) Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *The Journal of experimental medicine* 178(2):605-613.
- Wu SJ, Niknafs YS, Kim SH, Oravec-Wilson K, Zajac C, Toubai T, Sun Y, Prasad J, Peltier D, Fujiwara H, Hedig I, Mathewson ND, Khoriaty R, Ginsburg D & Reddy P (2017) A Critical Analysis of the Role of SNARE Protein SEC22B in Antigen Cross-Presentation. *Cell Rep* 19(13):2645-2656.
- Yang K, Puel A, Zhang S, Eidenschenk C, Ku C-L, Casrouge A, Picard C, von Bernuth H, Senechal B, Plancoulaine S, Al-Hajjar S, Al-Ghonaïum A, Maródi L, Davidson D, Speert D, Roifman C, Garty B-Z, Ozinsky A, Barrat FJ, Coffman RL, Miller RL, Li X, Lebon P, Rodriguez-Gallego C, Chapel H, Geissmann F, Jouanguy E & Casanova J-L (2005) Human TLR-7-, -8-, and -9-Mediated Induction of IFN- γ ; and - β ; Is IRAK-4 Dependent and Redundant for Protective Immunity to Viruses. *Immunity* 23(5):465-478.
- Young J & Kima PE (2019) The Leishmania Parasitophorous Vacuole Membrane at the Parasite-Host Interface. *Yale J Biol Med* 92(3):511-521.
- Zarghi A & Arfaei S (2011) Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. *Iran J Pharm Res* 10(4):655-683.
- Zhang JM & An J (2007) Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin* 45(2):27-37.
- Zhang Q, Lenardo MJ & Baltimore D (2017) 30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell* 168(1-2):37-57.