



HAL
open science

Nouveaux régulateurs de la signalisation TLR2-NF-kB

Anne-Lise Rossi

► **To cite this version:**

Anne-Lise Rossi. Nouveaux régulateurs de la signalisation TLR2-NF-kB. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT : 2013PA05T071 . tel-01016690

HAL Id: tel-01016690

<https://theses.hal.science/tel-01016690>

Submitted on 1 Jul 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES



Nouveaux régulateurs de la signalisation TLR2-NF- κ B

Thèse
pour obtenir le grade de
DOCTEUR
Sciences de la Vie

Ecole doctorale : GC2ID
Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par
Anne-Lise ROSSI

Jury :

Pr Tarek SHARSHAR

Président du Jury

Pr Jean-Daniel CHICHE

Directeur de thèse

Pr Uriel HAZAN

Rapporteur

Pr Pierre TISSIERES

Rapporteur

Dr Anne HOSMALIN-INDELICATO

Examineur

A tous ceux qui m'ont un jour soutenu et appris et à tous ceux qui le feront dans l'avenir.

Remerciements

Avant tout, je souhaite remercier le Professeur Jean-Daniel Chiche d'avoir fait en sorte de m'accueillir dans son équipe de recherche avant de reprendre la direction de ma thèse au moment où mon premier encadrant n'a plus pu assurer cette responsabilité. Je le remercie également pour la confiance et l'autonomie qu'il m'a accordées sur les différents projets de thèse. Comme il me l'avait dit à notre premier entretien, grâce à l'expérience qu'il m'a offerte, j'ai grandi.

Je remercie également le Professeur Jean-Paul Mira de m'avoir offert des conditions de travail empreintes de compréhension et de confiance.

Je remercie le Docteur Julie Toubiana de m'avoir encadrée pendant mon année de master 2 et d'avoir investi son énergie et son savoir bien au-delà de ses responsabilités et de son devoir. Merci aussi d'avoir été très présente au cours de cette dernière année pour m'enseigner les ficelles du doctorant en fin de parcours.

Je tiens également à remercier une autre personne qui s'est investie au-delà de ses limites, Mme Nadia Belaidouni-Combiér. Nadia, merci d'avoir essayé de pousser mon esprit vers les questionnements indispensables à l'avancée des projets. Toi qui étais là au quotidien, merci d'avoir tenté de me transmettre ton savoir-faire et d'avoir écouté les coups de mou et les coups de grisou.

Merci aussi à Mr Christophe Rousseau, qui est toujours présent, toujours attentif et qui ne sait toujours pas dire non. Tu es une des perles cachées du laboratoire.

Merci au Docteur David Grimaldi et au Docteur Frédéric Pène de m'avoir poussé à réfléchir à mon avenir avant d'être relâchée dans le grand bassin.

Merci également au Docteur Emilie Courtine, future « Docteur² ». Merci d'avoir assuré les nocturnes avec moi au début et de m'avoir dit en face que « Non, Décathlon n'est pas une boutique de vêtements ».

Merci au Docteur Yann-Erick Claessens, d'avoir été la gentillesse même pendant le temps où tu as présent et d'avoir essayé de me conduire en douceur sur le chemin de la science.

Merci au Docteur Fatah Ouaz, d'avoir toujours montré intérêt et enthousiasme pour mes résultats à la paillasse et in silico.

Merci à la jeunesse de passage qui a, à chaque fois, apporté son enthousiasme et sa soif d'expériences : merci à Michel, à Lamia et à Carole.

Merci au Docteur Madeleine Riès d'avoir pris le relais de ma précédente marraine de thèse et d'avoir eu très à cœur de suivre sa filleule pour tous les petits riens qui font les grandes choses. Merci à sa plateforme d'accueil, 3P5, avec François, Cédric, Virginie et Marjorie. Sans vos appas alimentaires pour nous faire descendre vous voir, on n'aurait pas la chance de profiter de votre joie de vivre. Merci aussi à Philippe, Guilhem et Morgane pour m'avoir distillé vos conseils en PAGE à une ou deux dimensions et m'avoir apporté votre expertise biochimique. Merci à Christian de m'avoir appris à utiliser les bases d'extractions bibliographiques. Merci au Professeur Patrick Mayeux de m'avoir apporté son expertise en biochimie et sur les tyrosines phosphatases.

Merci à celles qui ont commencé par être les voisines du laboratoire d'en face pour finalement devenir bien plus. Merci Abla, Kayathiri et Fabienne. Désolée, mais je ne me vois pas dire plus sans verser dans le sentimentalisme dégoulinant. Merci aussi à d'autres qui ont su offrir plus qu'une relation de collègues : la famille Harah, Yousra, Anne, Maryline, Angeliki, Laëtitia et tant d'autres.

Merci à l'équipe du Docteur Morgane Bomsel pour les discussions scientifiques inopinées au détour d'une paillasse du L2. Merci Anne-Sophie d'essayer d'assurer ta fonction d'assistante de prévention dans un environnement où tout le monde fait semblant d'être sourd. En fait, à force de répétitions, d'infimes réflexes finissent par se créer malgré nous donc ne relâche pas la pression.

Merci à ceux dont la présence a été un plus au quotidien même s'ils ne sont plus à l'Institut Cochin : Vanessa, Amandine, Patrycja, Maxime et Martine (en fait, pour ainsi dire les anciens de l'équipe du Docteur Claudine Pique). Merci à la nouvelle équipe « Pique-Margottin » qui semble prometteuse et que je n'aurai malheureusement pas le temps d'apprendre à connaître et à apprécier.

Merci à l'équipe du « Forum BIOTechno » de m'avoir montré d'autres visages de la recherche et m'avoir laissé la liberté de décider du temps que je pouvais investir dans l'organisation de l'événement 2013.

Je tenais aussi à remercier l'entourage en dehors des murs de l'Institut. Je ne vous nomme pas mais j'espère que vous lirez ces mots. Sans vous, il m'aurait été beaucoup plus difficile d'arriver là où j'en suis. Si Jean-Paul Sartre a dit que « l'enfer c'est les autres », c'est qu'il ne vous a pas croisé en chemin.

Enfin, je remercie respectueusement les membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'accorder du temps à l'évaluation de la conduite de mes travaux de recherche ainsi qu'à mes capacités orales et rédactionnelles. Merci au Professeur Sharshar, au Professeur Hazan, au Professeur Tissières, et au Docteur Hosmalin pour leur attention bienveillante au cours de ce moment important de ma vie scientifique.

RESUME

L'invasion de l'hôte par un pathogène induit l'activation séquentielle des réponses immunitaires innées et adaptatives. La reconnaissance du pathogène par des récepteurs tels que les récepteurs de type Toll (TLRs) initie la réponse innée qui repose sur l'activation des lignées myéloïdes, la production de cytokines, de chémokines et de médiateurs pro-inflammatoires qui contribuent à l'éradication du pathogène. L'amplification incontrôlée de la réaction inflammatoire est délétère pour l'organisme. Afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation des réponses dépendant de TLR2, récepteur impliqué dans la reconnaissance de bactéries, parasites ou champignons, nous avons étudié la composition des complexes multimoléculaires d'activation au sein des radeaux lipidiques. En utilisant des approches protéomiques complémentaires, nous avons mis en évidence le rôle de la Src kinase Lyn et de la déshydrogénase IMPDHII après engagement des hétérodimères TLR2/TLR1 ou TLR2/TLR6. La tyrosine kinase Lyn est indispensable à l'activation de NF- κ B après engagement de TLR2 et agit en phosphorylant la sous-unité p110 de la PI3-kinase (PI3-K). IMPDHII, cible de l'acide mycophénolique, est un régulateur négatif de la voie TLR2-NF- κ B. IMPDHII interagit avec SHP1 pour inhiber la phosphorylation sur tyrosine de p85 α , la sous-unité régulatrice de PI3-K, et prévenir la transactivation de NF- κ B. Enfin, nous avons étudié le rôle d'un polymorphisme de *IMPDHII* dans la gravité du choc septique. Ces travaux affinent la compréhension de la régulation de la réponse dépendant de TLR2 et permettent d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour la prise en charge des infections graves.

MOTS CLES : Immunité innée, TLR2, Phosphorylation des tyrosines, Lyn, IMPDHII, SHP1

Etablissement de préparation :

Institut Cochin, UMR INSERM U1016 - CNRS 8104 - Université Paris Descartes,
Département Infection, Immunité, Inflammation,
Equipe Immunité innée, récepteurs Toll et variabilité de la réponse inflammatoire,
Pr Jean-Daniel Chiche,
22 rue Méchain, 75014 Paris (France).

New regulators of pathway TLR2-NF- κ B

SUMMARY

The host invasion by pathogen results in an adaptive immune response subsequent to innate immunity. Pathogens recognition by receptors as Toll Like Receptors (TLRs) initiates activation of innate immune myeloid synchronized with cytokines, chemokines and pro-inflammatory mediators production that contribute to pathogen eradication. Exuberant inflammation should lead to acute organ dysfunction and death. To understand mechanisms of TLR2-dependent response regulation, we studied composition of multi-molecular complexes in lipid rafts. TLR2 recognizes bacterial, parasitic and fungal agents. Using complementary proteomic approaches, we show the roles of Lyn Src kinase and IMPDHII dehydrogenase following involvement of TLR2/TLR1 or TLR2/TLR6. Lyn tyrosine kinase is indispensable in TLR2-dependent activation of NF- κ B and phosphorylates p110 subunit of PI3-Kinase (PI3-K). IMPDHII, the mycophenolic acid substrate, is a negative regulator of TLR2-NF- κ B pathway. IMPDHII acts on SHP1 to inhibit tyrosine phosphorylation on p85 α , regulatory subunit of PI3-K, and prevent NF- κ B transactivation. Finally, by a translational approach, we investigate the role of a genetic polymorphism of IMPDHII in the septic shock outcome. These findings strengthen the knowledge of mechanisms in TLR2-dependent control and should predict immunomodulation strategies.

KEY WORDS: Innate immunity, TLR2, Tyrosine phosphorylation, Lyn, IMPDHII, SHP1

ABREVIATIONS	9
LEXIQUE	11
INTRODUCTION	13
1. IMMUNITE ANTI-INFECTIEUSE	14
1.1. Le système immunitaire : généralités	15
1.2. L'immunité innée	16
1.2.1. Les acteurs cellulaires	16
1.2.2. Les effecteurs moléculaires de l'immunité	18
1.2.2.1. Le système du complément.....	18
1.2.2.2. Les protéines et peptides antimicrobiens	20
1.3. La reconnaissance des signaux de dangers	21
1.3.1. Les signaux de dangers infectieux et non infectieux.	21
1.3.1.1. Les marqueurs moléculaires des pathogènes	22
1.3.1.2. Les signaux de danger non infectieux.....	23
1.3.2. Les récepteurs solubles extracellulaires.....	25
1.3.3. Les récepteurs cellulaires non-TLRs	26
1.3.4. Les récepteurs de type Toll.....	27
1.3.4.1. Les TLRs : structure et localisation	27
1.3.4.2. Les voies de signalisation des TLRs	28
1.3.4.2.1. La voie de signalisation dépendante de MyD88	31
1.3.4.2.2. La voie de signalisation dépendante de TRIF.....	31
1.3.4.3. La signalisation de TLR2.....	32
2. REGULATION DE LA REPOSE IMMUNITAIRE INNEE	35
2.1. La régulation membranaire	35
2.1.1. Les plateformes de signalisation	36
2.1.2. Les partenaires extracellulaires	40
2.1.3. Les partenaires transmembranaires	41
2.2. La régulation intra-cytoplasmique.....	44
2.2.1. Les régulateurs intracellulaires.....	44
2.2.2. Les cascades de phosphorylations	45
2.2.2.1. Les tyrosines kinases	46
2.2.2.2. Les tyrosines phosphatases	50
2.2.2.3. Le rôle des protéines à motifs ITAM/ITIMs.....	56
2.2.3. L'ubiquitination.....	56
2.3. La régulation génétique	57
2.3.1. NF- κ B : chef d'orchestre de l'inflammation	57
2.3.1.1. La sous-unité Rel A	58
2.3.1.2. La sous-unité p50.....	59
2.3.2. Les modifications épigénétiques	60
2.3.3. Les micros ARNs	60
3. LA VARIABILITE DE LA REPOSE ANTI-INFECTIEUSE	61
3.1. La variabilité liée au pathogène.....	62
3.2. La variabilité liée à l'hôte	63
3.3. La variabilité à l'origine des phénotypes complexes	66
4. L'IDENTIFICATION DE COMPOSANTS DU CLUSTER MOLECULAIRE D'ACTIVATION	70
4.1. Lyn : fonction, structure et régulation.....	72
4.2. IMPDHII : fonction, structure et inhibition	74
OBJECTIFS.....	77
RESULTATS	79

CHAPITRE 1.	LYN : ACTIVATEUR DE LA VOIE NF-κB EN AVAL DE TLR2	80
CHAPITRE 2.	IMPDHII : INHIBITEUR DE LA VOIE NF-κB EN AVAL DE TLR2.....	113
2.1.	<i>Rôle de IMPDHII dans les mécanismes d'activation de TLR2</i>	114
2.2.	<i>Publication</i>	119
CHAPITRE 3.	MECANISMES DE REGULATION DE SHP1, PAR IMPDHII, DANS L'ACTIVATION DE NF-κB MEDIÉE PAR TLR2.....	134
CHAPITRE 4.	ROLE DU VARIANT GENETIQUE <i>IMPDHII-3757C/T</i> DANS LA SEVERITE DU CHOC SEPTIQUE .	157
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		170
BIBLIOGRAPHIE		174
ANNEXES		211

Abréviations

Abréviations

2D DIGE	Two Differential Gel in Electrophoresis
API	Activator Protein 1
ARD	Ankyrin Repeat-containing Domain
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ASC	Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD
BCL	B-Cell Lymphoma
BIR	Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat
BMDM	Bone Marrow-Derived Macrophages
BTK	Bruton Tyrosine Kinase
CARD	Caspase Recruitment Domain-containing protein
CBP	CREB Binding Protein
CI	Confidence Interval
CREB	c-AMP Response Element-Binding protein
CLP	Caecal Ligation and Puncture
CLR	C-type Lectin Receptor
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CR	Complement Receptor
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
CSK	C-terminal Src Kinase
DAMP	Danger-Associated Molecular Patterns
DD	Death Domain
ERK	Extracellular-Regulated Kinase
FADD	FAS-associated Death Domain containing protein
FcRγ	Fc Receptor γ chain
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
HEK293-TLR2	Human Embryonic Kidney (HEK) 293 cells stably transfected with TLR2
HDAC1	Histone DeAcetylase
HKSA	Heat-Killed Staphylococcus Aureus
HMGB	High-Mobility Group Box
HWE	Hardy-Weinberg Equilibrium
IκB	Inhibitor of Kappa B
IKK	I κ B Kinase
IMPDH	Inosine MonoPhosphate Dehydrogenase
IRAK	Interleukine-1 Receptor-Associated Kinase
IRF	Interferon Regulatory Factor
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
LGP	Laboratory of Genetics and Physiology
LPS	Lipopolysaccharide
MAL	MyD88-Adapter-Like
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MβCD	Methyl- β -CycloDextrine

Abbreviations

MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome
MPA	MycoPhenolic Acid
MyD88	Myeloid Differentiation primary response protein 88
NLR	NOD-Like Receptors
NOD	Nuclear Oligomerisation Domain
OR	Odds Ratio
PAMP	Pathogen-Associated-Molecular Pattern
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PH	Pleckstrin Homology
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisPhosphate
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-triPhosphate
PNN	PolyNuclear Neutrophile
pNPP	p-NitroPhenyl Phosphate
PRR	Pattern-Recognition Receptor
PTP	Protein Tyrosine Phosphatases
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End products
RIG-1	Retinoic acid Inducible Gene I
RIP	Receptor-Interacting Protein
RMSD	Root-Mean-Square Deviation
RP105	Radioprotective Protein 105KDa
SAPSII	Simplified Acute Physiology Score
SH2	Src-Homology 2
SHP1	Src Homology-2 domain-containing Phosphatase 1
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SS	Septic Shock
SYK	Spleen tyrosine Kinase
TEC	Tyrosine kinase Expressed in hepatocellular Carcinoma
TIR	Toll/Interleukin-1 Receptor
TIRAP	(MAL)/TIR domain-containing Adaptor Protein
TLR	Toll-LikeReceptor
TRAF	Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TRAILR	TRAIL Receptor
TRAM	TRIF-Related Adaptor Molecule
TRIF	TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon beta
VFD	Ventilator-Free-Day

Lexique

Abcédation : Formation d'un abcès.

Allo-reconnaissance : Mécanismes par lesquels le système immunitaire du receveur reconnaît comme du non-soi un tissu provenant d'un individu de même espèce mais génétiquement différent.

Biomarqueur : Signature moléculaire des maladies.

Chimère : Structure ou molécule hybride composée d'une molécule d'ADN et d'un monomère d'acides nucléiques.

Chimérisme : Situation d'un organisme composé de populations cellulaires d'origines génétiques distinctes.

Génotype : Composition allélique d'un individu pour un gène d'intérêt. En considérant l'étude d'un polymorphisme au sein d'un gène, il peut exister un allèle majoritaire et un allèle variant. Le génotype de l'individu pour le gène peut alors être soit majoritaire homozygote, soit variant homozygote, soit hétérozygote.

Haplotype : Régions de variations groupées à des SNPs localisées dans deux ou plusieurs loci sur un même chromosome et tendant à être assez proches les unes des autres et à être héritées ensemble.

Inflammasome : Complexe moléculaire impliqué dans l'activation de caspases inflammatoires résultant du processus de maturation de l'IL1 β et de l'IL18.

Inotrope : Agent qui augmente ou diminue la force de contraction musculaire.

Métabolome : Ensemble des petites molécules (métabolites) d'un système vivant.

Microsatellites : Séquences répétées non codantes présentes uniformément sur tout le génome. Ces séquences sont organisées en plusieurs dizaines de répétitions de motifs mono à tétra nucléotidiques.

Modélisation moléculaire : La modélisation moléculaire est un outil d'étude de la relation entre structure et la réactivité des molécules. La connaissance de la structure des édifices

Lexique

moléculaires permet d'appréhender ce qui est réalisé dans une transformation physique, chimique ou biologique et peut permettre de les prévoir. La représentation graphique doit rendre compte de l'ensemble de ces caractéristiques géométriques et thermodynamiques pour rester la plus proche possible de la "réalité".

Myristoylation : Ajout irréversible d'un groupement amine ou d'un acide gras saturé tétradécanoïque sur le N-terminal du résidu glycine d'une protéine.

Palmitoylation : Fixation d'acide palmitique sur des résidus cystéine, ou plus rarement sérine/thréonine de protéines.

Protéomique : Analyse de l'ensemble des protéines présentes dans un échantillon biologique. Elle permet, au cours d'une situation physiologique donnée d'identifier leur taux d'expression et leurs éventuelles modifications post traductionnelles en fonction du temps et de leur localisation.

Signalosome : Complexe putatif de signalisation qui s'assemble près de la membrane en réponse à des signaux externes reçus à la surface cellulaire et qui migre vers les effecteurs en aval.

Tolérance: Etat de non-réponse immunitaire à un antigène après un contact préalable.

Transgène : Gène étranger produit par un ensemble de techniques modifiant ou altérant le matériel génétique de cellules ou d'organismes.

SAPS II : Score de gravité (Simplified Acute Physiology Score) mesuré dans les 24h qui suivent l'admission dans un service de réanimation. Ce score tient compte du type de patient (médical/chirurgical), l'âge et les maladies sous-jacentes, son état de vigilance, les paramètres cliniques (pression artérielle, fréquence cardiaque, diurèse, température), et biologiques (urée, leucocytes, sodium, potassium, bicarbonates, bilirubine) ainsi que l'état de ventilation (PAO_2/FiO_2).

Single Nucleotide polymorphisms (SNPs) : Polymorphismes localisés sur l'ensemble du génome : région promotrice, intron ou exon.

Introduction

Le sepsis est la réponse systémique de l'organisme à l'invasion par un pathogène. Malgré tous les progrès réalisés en réanimation, le sepsis peut évoluer vers le choc septique, dont les taux de mortalité peuvent atteindre 40 à 60% (Angus and van der Poll, 2013). Au cours du sepsis, le pathogène entraîne une réponse immunitaire innée avec libération de médiateurs pro-inflammatoires qui peuvent être délétères pour l'organisme en l'absence d'une étroite régulation (Bone et al., 1992; Hotchkiss and Karl, 2003). D'un côté, la surproduction de médiateurs inflammatoires, essentiels à l'éradication du pathogène, est associée aux défaillances d'organes observées dans le choc septique (Benjamim et al., 2003; Cohen, 2002; Hotchkiss and Karl, 2003). D'un autre côté, un certain nombre de patients septiques survivent à l'infection primaire mais développent une immunodépression secondaire qui augmente la susceptibilité aux infections nosocomiales (Alberti et al., 2002; Hotchkiss et al., 2013; Landelle et al., 2008). L'initiation et l'organisation de la réponse immunitaire innée nécessitent l'intervention des récepteurs Toll (TLRs). L'engagement des TLRs s'accompagne de leur multimérisation au sein des radeaux lipidiques où ils vont participer à la formation de complexes multimoléculaires de signalisation (Soong et al., 2004; Triantafilou et al., 2006). Au sein de ces complexes, de nombreuses molécules adaptatrices et enzymes participent à la régulation positive ou négative des voies de signalisation engagées (Ghosh and Hayden, 2008; Triantafilou et al., 2002). Ces mécanismes de régulation restent incomplètement compris. Par des techniques de protéomique différentielle, nous avons identifié deux protéines recrutées à la membrane après engagement de TLR2, la tyrosine kinase Lyn et l'enzyme IMPDHII. L'objectif principal de ce travail était de caractériser le rôle de ces deux protéines dans la régulation de la réponse immunitaire innée induite par l'engagement de TLR2. Plus spécifiquement, nous avons tenté d'identifier le rôle de Lyn et de IMPDHII dans les mécanismes d'activation du facteur de transcription NF- κ B et d'étudier l'impact de variants génétiques de IMPDHII dans la sévérité du choc septique chez les patients admis en réanimation.

1. Immunité anti-infectieuse

Toutes les espèces animales sont quotidiennement confrontées à des agressions des pathogènes. Pour survivre, ces espèces ont développé au cours de l'évolution des mécanismes de défense fondés sur une réponse immunitaire coordonnée et séquentielle.

1.1. Le système immunitaire : généralités

Lors de la rencontre d'un agent infectieux, des barrières physiques (comme la peau, et la barrière muco-ciliaire) s'opposent à l'invasion de l'organisme par le pathogène. Une fois passées ces premières lignes de défense, l'organisme est protégé des agents infectieux, de leurs dommages et des toxines par le système immunitaire. L'efficacité de cette protection est fondée sur quatre fonctions principales: la reconnaissance du danger, les fonctions effectrices, la régulation et la mémoire. Ces quatre fonctions sont séquentiellement mises en œuvre au niveau des réponses immunes innée et adaptative.

La réponse immune innée repose sur l'activation de nombreux acteurs cellulaires dont les cellules de la lignée monocyte/macrophage, les polynucléaires neutrophiles (PNNs) et les cellules épithéliales des tissus infectés. Ces cellules ont, non seulement, la propriété de phagocyter et de tuer le pathogène par cytotoxicité, mais vont aussi favoriser, après reconnaissance du pathogène, la production de molécules de l'inflammation. Au carrefour de l'immunité innée et de l'immunité adaptative, les cellules présentatrices d'antigène (CPA), telles que les cellules dendritiques ou les macrophages, ont deux fonctions principales. Elles engagent i) une réponse inflammatoire et ii) le système immunitaire adaptatif (Murphy et al., 2012).

L'immunité adaptative est présente uniquement chez les vertébrés. Elle intervient 6 à 10 jours après la primo-infection pour agir en synergie avec le système immunitaire inné dans le but d'éliminer le pathogène. Les lymphocytes constituent ses effecteurs cellulaires essentiels. Ils présentent à leur surface des récepteurs d'antigènes hautement spécialisés dans la fixation spécifique d'épitopes, couvrant ainsi un large répertoire de reconnaissance des pathogènes. Il existe de nombreuses sous-populations lymphocytaires, que l'on peut schématiquement classer en lymphocytes B et T. Les lymphocytes B reconnaissent les antigènes via leurs BCRs (B-cell receptors). Ils s'activent et se différencient en cellules plasmacytoïdes, qui produisent des anticorps reconnaissant le même antigène que le BCR. Ils sont également à l'origine d'une immunité à long terme permettant une réponse plus rapide et plus intense lors d'une seconde infection (Murphy et al., 2012). Les lymphocytes T présentent à leur surface un TCR (T-cell receptor). On distingue trois types de lymphocytes T : les cellules cytotoxiques, les T-helpers et les T-régulateurs. Les lymphocytes cytotoxiques éliminent les cellules infectées avec l'aide des signaux des T-helpers et sous le contrôle des T-régulateurs (Treg) (Belkaid et al., 2006; Chung et al., 2003; Happel, 2005; Huang et al., 2004; Mosmann et al., 1986; Murphy et al., 2012; Santarlasci et al., 2013). Ainsi, les mécanismes de

défense anti-infectieuse des lymphocytes sont fondés sur la cytotoxicité, la production d'immunoglobulines et la modulation des effecteurs de l'immunité innée (Kim et al., 2007; Reim et al., 2009; Suntharalingam et al., 2006).

1.2. L'immunité innée

Après les barrières physiques, l'immunité innée est la première ligne de défense contre les infections. Elle est responsable de la mobilisation d'une réponse inflammatoire en quelques minutes. Cette inflammation tend à éradiquer le pathogène, limiter les lésions tissulaires et initier les effecteurs de l'immunité adaptative.

1.2.1. Les acteurs cellulaires

Les cellules du système immunitaire inné sont les macrophages, les granulocytes (PNNs, éosinophiles et basophiles), les mastocytes, les cellules dendritiques et certains lymphocytes. A l'exception des lymphocytes, elles sont issues d'un précurseur : le progéniteur myéloïde commun. Provenant de la moëlle, elles migrent vers la circulation sanguine (Gordon and Taylor, 2005). Les monocytes et les macrophages constituent, avec les cellules dendritiques et les polynucléaires, les trois principaux types de cellules phagocytaires (Murphy et al., 2012).

La phagocytose des pathogènes implique la présence de récepteurs de reconnaissance et d'endocytose à la surface des cellules (PNNs et macrophages). Cette catégorie de récepteurs est composée des récepteurs au mannose, des récepteurs d'épuration ou «*scavenger*», de certaines intégrines (comme CR3 ou les $\beta 2$ intégrines) et des récepteurs de surface pour la fraction commune des anticorps (Taylor et al., 2005). La liaison de ces récepteurs à leurs agonistes induit des remaniements membranaires permettant l'internalisation du micro-organisme. Cette étape, consommatrice d'ATP et de GTP, nécessite une régulation par la signalisation intracellulaire (Shen et al., 2010). Suite à l'internalisation, le trafic vésiculaire passe par des étapes d'acidification et de fusion lysosomale qui aboutissent à la dégradation du pathogène. Cette dégradation est concomitante d'une production de radicaux oxygénés et de monoxydes d'azote par le complexe NADPH oxydase (cytochrome B558, p40/p47/p67 phox) (Dang et al., 2001). On peut noter que certains patients, fréquemment atteints d'infections bactériennes et fongiques graves, présentent des mutations de ce complexe (Holland, 2009).

Les effecteurs de l'immunité innée (macrophages et PNNs), ont aussi un rôle dans la résolution de l'inflammation (Knapp et al., 2003). Cette capacité à générer des signaux anti-inflammatoires (lipoxines, résolvines et protectines), associée aux propriétés microbicide et stérilisatrice, participe activement au processus de cicatrisation (Serhan, 2007).

Les leucocytes polymorphonucléaires comprennent les PNNs, les éosinophiles et les basophiles. Leur production croît au cours de la réponse immunitaire. Ils migrent du sang vers les foyers infectieux ou inflammatoires. Sur le site de l'infection, en plus de leur action de phagocytose du pathogène, ils libèrent des cytokines pro-inflammatoires, des radicaux libres oxydants ainsi que des protéases (Murphy et al., 2012).

Les mastocytes se différencient dans les tissus. La dégranulation de leurs molécules pro-inflammatoires est impliquée dans la protection antiparasitaire des muqueuses.

Les monocytes représentent la forme naïve et circulante des macrophages. Ils expriment différents co-récepteurs membranaires, comme CD14, CD16 ou CD32 (Tacke and Randolph, 2006). Les monocytes migrent par diapédèse vers le tissu et ils s'y différencient soit en macrophages, soit en cellules dendritiques. Les macrophages ont une longue durée de vie et exercent diverses fonctions durant la réponse immunitaire innée, puis au cours de l'immunité adaptative. En dehors de leur activité phagocytaire, les monocytes et macrophages contribuent à l'inflammation en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires, comme les interleukines 1 et 6 ainsi que le TNF α , des chémokines attirant les PNNs au site de l'infection et des facteurs de croissance qui prolongent leur durée de vie (Gordon and Taylor, 2005). Ils participent au recrutement des cellules dendritiques au site de l'infection afin qu'elles migrent vers les ganglions où elles présentent l'antigène aux lymphocytes (Murphy et al., 2012).

Les cellules dendritiques sont à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Sous leur forme immature, elles migrent de la moëlle osseuse vers les tissus à travers la circulation sanguine. Elles ont pour fonction de reconnaître et de capturer le pathogène tout en permettant d'entretenir le phénomène de tolérance présent chez les lymphocytes T (Hawiger et al., 2001). La maturation des DCs leur permet d'exercer leur rôle de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) dans les organes lymphoïdes, en présentant des antigènes à leur surface, qui sont reconnus par les lymphocytes T inactifs (Murphy et al., 2012). Cette reconnaissance active les lymphocytes (Galli et al., 2008; Romani, 2004; Tracey, 2009; Ulevitch, 2004). Enfin, la libération de médiateurs inflammatoires et l'expression de molécules de co-stimulation permettent d'orienter la réponse lymphocytaire vers des phénotypes TH1, TH2, TH17 ou Treg.

Parmi les **lymphocytes**, trois catégories particulières font partie intégrante de l'immunité innée, les lymphocytes Natural Killer (NK), les lymphocytes $\gamma\delta$ et les lymphocytes NKT. Les cellules NK, non T, non B, ont un cytoplasme granulocytaire. Ils reconnaissent et tuent les cellules anormales (tumoraux ou infectées par des virus) par une activité cytotoxique. L'activité cytotoxique des NK est inhibée par la liaison de leurs KIRs (Killer Ig-like Receptors) avec les CMHI (complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I) (Vivier et al., 2008). Ils facilitent le recrutement des cellules phagocytaires en produisant de l'IFN γ (Dalod et al., 2002; Walzer, 2005). Les lymphocytes $\gamma\delta$ forment une minorité cellulaire reconnaissant directement l'antigène et ce, indépendamment du CMH. Cette particularité leur permet de répondre rapidement au divers signaux qu'ils perçoivent (Chien and Konigshofer, 2007). Enfin, les lymphocytes NKT sont phénotypiquement et fonctionnellement semblables aux lymphocytes NK et T. Ils reconnaissent essentiellement les glycolipides présentés par le CD1d (Godfrey et al., 2010). Leur capacité à produire des molécules de l'inflammation (notamment IFN γ et IL17) leur confère un rôle dans la physiopathologie des infections (Doisne et al., 2009).

1.2.2. Les effecteurs moléculaires de l'immunité

1.2.2.1. Le système du complément

Le système du complément est un mécanisme effecteur de l'immunité innée qui aboutit à la libération des anaphylatoxines pro-inflammatoires C3a et C5a et à la formation d'un complexe d'attaque membranaire (C5b-C9). Trois voies distinctes permettent l'activation du complément : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines (Figure 1). Toutes les voies aboutissent à l'activation de C3 (composant central du système). La cascade protéolytique implique la formation d'une C3 convertase. Cette enzyme clive le composant C3 en deux molécules solubles C3a et C3b qui se lient de manière covalente à la surface du pathogène. Les individus déficients pour le composant C3 sont sujets à des infections bactériennes fréquentes (Daha, 2010). L'activation de ces effecteurs est conditionnée par une protéolyse à l'origine d'une cascade d'activation.

La voie classique est activée par les immunoglobulines G ou M (IgG ou IgM) qui sont fixées à la surface du pathogène. Dans la voie alterne, le C3 s'active spontanément au niveau des membranes microbiennes, qui contrairement aux cellules de l'hôte, sont dépourvues de protéines inhibitrices du complément comme le facteur H. La voie des lectines, quant à elle,

Immunité anti-infectieuse

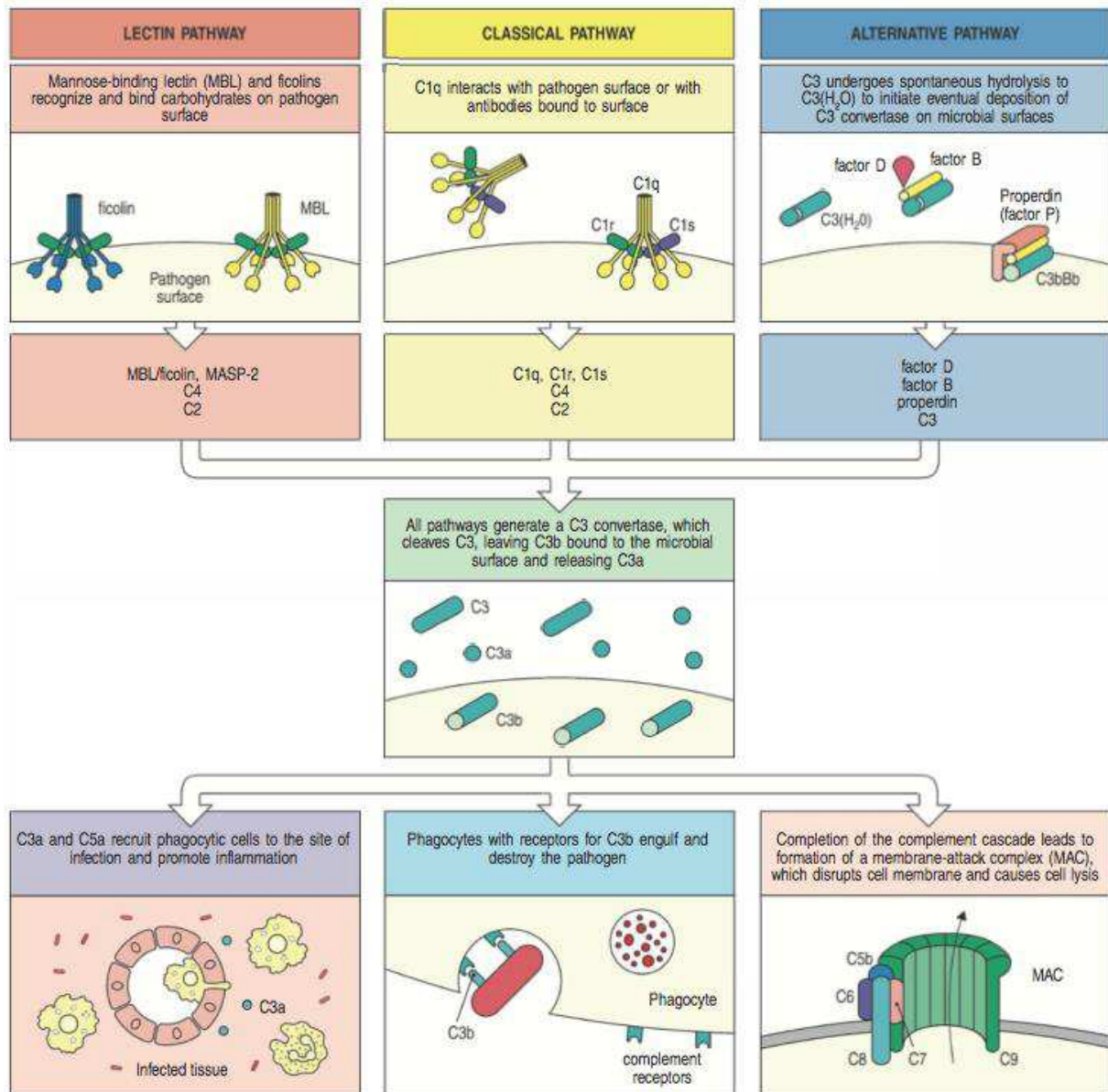


Figure 1. Le système du complément. Le mécanisme de reconnaissance des pathogènes se fait selon trois voies d'activation qui sont montrées dans les panneaux supérieurs. La cascade protéolytique implique la formation d'une C3 convertase. Cette enzyme clive le composant C3 en deux molécules solubles C3a et C3b qui se lient de manière covalente à la surface du pathogène. La voie des lectines (en haut à gauche) fonctionne par fixation de MBL (mannose-binding lectin) ou de ficolines aux résidus carbohydrates de la membrane ou de la capsule du pathogène. La voie classique (en haut au centre) agit par fixation du composant C1q à la surface du pathogène ou aux anticorps. Dans la voie alterne (en haut à droite), le mode d'action implique que les composants C3 solubles soient hydrolysés spontanément ce qui génère du C3(H₂O) qui est amplifié par l'action des properdines (B, D et P). Toutes ces voies convergent vers la formation du C3b qui se fixe au pathogène. Il agit alors comme une opsonine. Les C3a et C5a libérés dans les tissus attirent les cellules phagocytaires par chimiotactisme. Certaines cellules phagocytaires (en bas au centre) expriment à leur surface du C3b, ce qui leur permet d'absorber le pathogène par un système de vésicules. Le C3b peut également se fixer à la C3 convertase pour induire un nouvel effecteur la C5 convertase qui clive le C5 en C5a et en C5b. Le C5b intervient tardivement dans la voie du complément en s'assemblant avec C6, C7, C8 et C9 pour former un complexe d'attaque membranaire ce qui endommage la paroi des pathogènes (en bas à droite).

D'après Janeway, Immunobiology (Garland Science®), 2012.

implique la fixation des récepteurs aux mannanes des parois microbiennes, ce qui initie l'activation de la voie. Le C3b qui résulte de l'activation du C3 induit la formation d'un complexe d'attaque. En se fixant à la surface du pathogène il agit comme une opsonine. En parallèle, le C3b peut également se fixer à la C3 convertase pour induire un nouvel effecteur, la C5 convertase, qui clive le C5 en C5a et en C5b. D'autre part, les produits des clivages successifs (C3a et C5a) participent au recrutement des cellules inflammatoires, par chimiotactisme, ainsi qu'à l'opsonisation et à la phagocytose (C3b). Enfin, le C5b intervient tardivement dans la voie du complément en s'assemblant avec C6, C7, C8 et C9 pour former un complexe d'attaque membranaire qui endommage la paroi des pathogènes. Quant au C5a, il amplifie les phénomènes inflammatoires en potentialisant la production de MIF et de HMGB1. Il active aussi la cascade de coagulation, augmente l'apoptose des thymocytes et altère les propriétés phagocytaires des PNNs (Denk et al., 2012; Flierl et al., 2008; Rittirsch et al., 2008).

1.2.2.2. Les protéines et peptides antimicrobiens

Les peptides anti-microbiens inactivent rapidement les agents infectieux. Ils s'assemblent et forment des pores transmembranaires qui perméabilisent la membrane bactérienne pour l'eau et les petites molécules, ce qui provoque la déstabilisation de la membrane.

La famille des peptides anti-microbiens est composée de deux grandes sous-familles, les β -défensines et les cathélicidines. Les β -défensines agissent contre les bactéries, les champignons et certains virus (Zhao et al., 1996). Le mode d'action passe par l'activation du système du complément et la production d'IL8 notamment par les cellules épithéliales pulmonaires. Paradoxalement, elles participent à la modulation de l'inflammation en se liant aux molécules pro-inflammatoires issues de la lyse des micro-organismes (Nagaika et al., 2001). Leur production est induite par la stimulation de certains TLRs par leurs agonistes, comme TLR2 (Wang et al., 2003). Comme les défensines, les cathélicidines participent au chimiotactisme des PNNs et stimulent la production de cytokines par les épithéliums infectés. En outre, elles exercent un rôle immuno-modulateur en liant le LPS des parois bactériennes et en modulant la voie de signalisation entre les TLRs et le facteur transcriptionnel NF- κ B (Mookherjee, Brown, 2006). Enfin, elles participent également à l'autophagie bactérienne dépendante de la vitamine D (Shin et al., 2010).

1.3. La reconnaissance des signaux de dangers

1.3.1. Les signaux de dangers infectieux et non infectieux.

Les infections graves et d'autres agressions non infectieuses sévères (par exemple les pancréatites aiguës et les polytraumatismes) s'accompagnent d'une réponse inflammatoire exacerbée. Cette réponse se fait suite à la reconnaissance par le système immunitaire de signaux de danger traduisant une infection ou des dommages tissulaires. Les marqueurs moléculaires des pathogènes (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs) et les molécules endogènes de danger (Danger-Associated Molecular Patterns, DAMPs) signalent une infection ou des dommages tissulaires et sont reconnus par les mêmes récepteurs (Pattern-Recognition Receptors, PRRs) (Piccinini and Midwood, 2010). Les récepteurs les distinguent par les co-récepteurs engagés différenciellement (Iwasaki and Medzhitov, 2010), comme le S100B (S100 calcium binding protein B) qui, par une intégration spatio-temporelle des signaux des TLRs et de RAGE (Receptor for Advanced Glycosylation End products), permettent au système immunitaire de discriminer les PAMPs des DAMPs. Ces PAMPs sont essentiels à la survie des bactéries, mycobactéries, virus et parasites. Dans l'immunité anti-infectieuse, l'étape décisive est la reconnaissance des PAMPs par leurs récepteurs spécifiques (Hoffmann and Akira, 2013; Mogensen, 2009). Les protéines qui reconnaissent ces cibles sont du type lectines et sont à la surface des cellules effectrices de l'immunité innée. Ces PRRs sont classés en quatre catégories : les récepteurs dans le sérum, les récepteurs de fixation membranaire phagocytaires (ingestion du pathogène suite à sa reconnaissance), les récepteurs membranaires de signalisation et les récepteurs cytoplasmiques de signalisation (Denk et al., 2012). Les PRRs solubles peuvent être plasmatiques et se fixer au pathogène afin d'induire sa destruction (système du complément, collectine) ou être cytoplasmiques comme les NODs (Nuclear Oligomerisation Domains) ou les récepteurs de type RIG-1 (Retinoic acid Inductible Gene I). Les PRRs de membranes peuvent être localisés à la surface des cellules effectrices de l'immunité innée ou dans les compartiments intra-cytoplasmiques comme les TLRs (Jeannin et al., 2008). En plus des PAMPs, ils peuvent reconnaître des facteurs endogènes, appelés signaux de danger (DAMPs), qui sont générés après une réaction inflammatoire ou un stress cellulaire (Crombruggen et al., 2013; Denk et al., 2012; Matzinger, 2002; Pisetsky, 2012).

1.3.1.1. Les marqueurs moléculaires des pathogènes

Si un micro-organisme franchit l'une des barrières, il commence à se répliquer dans les tissus de l'hôte. Il y est immédiatement reconnu par les PRRs des cellules phagocytaires résidentes de ces tissus, *via* ses PAMPs (Figure 2), et il représente une des causes principales du sepsis (Denk et al., 2012; Vance et al., 2009). Les PRRs principaux sont les TLRs (Toll-Like Receptors), les CLR (C-type lectin receptors), les NLRs (NOD-Like Receptors), les protéines de la famille des galectines et les récepteurs *scavenger* de classe B. Les TLRs et les CLR activent de multiples voies de signalisation suite à la fixation des PAMPs. Ces signaux activent les voies canoniques ou non-canoniques de NF- κ B, des NODs, de l'inflammasome et aboutissent à la production de défensines, chémokines, cytokines, radicaux libres oxydants et récepteurs du complément 3 (CR3).

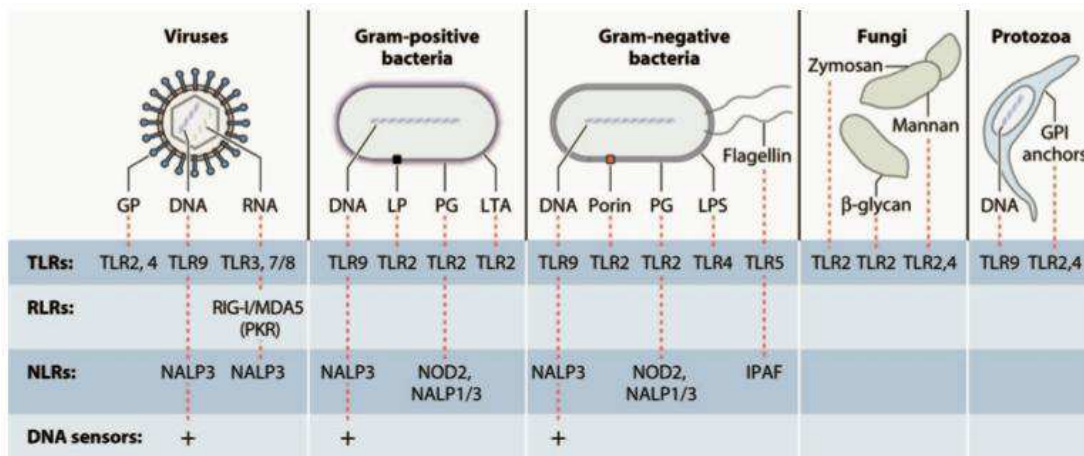


Figure 2. Signalisation des PAMPs. Les virus, les bactéries, les champignons et les protozoaires présentent différents PAMPs. Ils sont représentatifs des différentes classes de pathogènes. Les PAMPs principaux sont les acides nucléiques (comme l'ADN, l'ARN double brin et l'ARN simple brin), les glycoprotéines de surface (GP), les lipoprotéines (LP) et les composants membranaires (comme les peptidoglycane (PG), l'acide lipotéichoïque (LTA), le LPS et les ancrages GPI). Ils sont reconnus par différentes familles de PRRs membranaires et cytoplasmiques (TLRs, RLRs et NLRs).

D'après Mogensen, Clin Microbiol Rev, 2009.

La membrane des bactéries à Gram-négatif est essentiellement formée d'une couche de peptidoglycane et d'une membrane externe, composée de lipopolysaccharide (LPS), de phospholipides et de protéines. Le LPS agit comme une endotoxine. Il est responsable de la réponse inflammatoire observée durant le choc endotoxique (Akira et al., 2006). Avant son relargage, le LPS active le complément, s'associe avec les protéines plasmatiques de fixation et se lie au récepteur membranaire CD14 ainsi qu'à la molécule accessoire MD2, induisant la signalisation en aval de TLR4 (Guha and Mackman, 2001). La flagelline stimule les TLR5 alors que les peptidoglycane sont reconnus par le complément et

les NODs (Chamaillard et al., 2003; Hayashi et al., 2001; Mattsson et al., 1994). De plus, les ADNs bactériens non méthylés sont reconnus spécifiquement par TLR9 (Hemmi et al., 2000).

La membrane cellulaire des bactéries à Gram-positif contient du peptidoglycane, de l'acide lipotéichoïque et les lipoprotéines qui sont reconnus par les TLR2 (Erridge, 2010; Takeuchi et al., 1999). En plus de la reconnaissance par NOD2, le peptidoglycane est reconnu par l'inflammasome (Martinon and Tschopp, 2005; Martinon et al., 2009; Pedra et al., 2009).

Les champignons sont reconnus par la dectine-1, le récepteur au mannose, TLR2 et TLR4. En effet, le zymosan et les dérivés mannanes de la paroi du *C. albicans* sont reconnus par TLR4 et TLR2/6. Dans le cas d'une infection fongique, soit deux PRRs agissent en synergie pour internaliser le pathogène comme le récepteur au mannose ou la dectine-1, soit les TLRs induisent une réponse inflammatoire NF- κ B-dépendante (Romani, 2004).

Bien que les bactéries soient les causes les plus communes du sepsis, les virus peuvent être impliqués dans certains processus infectieux. En effet, **les virus** ont des structures diverses qui expriment cependant des marqueurs cibles comme les glycoprotéines de surface, les nucléotides viraux ou les glycoprotéines. Tous ces marqueurs sont reconnus par les récepteurs intracellulaires comme RIG-I et par certains TLRs (comme le 2, le 4, le 3, le 7 et le 8) (Kanneganti et al., 2006a; Kato et al., 2011; Lee et al., 2006; Mogensen and Paludan, 2005; Pomerantz et al., 1990).

1.3.1.2. Les signaux de danger non infectieux

En plus des PAMPs exogènes, le système immunitaire de l'hôte doit faire face à des signaux de danger endogènes, les DAMPs. Les PRRs détectent les facteurs des dommages tissulaires, ce qui contribue à la reconnaissance par un système de senseurs (Figure 3).

L'ADN endogène, considéré comme immunologiquement inerte, peut être reconnu par le système immunitaire inné. Des senseurs membranaires et cytosoliques, reconnaissant spécifiquement l'ADN, initient la réponse immunitaire (Denk et al., 2012; Hefeneider et al., 1992). Les études de concentration d'ADN plasmatique chez des patients septiques graves révèlent une augmentation de ces dernières (Saukkonen et al., 2008). Par ailleurs, les protéines associées (histones, nucléophosmine (NPM), HMGB1 (High-mobility group box 1))

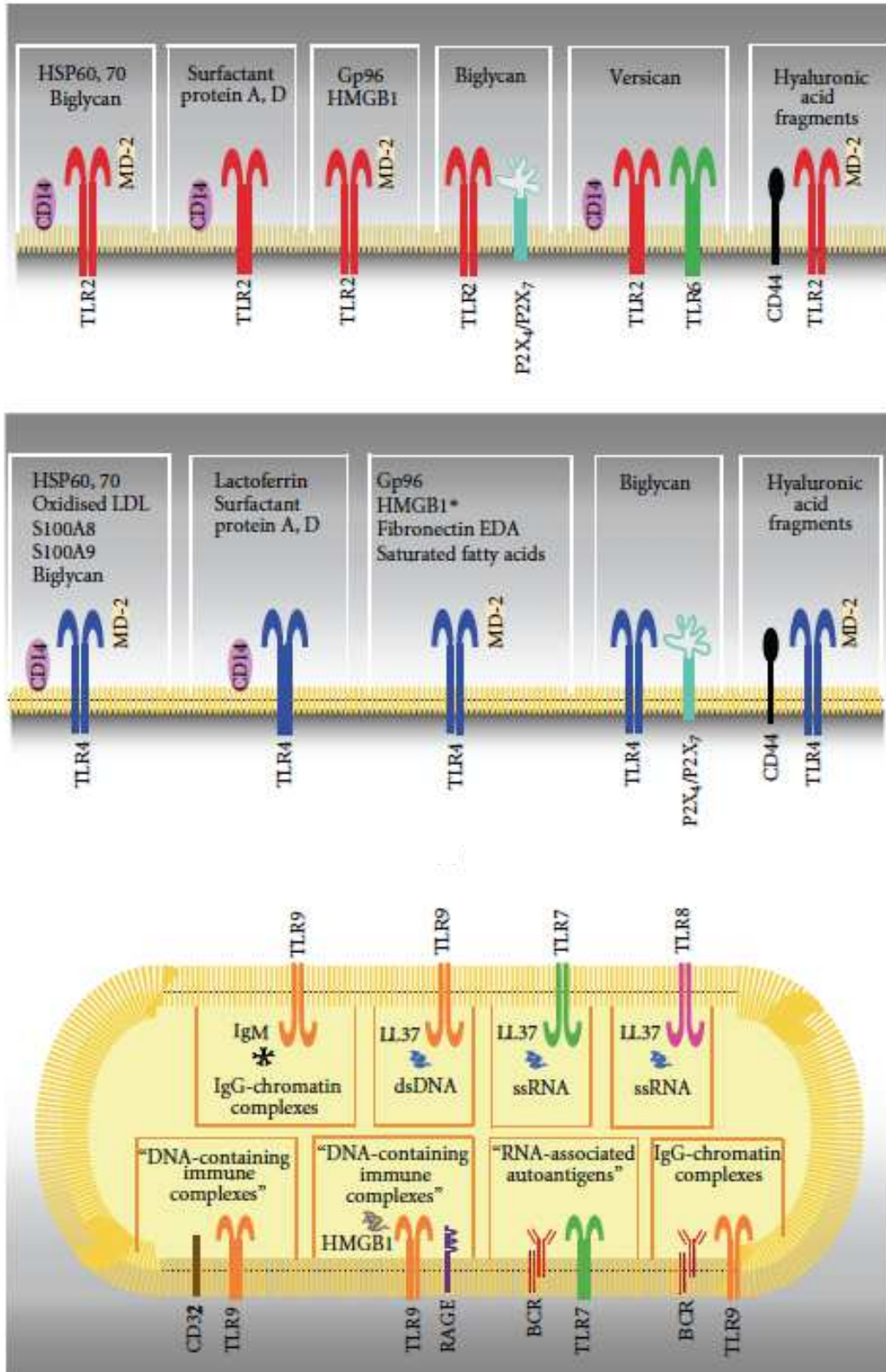


Figure 3. Reconnaissance des signaux de danger endogènes par les TLRs. Les TLRs sont activés par les DAMPs comme les molécules intracellulaires, les molécules extracellulaires (activées ou des cellules nécrotiques) et les molécules de la matrice extracellulaire. Les co-récepteurs et les molécules accessoires spécifiquement engagés par les DAMPs permettent leur reconnaissance différentielle par les TLRs et l'activation cellulaire.

D'après Piccinini et al., Mediators of Inflammation, 2010.

jouent un rôle important dans l'induction et le maintien du processus d'inflammation systémique durant le sepsis (Denk et al., 2012; Wang, 1999).

La mitochondrie est un organe dérivé des α -protéobactéries (Gray, 1999). Elle a donc conservé différentes caractéristiques morphologiques et biochimiques de son ancêtre, comme le génome circulaire à CpG non méthylé et la capacité à former des NFPs (N-formylated peptides) (Krysko et al., 2011). Ainsi, il n'est donc pas surprenant que des mitochondries systémiques activent le système immunitaire inné (Collins, 2004; Raouf et al., 2010; Zhang et al., 2010).

L'ATP extracellulaire peut être considéré comme un DAMP car il est libéré par des cellules ou des organelles, suite à des dommages (Novak, 2003; Willart and Lambrecht, 2009). Les macrophages, les PNNs et les DCs le piègent par le récepteur P2RX7 (purinergic receptor P2X ligand-gated ion channel 7), ce qui aboutit à la formation et à l'activation de l'inflammasome (Dinarello, 2004; Martinon, 2007).

1.3.2. Les récepteurs solubles extracellulaires

Les PRRs solubles, dits opsonisants, sont des protéines pouvant recouvrir les pathogènes afin de faciliter leur phagocytose par les cellules de l'immunité innée. Parmi eux, on distingue les collectines et les ficollines.

Les collectines (pour collagenous C-type lectins) appartiennent à la superfamille des lectines. Elle est composée des protéines du surfactant (SP-A et SP-D (Surfactant-associated Protein)) ainsi que des MBLs (Mannose-Binding Lectin) (Holmskov et al., 2003). La région collagène, en N-terminal, permet leur trimérisation ainsi que la liaison aux macrophages. Le CRD (Carbohydrate Recognition Domain), en région C-terminale, permet leur liaison aux carbohydrates des protéines et lipides glycosylés à la surface des membranes microbiennes. Leur conformation 3D est indispensable à leur fonction. En effet, d'une part, elle renforce les liaisons de faible affinité entre le CRD et le carbohydrate, et d'autre part, elle affine la distinction entre le soi et le non-soi. Les collectines peuvent agir par l'initiation de la voie des lectines ou par opsonisation des micro-organismes ou des particules inorganiques (Holmskov et al., 2003; Wright, 2005).

Les ficollines ont une structure proche de celles des collectines. Contrairement aux collectines, leur région C-terminale porte un domaine « fibrinogen-like ». Sa capacité de

liaison avec un complexe de sérines kinases (MASPs) lui permet d'activer la voie du complément (Takahashi et al., 2011).

1.3.3. Les récepteurs cellulaires non-TLRs

Le système immunitaire inné reconnaît les signaux de danger extracellulaires mais également ceux intracellulaires. Ce mécanisme de reconnaissance passe par deux familles de récepteurs cytoplasmiques solubles, les NLRs (NOD-like receptors) et les RLRs (RIG-1-like receptors), et par une famille de récepteurs membranaires, les CLR (C-type Lectin Receptor).

Les NLRs sont essentiellement produits dans les cellules épithéliales (Eckmann, 2004). Ils détectent la présence de PAMPs et de DAMPS cytosoliques (Fritz et al., 2006; Inohara et al., 2005; Kanneganti et al., 2007; Meylan et al., 2006; Ting et al., 2006). Les NLRs sont composés de trois domaines : un domaine de liaison N-terminal, un domaine central de fixation des nucléotides et un LRR en C-terminal. La fonction de la grande majorité d'entre eux reste encore méconnue (Ting et al., 2008). Parmi tous les NLRs, NOD1 et NOD2 sont particulièrement associés aux maladies inflammatoires. En effet, ils sont stimulés par des produits bactériens, ce qui initie l'activation de NF- κ B et la production de cytokines pro-inflammatoires (Hugot et al., 2001; Strober et al., 2005).

La famille des **RLRs** est composée de trois membres : RIG1, MDA5 (Melanoma Differentiation Associated gene 5) et LGP2 (RIG-I-like receptor LGP2). Chacun d'entre eux porte un domaine hélicase en C-terminal qui permet de reconnaître les ARNs viraux intracytoplasmiques (Beutler et al., 2007; Medzhitov, 2007; Poltorak et al., 2000). RIG1 représente le membre prototypique de la famille des RLRs. Il contient des domaines CARD-like en tandem dans la région N-terminale. Ils fonctionnent comme des domaines d'interaction en se fixant aux autres protéines composées de CARD. RIG1 porte également un domaine central de fixation à l'ATP et un domaine C-terminal de répression lors de la fixation aux ARNs (Cui et al., 2008; Takahashi et al., 2008). Suite à une infection virale, il initie la transduction du signal *via* les facteurs transcriptionnels NF- κ B et IRF3, ce qui aboutit à la synthèse d'IFN de classe I (Takahashi et al., 2006; Yoneyama and Fujita, 2009). On peut noter que la région C-terminale de MDA5 n'est pas identifiée et que les LGP2 ont perdu leurs domaines CARD. Le mécanisme d'interférence qu'exerce LGP2, sur l'auto-association de RIG1, semble faire de lui un immuno-modulateur (Yoneyama and Fujita, 2008).

Enfin, les **CLRs** sont une grande superfamille de protéines membranaires comprenant au moins un domaine C-type lectine-like. Ils interviennent dans la réponse inflammatoire en détectant les épitopes fongiques et bactériens (Kawai and Akira, 2011).

Des études récentes ont montré que ni ces récepteurs, ni les TLRs ne peuvent expliquer certains mécanismes inflammatoires ce qui laisse penser que d'autres récepteurs intracellulaires sont encore inconnus (Kawai and Akira, 2011).

1.3.4. Les récepteurs de type Toll

Les récepteurs de type Toll (Toll-like récepteurs, TLRs) agissent de concert et reconnaissent les signaux de dangers endogènes et exogènes. Ces récepteurs sont exprimés par toutes les cellules susceptibles d'exercer une réponse immunitaire innée (PNNs, monocytes, macrophages, DCs et cellules épithéliales) (Akira and Takeda, 2004). Ces récepteurs initient l'induction de la réponse inflammatoire et de l'immunité adaptative (Blander and Medzhitov, 2006; Iwasaki and Medzhitov, 2004). Ils participent également à la résolution de l'inflammation et à la réparation des dommages tissulaires (Iwasaki and Medzhitov, 2010).

1.3.4.1. Structure et localisation

Les TLRs sont des protéines transmembranaires appartenant à la famille de l'IL1R. La fixation du ligand se fait *via* leur partie extracellulaire composée de *leucine-rich repeats* (LRRs). Ce mécanisme de reconnaissance est facilité par la présence de corécepteurs dépourvus de régions cytoplasmiques comme CD14 ou CD36 (Medzhitov, 2007). Les TLRs possèdent un domaine cytoplasmique TIR similaire à celui du récepteur de l'IL1 et indispensable à l'initiation de la signalisation cellulaire.

A l'heure actuelle, onze TLRs ont été identifiés chez les mammifères, mais seuls dix sont exprimés chez l'Homme. Les ligands des TLR1 à 9 ont été caractérisés (Figure 4) (Kondo et al., 2012).

Immunité anti-infectieuse

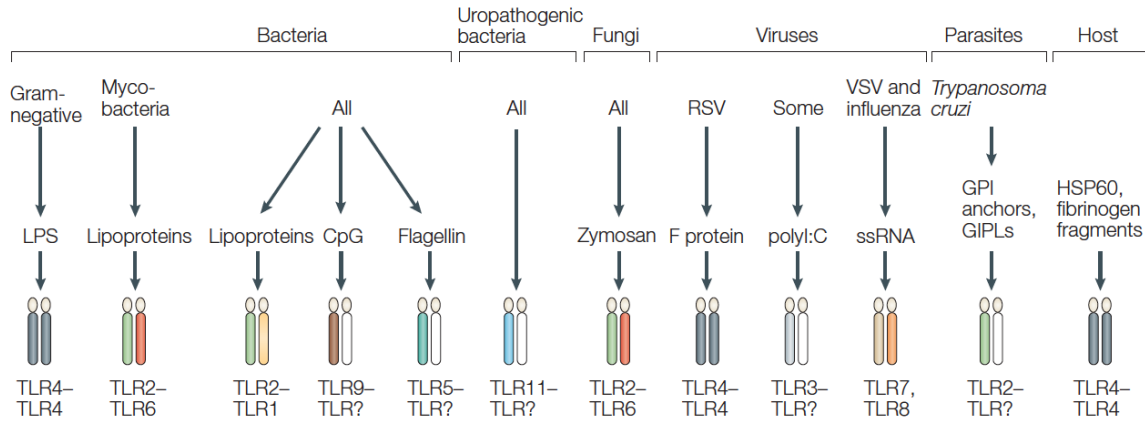


Figure 4. La reconnaissance des signaux de danger par les onze TLRs. Les bactéries sont détectées par cinq TLRs chez l'Homme : le LPS est le ligand principal de TLR4, le LTA et les lipopeptide di-acétylés sont reconnus par l'hétérodimère TLR2/TLR6, les lipopeptides tri-acétylés sont reconnus par TLR2/TLR1, les motifs CpG sont reconnus par TLR9 et la flagelline est le ligand de TLR5. TLR11 n'est exprimé que chez la souris et reconnaît les bactéries uropathogènes. Pour les réponses anti-fongiques, l'hétérodimère TLR2/TLR6 reconnaît le zymosan. Cinq TLRs sont impliqués dans la réponse anti-virale : TLR4 reconnaît la F protéine, l'ARN double brin (poly I :C) est le ligand de TLR3, l'ADN CpG est reconnu par TLR9, les ARN viraux simple brins sont les ligands de TLR7 (seulement chez l'Humain) et TLR8. Les protéines à ancrage GPI des protozoaires sont reconnues par les dimères de TLR2. Enfin, les produits de l'inflammation (comme HSP60) sont reconnus par TLR4. Ce large répertoire de reconnaissance par les TLRs semble conférer la capacité à reconnaître tous les pathogènes envahissant le corps humain. GIPL, *glycoinositolphospholipid* ; VSV, *vesicular stomatitis virus*. D'après Liew et al., *Nature Reviews*, 2005.

Selon les ligands cibles, les TLRs peuvent être aussi bien membranaires que cytoplasmiques. Les TLRs qui détectent les composants membranaires des pathogènes comme les lipides, les protéines et les lipoprotéines sont localisés à la surface des cellules de l'immunité innée (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6). Ceux détectant les acides nucléiques, comme TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9, sont localisés dans les compartiments intracellulaires. Cette spécificité de localisation des TLRs permet de réguler la reconnaissance et la signalisation qui en découle (McGettrick and O'Neill, 2010). Elle est facilitée par l'intervention de protéines chaperonnes, de GTPases et des protéines adaptatrices (Kagan and Medzhitov, 2006; Pradere et al., 2013; Tabeta et al., 2006; Takahashi et al., 2007; Wang et al., 2010a; Yang et al., 2007).

1.3.4.2. Les voies de signalisation des TLRs

En plus de la localisation, l'homo- ou l'hétérodimérisation des récepteurs est nécessaire à la reconnaissance des différents ligands. Ces hétérodimères pré-existent à toutes formes de stimulation par les agonistes (Triantafyllou et al., 2006). Par exemple, bien que l'hétérodimérisation de TLR2 soit essentielle à l'induction d'une réponse face à un large répertoire d'agonistes, elle n'est pas suffisante. D'autres protéines participent à l'activation de

TLR2 et facilitent la reconnaissance des lipopeptides ou la transduction du signal. En effet, CD36 est décrit comme étant un récepteur de la famille des *scavenger*. Il détecte les diacylglycérides microbiens et s'associe avec l'hétérodimère TLR2/TLR6 (Hoebe et al., 2005). En aval de cet hétérodimère, TIRAP est impliqué dans la voie d'activation de NF- κ B (Figure 5) (Santos Sierra et al., 2009). TLR4 peut également s'hétérodimériser avec TLR6 puis, suite à la reconnaissance de lipoprotéines oxydées par CD36, former un complexe avec ce récepteur *scavenger* (Stewart et al., 2009). De la même manière, CD14 optimise l'affinité de TLR4 pour le LPS. Il s'associe également avec les deux hétérodimères de TLR2 bien qu'il participe préférentiellement à l'activation de NF- κ B en aval de TLR2/TLR1 (Janot et al., 2008; Triantafilou and Triantafilou, 2002). D'autres protéines transmembranaires, comme la β 2 intégrine, le CMHI ou les TNF récepteurs participent à la régulation de la signalisation des TLRs en favorisant la fixation aux pathogènes, en modifiant la reconnaissance des ligands endogènes ou en exerçant une signalisation croisée (Qian and Cao, 2013).

Les TLRs sont caractérisés par un domaine TIR cytoplasmique (Takeuchi and Akira, 2010). Suite à la fixation de leur ligand, les TLRs recrutent différents adaptateurs protéiques comme MyD88, TIRAP/Mal, TRAM (TRIF-Related Adaptor Molecule) et TRIF (TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon beta) au travers des interactions TIR-TIR. A l'exception de TLR3, tous les TLRs recrutent MyD88 (Qian and Cao, 2013). Ces adaptateurs engagent des voies de signalisation aboutissant à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B, AP1 et IRFs (Akira and Takeda, 2004; O'Neill and Bowie, 2007). Ces derniers régulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation et l'immunité comme les cytokines (TNF α , IL1, IL6, IL10, IL12, IFN), les chémokines (IL8, MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1), MI-1 α , MIP-1 β , RANTES), les molécules d'adhésion (VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule), ICAM (Intracellular Cell Adhesion Molecule), P-sélectine), les récepteurs membranaires (CMH, Intégrine β) (Takeuchi and Akira, 2010) (Figure 9). De manière schématique, les signaux de l'inflammation sont transcrits par les voies de signalisation dépendantes de MyD88 et de TRIF (Figure 5).

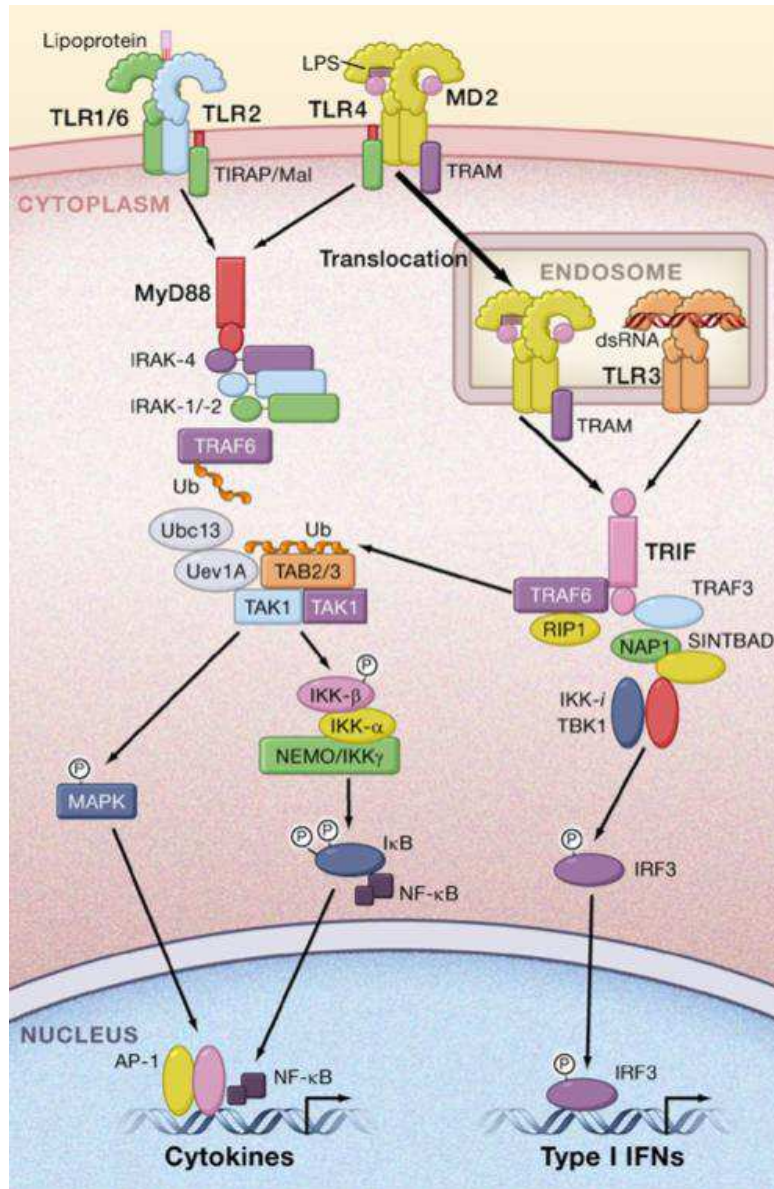


Figure 5. Les voies de signalisation dépendantes de MyD88 et de TRIF. Les lipoprotéines et le LPS sont respectivement reconnus à la surface des cellules par un hétérodimère de TLR1-6 et TLR2 ainsi que par le complexe TLR4/MD2. La stimulation par le ligand induit le recrutement de MyD88 et TIRAP sur la partie cytoplasmique de TLR et un complexe composé d'IRAKs et de TRAF6 est alors formé. TRAF6 agit comme une E3 ubiquitine ligase et catalyse la formation d'une chaîne polyubiquitinylée sur elle-même. De plus, il génère une chaîne d'ubiquitines libre avec le complexe E2 ubiquitine ligase de Ubc13 et Uev1A. Cette ubiquitination active le complexe TAK1, TAB1 et TAB2/3 résultant de la phosphorylation de NEMO et de l'activation du complexe IKK. La sous-unité IκB phosphorylée est dégradée et le NF-κB, ainsi libéré, transloque dans le noyau. Il y régule l'expression des gènes codant pour les cytokines. Simultanément, TAK1 active la cascade des MAPKs aboutissant à l'activation de AP-1. Ce facteur de transcription induit également la transcription de cytokines. Le LPS induit la translocation du complexe TRAM/TLR4 dans l'endosome. TLR3 est prélocalisé dans l'endosome où il reconnaît les ARNs double brin. TLR3 et TLR4 activent la voie de signalisation TRIF dépendante. Cette voie aboutit à l'activation de NF-κB et IRF3 qui induisent la transcription des gènes codant pour les cytokines proinflammatoires et des interférons de type I. TRAF6 et RIP1 activent NF-κB alors que TRAF3 est responsable de la phosphorylation de IRF3 par TBK1/IKK-i. NAP1 (NAK(NF-κB-activated kinase)-associated protein 1) et SINTBAD (Similar to NAP1 TBK1 adapter) sont essentiels à l'activation de TBK1/IKK-i. L'IRF3 phosphorylé est transloqué dans le noyau pour y induire l'expression des gènes des IFNs de type I. D'après Takeuchi et Akira, *Cell*, 2010

1.3.4.2.1. La voie de signalisation dépendante de MyD88

L'adaptateur MyD88 est composé d'un domaine DD (Death Domain) en plus du domaine TIR. MyD88 est essentiel à la signalisation en aval de différents TLRs. En effet, les enfants présentant des déficiences de MyD88 souffrent d'infections bactériennes récurrentes. La signalisation de TLR2 et TLR4 nécessite la coopération de TIRAP/Mal pour faciliter l'interaction entre MyD88 et les TLRs activés. MyD88 interagit avec une sérine/thréonine kinase dotée d'un DD en N-terminal, IRAK4 (IL1R Associated Kinase). IRAK4 active d'autres membres de la famille IRAK : IRAK1 et IRAK2 (Kawagoe et al., 2008). Les IRAKs se dissocient alors de MyD88 et interagissent avec TRAF6 (Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 6), dont le rôle est celui d'une E3 ubiquitine ligase. Ils s'associent en complexe avec Ubc13 et Uev1a. TRAF6 catalyse alors son auto-polyubiquitination ainsi que la formation d'une chaîne d'ubiquitines libre (Xia et al., 2009). Un complexe, composé par TAK1 (TGF- β -activated kinase), TAB1 (TAK1-binding protein), TAB2 et TAB3, est activé par la chaîne d'ubiquitines libre de TRAF6. Il phosphoryle alors IKK β (I κ B Kinase) et la MAPK kinase 6 (MAPKK6). D'une part, il résulte de la phosphorylation d'IKK β , que le complexe IKK (composé d'IKK α , IKK β et NEMO (NF- κ B essential modulator)) phosphoryle I κ B α , une protéine inhibitrice de la voie NF- κ B. La phosphorylation d'I κ B induit sa dégradation par le système ubiquitine protéasome, ce qui libère NF- κ B. NF- κ B se transloque alors dans le noyau et active la transcription des gènes codant pour des cytokines et des mécanismes pro-inflammatoires (Figure 5) (Takeuchi and Akira, 2010). D'autre part, la phosphorylation de MAPKK6 active la voie des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase), qui est composée de trois sous-familles, les JNKs (c-Jun-N-terminal Kinase), les ERKs (Extracellular-Regulated Kinase) et les p38. Cette activation est responsable de l'engagement d'un autre facteur de transcription, AP1 qui cible des gènes codants pour des cytokines (Takeuchi and Akira, 2010). Ce facteur transcriptionnel est composé des protéines Jun et Fos qui forment des homo- ou des hétérodimères.

1.3.4.2.2. La voie de signalisation dépendante de TRIF.

L'étude des souris déficientes pour MyD88 (*myd88*^{-/-}) a mis en lumière l'existence d'une voie indépendante de MyD88. Cette voie est engagée suite à la liaison de TLR3 et TLR4 avec leurs agonistes (ARN double brin ou LPS). Bien que ces souris aient une diminution de l'activation de NF- κ B après l'injection intra-péritonéale de LPS, leur

production d'IFN β et l'expression des gènes régulés par IRF3 sont conservées (Kawai et al., 1999). Ces études ont débouché sur la recherche d'une molécule adaptatrice impliquée dans les voies de TLR3 et de TLR4. La molécule adaptatrice TRIF (Tir-containing adapter inducing IFN β) s'est avérée être impliquée dans la voie indépendante de MyD88 (Hoebe et al., 2003).

En réponse à la stimulation par des ARNs double brin, TLR3 recrute directement TRIF, contrairement à TLR4 qui a besoin d'un intermédiaire, TRAM (Palsson-McDermott et al., 2009). TRIF est associé avec TRAF3 et TRAF6 à travers ses motifs TRAF-binding, en N-terminal. TRIF contient également un motif RHIM (RIP (Receptor-interacting protein) homotypic interaction motif), qui interagit ainsi avec RIP1 et RIP3 (Carty et al., 2006). TRAF6 et RIP1 activent NF- κ B alors que TRAF3 active TBK1 (TANK (TRAF family member-Associated NF-KappaB activator)-Binding Kinase)/IKK-*i* par l'intermédiaire de NAP1 et SINTBAD. TRAF3 est ainsi responsable de la phosphorylation de IRF3 par TBK1/IKK-*i*. L'IRF3 phosphorylé est transloqué dans le noyau pour y induire l'expression des gènes des IFNs de type I (Figure 5) (Takeuchi and Akira, 2010; Tenover et al., 2007).

En parallèle, un adaptateur essentiel de la voie des TNF récepteurs est impliqué dans la voie de signalisation de TRIF, TRADD (TNFR (TNF Receptor) associated death domain). TRADD forme un complexe avec FADD (FAS-associated death domain containing protein) et RIP1. Ce complexe est impliqué dans la voie de signalisation dépendante de TRIF (Ermolaeva et al., 2008; Pobezinskaya et al., 2008). L'ubiquitination de RIP1 ultérieure est un événement essentiel dans l'activation de NF- κ B qui permet à FADD d'activer la caspase 8 ou la caspase 10 en réponse au poly I : C (Polyinosinic : polycytidylic acid). Enfin, la forme clivée de ces caspases active NF- κ B (Takahashi et al., 2006).

1.3.4.3. La signalisation de TLR2

Comme tous les autres TLRs, TLR2 peut s'hétérodimériser. Ses partenaires sont TLR1 ou TLR6. Cette aptitude résulte en la formation de poches de fixation distinctes qui facilitent la reconnaissance des lipopeptides diacétylés et triacétylés. La fixation entre TLR2 et les lipopeptides est forte tout en étant relativement non-spécifique. Cette interaction se fait, au niveau des LRR9 à LRR12, par les résidus hydrophobes, entre les ponts ester des acides gras et la poche interne de TLR2. Cette conformation suffit à l'induction du signal intracellulaire par la fixation des lipopeptides diacétylés. La reconnaissance du lipopeptide tri-acétylé par TLR2 et l'hétérodimérisation requièrent l'interaction entre un acide gras en C-terminal du

lipopeptide et un canal hydrophobe d'une LRR de TLR1. Pour TLR6, ce canal hydrophobe est bloqué par deux phénylalanines ce qui l'empêche de se fixer à la troisième acétylation d'un lipopeptide (Figure 6) (Schenk et al., 2009).

Les hétérodimères TLR2/TLR1 ou TLR2/TLR6 reconnaissent leurs agonistes. Ils engagent deux voies de signalisation, qui aboutissent à l'activation de l'hétérodimère p50/p65 de NF- κ B (Akira and Takeda, 2004). La première voie est la voie MyD88-dépendante. La deuxième voie nécessite l'engagement de Rac1, de la PI3-K et Akt (Arbibe et al., 2000) (Figure 7). La phosphorylation du domaine TIR de TLR2, suite à sa stimulation par son agoniste, induit le recrutement rapide de Rac1, ainsi que de la PI3-K. La PI3-K de type IA est composée de deux sous-unités : la sous-unité régulatrice p85 α et la sous-unité catalytique p110. La sous-unité p85 α de la PI3-K porte des domaines SH2 qui lui permettent de se lier aux motifs phosphorylés sur tyrosine des domaines TIR de TLR2 (Arbibe et al., 2000; Neel et al., 2003; Troutman et al., 2012). La sous-unité catalytique peut se présenter sous trois isoformes α , β ou δ . Cette sous-unité phosphoryle le PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) en PIP3 (Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate). Le domaine PH (Pleckstrin Homology) de la sérine/thréonine kinase Akt est très affiné pour le PIP3. Ce recrutement membranaire de Akt permet aux kinases PDPK1 (Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase) et PDPK2 de phosphoryler sur ses sérines 308 et 473 (Cantley, 2002). Akt, ainsi activée, induit la phosphorylation de la sous-unité p65 de NF- κ B sur sa sérine 536. Cette étape est indispensable à l'activation de NF- κ B, sans pour autant influencer la translocation nucléaire du facteur de transcription (Arbibe et al., 2000).

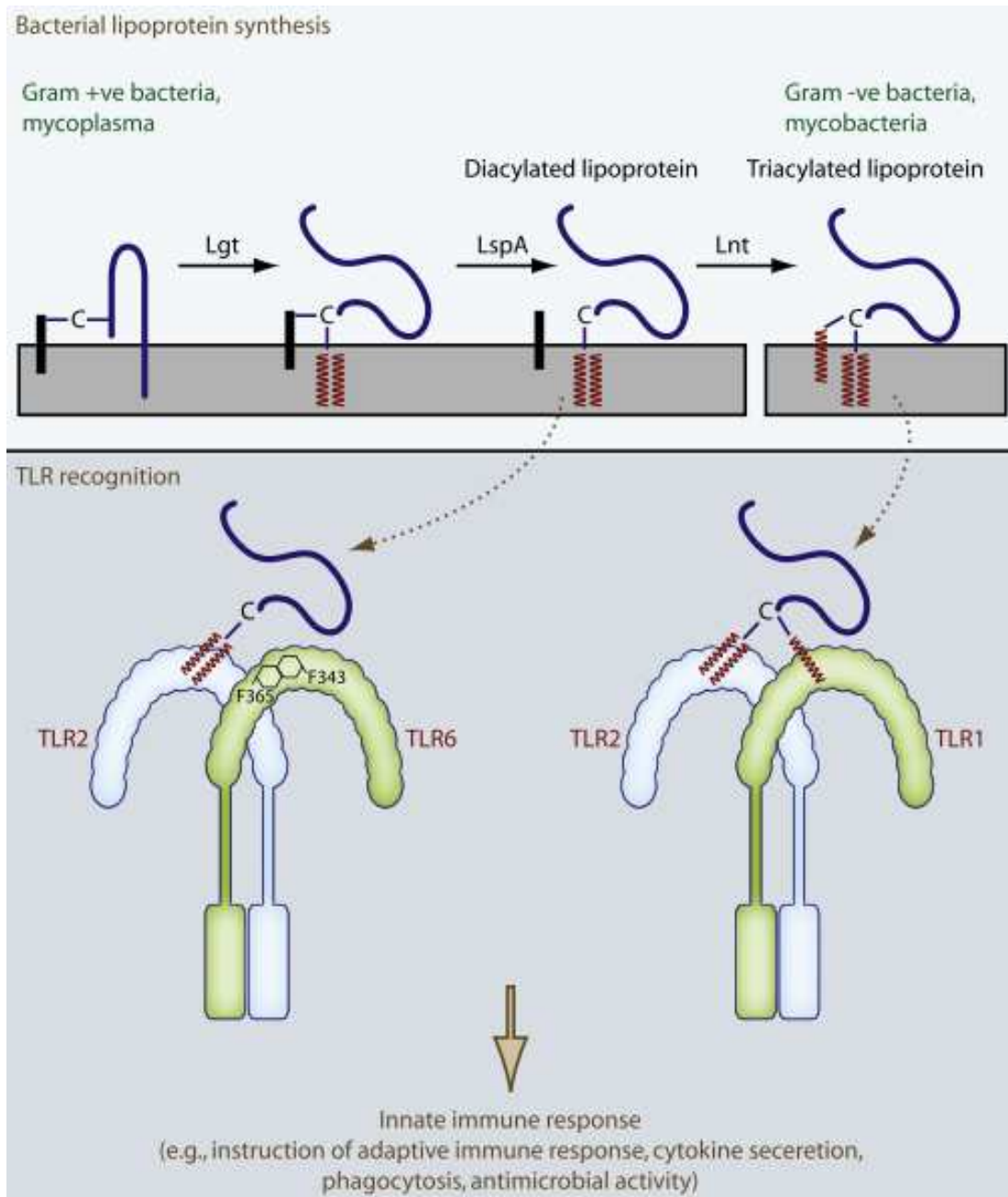


Figure 6. Reconnaissance par TLR2 et réponse aux lipopeptides bactériens. Les protéines bactériennes sont la cible d'acétylation sur leurs cystéines N-terminales. Dans les bactéries à Gram-positif et le mycoplasme, les lipopeptides subissent une di-acétylation, alors que celles des bactéries à Gram-négatif et des mycobactéries subissent une tri-acétylation. TLR2 forme un hétérodimère avec TLR1 ou TLR6. TLR1 a un canal hydrophobe qui fixe le troisième acétyl, ce qui lui permet de lier les lipopeptides triacétylés. Ce canal hydrophobe est clos dans TLR6 par la présence de phénylalanines, de manière à ce que l'hétérodimère TLR2/TLR6 reconnaisse les lipopeptides diacétylés. Chacun de ces hétérodimères induit une cascade d'activation aboutissant à l'induction du système immunitaire inné, incluant l'instruction de la réponse immunitaire adaptative par la libération de cytokines, de la phagocytose, et de la réponse antimicrobienne.

D'après Schenk et al., Immunity, 2009.

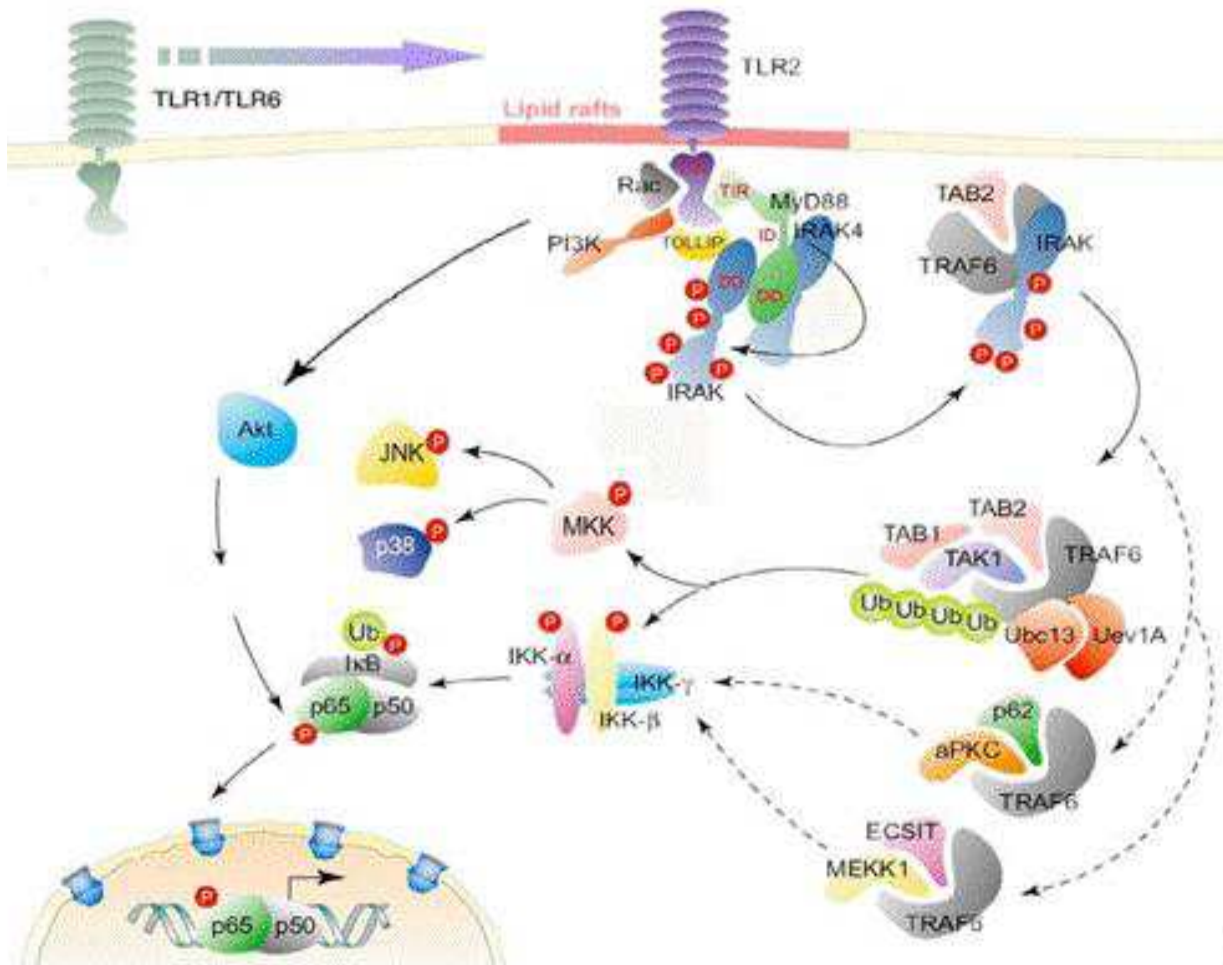


Figure 7. Signalisation de TLR2. Les hétérodimères TLR2/TLR1 ou TLR2/TLR6 reconnaissent leurs agonistes ce qui engage deux voies de signalisation. Ces voies aboutissent à l'activation de l'hétérodimère p50/p65 de NF- κ B. La première voie est la voie MyD88-dépendante. La deuxième voie nécessite l'engagement de Rac1, de la PI3-K et Akt. Cette voie conduit à la phosphorylation de la sous-unité p65 de NF- κ B. D'après Arbibe et al., *Nature Immunol*, 2000.

2. Régulation de la réponse immunitaire innée

2.1. La régulation membranaire

La membrane plasmique des cellules eucaryotes permet de participer au maintien de la physiologie des cellules (la communication, le transport, les contacts, la transduction du signal) (Fivaz et al., 1999; Pike, 2004, 2006; Simons and Ikonen, 1997; Simons and Toomre, 2000). Elle est composée de radeaux lipidiques (microdomaines constitués d'une variété de lipides et de protéines) qui la rendent hétérogène.

2.1.1. Les plateformes de signalisation

Au cours des dernières années, les radeaux lipidiques ont largement été étudiés et leur rôle dans le maintien de la physiologie cellulaire a été montré (Edidin, 2003; Lingwood and Simons, 2009; Pike, 2008). Ces microdomaines membranaires sont riches en sphingolipides et en cholestérol. Les sphingolipides interagissent avec le cholestérol dans les repliements externes de la membrane cellulaire, ce qui induit la formation de domaines membranaires distincts au sein même des radeaux lipidiques. Ces régions membranaires sont extrêmement ordonnées et flottent dans la bicouche de glycérophospholipides (Dykstra et al., 2003). La composition de ces microdomaines leur confère une résistance aux détergents non-ioniques, à basse température (Brown and London, 1997). Ils peuvent être isolés par ultracentrifugation dans les fractions de faible densité.

La fonction de nombreuses protéines (à ancrage GPI, de signalisation et du cytosquelette) est dépendante de leur assemblage dans des radeaux lipidiques, indiquant leur rôle de plateformes de signalisation (Rajendran and Simons, 2005). En facilitant la co-localisation des protéines essentielles à la signalisation cellulaire, les radeaux lipidiques participent à la réponse immunitaire (Henderson, 2004). Leur rôle dans la transduction du signal, suite à un *stimulus*, se fonde sur la facilitation de la localisation de tous les composants au niveau d'un compartiment membranaire. Cette compartimentation dans les radeaux lipidiques prévient l'attaque de ces molécules par des enzymes défavorables. En effet, en protégeant les protéines phosphorylées de l'action de leurs phosphatases et en formant des complexes de signalisation, pouvant eux-mêmes se réunir en de plus larges plateformes, ces microdomaines peuvent amplifier ou moduler une signalisation, ou même être le carrefour de plusieurs voies de signalisation et fonctions cellulaires (trafic vésiculaire, signalisation, internalisation et bourgeonnement viral) (Rajendran and Simons, 2005; Zajchowski and Robbins, 2002). Le cholestérol présent dans ces domaines joue un rôle essentiel dans l'endocytose et le trafic intracellulaire permettant l'internalisation des toxines, bactéries et virus (Figure 8) (Lajoie and Nabi, 2007; Rajendran and Simons, 2005; Simons and Ehehalt, 2002).

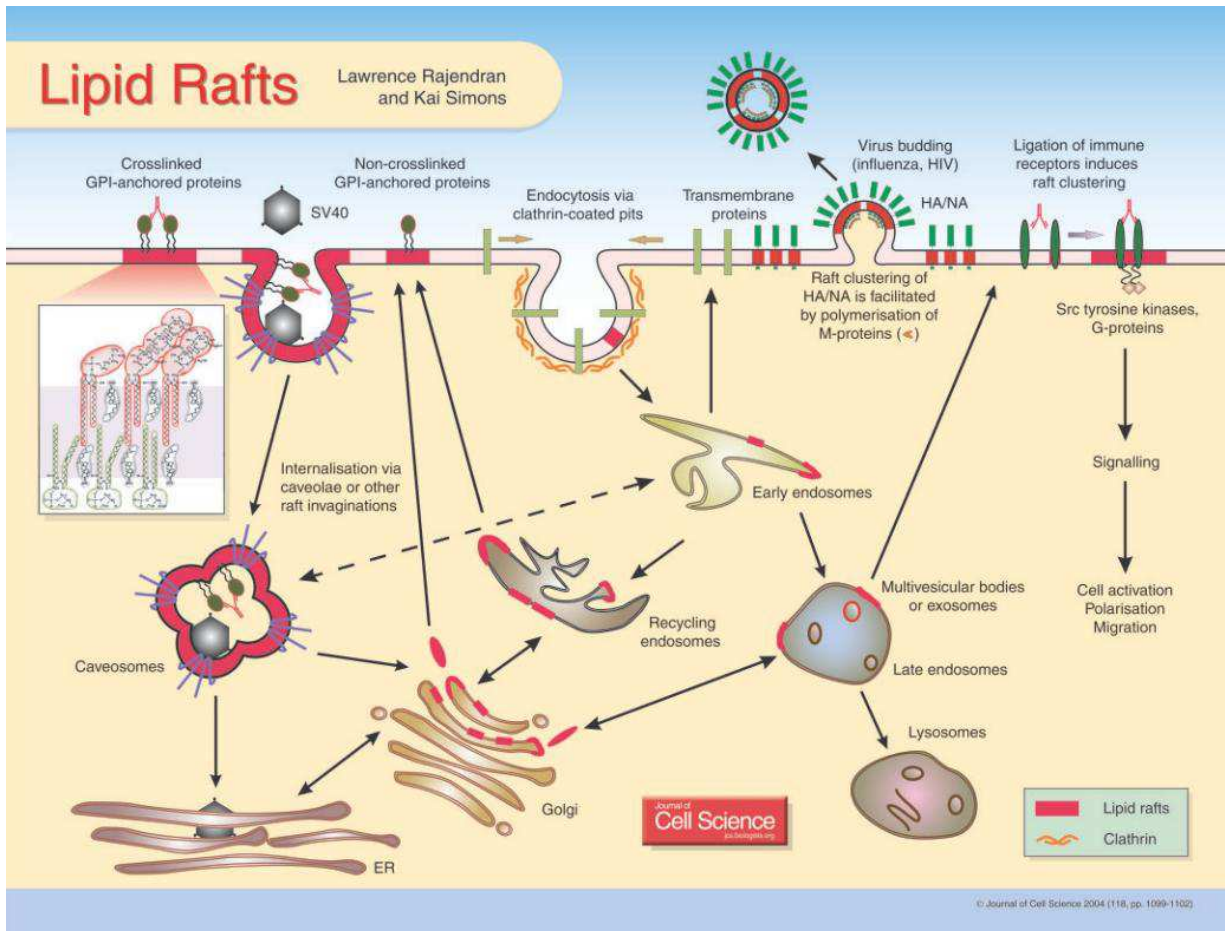


Figure 8. Rôle des radeaux lipidiques dans les mécanismes cellulaires. La membrane est composée de plusieurs radeaux lipidiques, assimilés à des structures dynamiques. Ils sont constitués de PRRs ainsi que de molécules permettant la transduction du signal. Après stimulation, les radeaux lipidiques peuvent alors fusionner et devenir de larges plaques membranaires stables. Ces plaques recrutent ou excluent un ensemble de protéines membranaires. Les radeaux peuvent alors intervenir dans différentes fonctions cellulaires (trafic vésiculaire, signalisation, internalisation et bourgeonnement viral).
D'après Rajendran et Simons, Journal of Cell Science, 2005.

Par ailleurs, les radeaux lipidiques organisent la réponse immunitaire en autorisant cette colocalisation. Initialement étudiées dans l'immunité adaptative, ces plateformes de signalisations ont également été impliquées dans la réponse immunitaire innée de part leur rôle dans la formation des synapses immunologiques (Riethmuller et al., 2006; Saito and Yokosuka, 2006; Zech et al., 2009). Dans l'immunité innée, elles participent à l'internalisation des pathogènes et à la réponse inflammatoire (Lajoie and Nabi, 2007; Riethmuller et al., 2006). Ces radeaux facilitent le rapprochement des PRRs avec les molécules permettant la transduction du signal consécutive à un stimulus. Dans le cas de l'engagement des TLRs, la composition protéique des radeaux lipidiques varie. Le détail de ce protéome et de ses variants est méconnu et représente la problématique principale de notre équipe.

Régulation de la réponse immunitaire

Des travaux préliminaires du laboratoire ont associé diverses techniques de protéomique afin de déterminer les protéines qui sont recrutées ou exclues différenciellement en fonction de l'état de stimulation et de l'hétérodimère de TLR2 engagé dans des monocytes.

La structure membranaire joue un rôle essentiel dans l'organisation de la réponse immunitaire. En effet, la répartition spatio-temporelle des PRRs est indispensable à leur activité de reconnaissance et de signalisation. Les radeaux lipidiques sont constitués d'un certain nombre de récepteurs et de molécules d'adhésion ou de co-stimulation comme CD14, CD16, CD48 et CD58. Les récepteurs sont ancrés dans les plateformes par des groupements GPI. En revanche, en l'absence de stimulation, les autres protéines transmembranaires en sont en général exclues (Horejsí et al., 1999). Cependant, la palmitoylation leur permet d'être compartimentées dans les radeaux lipidiques. Les récepteurs impliqués dans l'immunité possèdent une région transmembranaire dont les caractéristiques conformationnelles et chimiques facilitent le mouvement membranaire ainsi que la localisation dans des microdomaines riches en céramides (Bock and Gulbins, 2003; Grassmé et al., 2003). Ils sont recrutés dans les radeaux lipidiques suite à une stimulation par leurs agonistes. Ils peuvent ainsi former des complexes avec les autres protéines nécessaires à la signalisation. Les radeaux lipidiques peuvent également recruter des protéines cytoplasmiques à condition qu'elles aient une double acétylation (palmitoylation ou myristoylation). Des Src kinases, comme Lyn, ainsi que certaines GTPases subissent ces modifications post-traductionnelles ce qui leur permet d'être recrutées dans les radeaux lipidiques en réponse à un stimulus particulier (Koegl et al., 1994; Prior et al., 2001; Yang et al., 2010). Enfin, certaines molécules comme les phosphoinositides PIP2 et PIP3 sont très représentées dans ces microdomaines où elles participent à la transduction du signal (Lasserre et al., 2008; Triantafilou et al., 2002; Wang and Richards, 2012).

De part leur capacité à réguler les interactions et les fonctionnalités protéiques, les radeaux lipidiques permettent la formation d'un complexe moléculaire d'activation spécifique du PRR (Kawai and Akira, 2006; Ozinsky et al., 2000; Trinchieri and Sher, 2007). Les TLRs activés et dimérisés sont ainsi recrutés rapidement et transitoirement dans ces plateformes de signalisation (Shin et al., 2008; Soong et al., 2004; Triantafilou et al., 2004; Wong et al., 2009). De nombreuses molécules de signalisation sont ainsi activées comme la NADPH oxydase, MyD88, IRAK1, PI3-K, Rac1 et les protéines chaperonnes, du type des HSPs. Tous les éléments de la transduction du signal étant ainsi spatialement rapprochés, une réaction

inflammatoire peut alors être induite (Levitan and Barrantes, 2012; Shin et al., 2008; Soong et al., 2004; Triantafilou et al., 2002). Au sein de cette plateforme de signalisation les cascades de phosphorylations sur résidus tyrosines sont importantes. En effet, de nombreuses Src kinases sont recrutées dans les radeaux lipidiques et la stimulation des récepteurs (comme par de l'exoenzyme, composant de *P.aeruginosa*) est concomitante d'une augmentation des phosphorylations sur résidus tyrosines. Cette cascade aboutit à la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α (Epelman et al., 2008).

En plus de réguler la formation des complexes protéiques, les microdomaines membranaires modulent l'inflammation. Ils internalisent les récepteurs de l'immunité, comme les TLRs, par endocytose. En effet, on observe que la stimulation de TLR4 induit sa translocation, clathrine et dynamine dépendante, dans l'endosome (Tanimura et al., 2008). TLR4 est alors dégradé par le système ubiquitine-protéasome ce qui diminue l'activation de NF- κ B (Husebye et al., 2006). Cependant, la localisation de TLR4 dans les endosomes précoces ne conduit pas à sa dégradation mais à l'engagement de la voie TRIF/TRAM, indépendante de MyD88 (Kagan et al., 2008). Cette voie est inhibée, au niveau de l'endosome tardif, par la déstabilisation du complexe TRIF/TRAM *via* TAG (variant inhibiteur de TRAM). Cette dislocation initie la dégradation de TLR4 (Sheedy et al., 2009). Le mécanisme d'endocytose de TLR4 participe à l'activité présentatrice d'antigènes des cellules (Figure 5) (Husebye et al., 2006).

D'autre part les radeaux lipidiques participent à l'éradication directe des pathogènes, non plus par leurs protéines, mais par leurs composants lipidiques. En effet, certains pathogènes (*H. pylori*, *E. coli* et *C. albicans*) interagissent avec des sphingosines des radeaux lipidiques à la surface des PNNs, ce qui induit la production d'ions superoxydes et de molécules participant au chimiotactisme (Yoshizaki et al., 2008). La déstabilisation des radeaux par la M β CD (methyl- β -cyclodextrine) est corrélée avec la diminution significative de l'internalisation du pathogène par les cellules phagocytaires (Alfsen et al., 2001; Gilk et al., 2013; Grassmé et al., 2003; Rajendran and Simons, 2005; Vieira et al., 2010). En effet, l'interaction entre les lipides du microdomaine et le cytosquelette de la cellule module le trafic vésiculaire, la maturation et la fusion lysosomale.

Ces plateformes de signalisation participent également au mécanisme d'apoptose. Si elles ne sont pas stables, un pathogène comme *P.aeruginosa* n'est plus internalisé et l'apoptose des cellules infectées est diminuée. L'infection n'est alors plus contrôlée et elle tend à induire une production anarchique de cytokines pro-inflammatoires, ce qui abouti le plus souvent à la

mort du patient par choc septique (Grassmé et al., 2003; Grassme, 2000; Riethmuller et al., 2006). Suite à la stimulation du PRR par son pathogène, l'internalisation de ce dernier nécessite l'engagement de Src kinases. La reconnaissance de *P.aeruginosa* par TLR2 induit, par exemple, l'endocytose du pathogène par un remaniement du cytosquelette médié par l'activation de la PI3-K *via* Lyn (Kannan et al., 2008).

Enfin, au cours de l'évolution, un certain nombre de pathogènes ont développé un mécanisme de subversion du système immunitaire fondé sur l'utilisation des radeaux lipidiques comme voie d'entrée pour infecter les cellules cibles (Hartlova et al., 2010; Manes et al., 2003; Riethmuller et al., 2006). Les pathogènes intracellulaires tendent à envahir la cellule par une voie clathrine-indépendante, ce qui leur évitent la dégradation lysosomale. Ils se créent alors leurs vésicules, s'offrant ainsi un environnement favorable à leur réplication. Ils peuvent donc interférer avec les voies classiques de signalisation aboutissant à l'éradication des pathogènes (Gatfield and Pieters, 2000).

2.1.2. Les partenaires extracellulaires

Les TLRs peuvent interagir avec des partenaires afin d'augmenter l'efficacité de la reconnaissance et de l'initiation de la réponse. En effet, des récepteurs solubles extracellulaires favorisent la reconnaissance des PAMPs par les TLRs (CD14, LBP ou MD2) (Frey et al., 1992; Kelley et al., 2012; Ranoa et al., 2013). Des éléments extracellulaires peuvent exercer un rôle inhibiteur sur l'inflammation telles que des formes solubles des récepteurs et des co-récepteurs (CD14, TLR4 ou TLR2) qui entrent en compétition avec leurs homologues membranaires (Figure 9). Ces formes solubles sont produites par des monocytes/macrophages et inhibent leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (comme le TNF α), en réponse à un stimulus (Frey et al., 1992; Kelley et al., 2012; Raby et al., 2009; Zunt et al., 2009). L'environnement extracellulaire participe également à la réponse anti-infectieuse. La vitronectine, par exemple, est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire qui facilite la reconnaissance des lipopeptides bactériens par le complexe TLR2/ β 3 intégrine (Gerold et al., 2008).

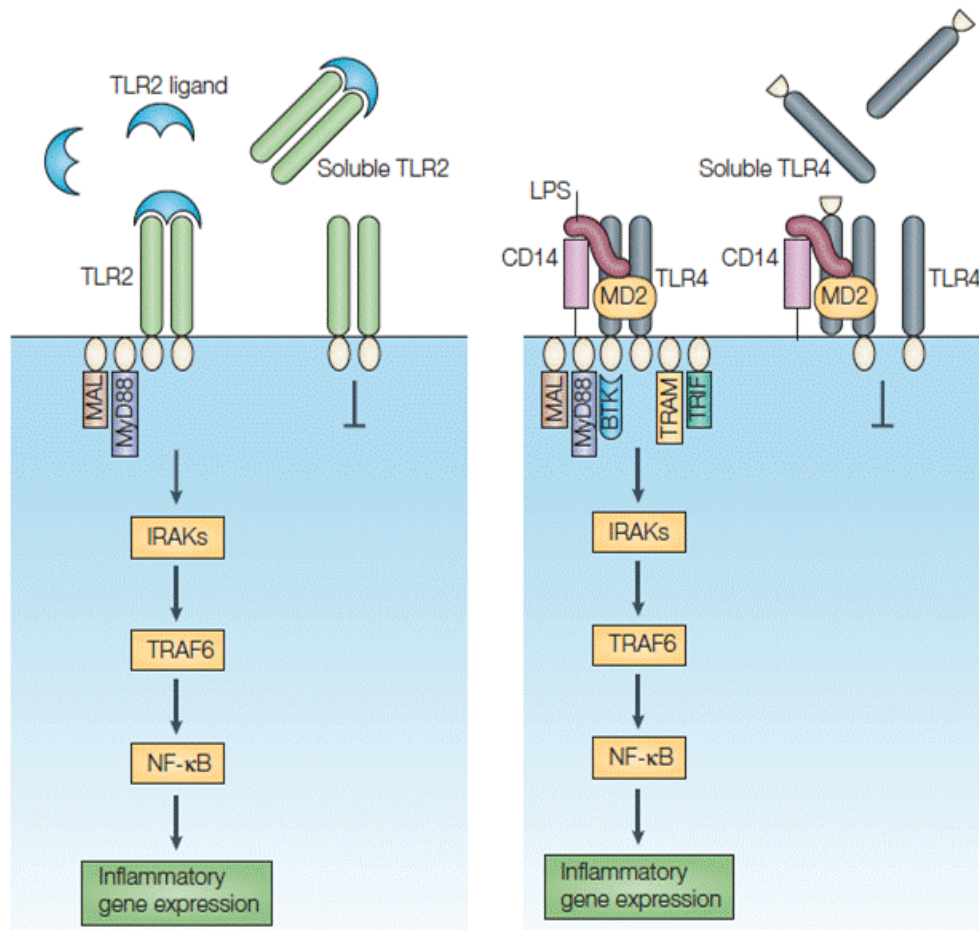


Figure 9. Régulateurs solubles des TLRs. Les formes solubles des TLRs représentent les premières lignes de blocage de la signalisation. Par exemple, les TLR2 membranaires et solubles peuvent se lier au même ligand. L'interaction du TLR2 membranaire avec son agoniste initie l'activation de la signalisation dépendante de MyD88 qui aboutit à l'expression des gènes inflammatoires. Dans le panneau de gauche, le TLR2 soluble peut entrer en compétition avec la forme membranaire. Il prévient ainsi l'interaction entre la forme membranaire de TLR2 et son ligand, ce qui bloque la signalisation en aval. Dans le panneau de droite, MD2 et CD14 sont les co-récepteurs nécessaires à la reconnaissance du LPS par TLR4 et à l'activation des facteurs de transcription de la famille de NF- κ B. Le TLR4 soluble peut interagir avec MD2 et inhiber la formation du complexe TLR4/MD2, ce qui bloque la signalisation en aval. Btk, *Bruton's tyrosine kinase* ; TRAF, *Tumor-necrosis factor-Receptor-Associated Factor 6* ; TRIF, *TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon beta* ; TRAM, *TRIF-Related Adaptor Molecule* ; IRAK, *Interleukine-1 receptor associated kinase*.
D'après Liew et al, *Nature Reviews Immunology*, 2005.

2.1.3. Les partenaires transmembranaires

La régulation de l'inflammation peut également se faire au niveau membranaire du fait de la grande diversité des récepteurs. L'invasion de l'organisme par un pathogène peut engager plusieurs TLRs. Ils peuvent interagir entre eux ou avec d'autres PRRs comme la lectine, les récepteurs du complément ainsi qu'avec des récepteurs inhibiteurs. Leurs actions peuvent se conjuguer vers une explosion de la réponse inflammatoire (Fan and Cook, 2004; Foster et al., 2007). L'engagement des voies MyD88 dépendante et indépendante aboutit par exemple à une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (Bagchi et

Herrup 2007). Le partenariat entre la dectine 1 (CLR reconnaissant les parois fongiques par leur composant majoritaire, le β -1-3-glucane) et TLR2 (Brown et al., 2003; Ifrim et al., 2013) facilite la résolution d'une infection fongique (comme *C. albicans*). En revanche, les PRRs peuvent se réguler mutuellement dans un phénomène de tolérance lors d'une infection secondaire (Fan and Cook, 2004; Foster et al., 2007). Ce phénomène est dû à l'inhibition de l'expression ou de l'activité de protéines modulatrices, comme IRAK1. Cependant, il induit une diminution de la réaction inflammatoire sans moduler la défense anti-microbienne (Tsukada et al., 2007; Turner et al., 2009). Ce phénomène est utilisé comme un mécanisme de subversion par un certain nombre de pathogènes comme *M. tuberculosis* (Simmons et al., 2010).

Par ailleurs l'action des TLRs peut croiser avec celle des récepteurs du complément (Hajishengallis and Lambris, 2011). Cette association, qui amplifie la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL1 β , IL6), implique surtout les TLRs engageant la voie MyD88-dépendante et le C5aR (Zhang et al., 2007). Ces deux voies peuvent également se réguler mutuellement. D'une part, CR3 augmente la quantité de PIP2 membranaire en activant ARF6, ce qui induit le recrutement de TIRAP/Mal et active la voie de signalisation en aval de TLR2. D'autre part, la stimulation de TLR2 engage la voie de la PI3-K, ce qui augmente l'affinité du CR3 pour son ligand (Harokopakis and Hajishengallis, 2005; Kagan and Medzhitov, 2006; Sendide et al., 2005).

D'autres récepteurs de l'immunité innée, connus pour leurs rôles de modulateurs négatifs, peuvent également inhiber la réponse inflammatoire, comme TRAILR, le récepteur de TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand), SIGIRR (Single ImmunoGlobulin IL1R-Related molecule), ST2 (interleukin 1 receptor-like 1) ou RP105 (Radioprotective Protein 105KDa) (Figure 10). TRAILR est identifié pour son rôle apoptotique dans les cellules tumorales. Des études menées dans des modèles murins *trail*^{-/-} ont montré une meilleure clairance virale (cytomégalovirus) ainsi que l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires, en réponse à la stimulation des macrophages par des agonistes de TLR2, TLR3 et TLR4. Par ailleurs, le lien est réciproque car la stimulation de l'un de ces TLRs induit une augmentation de la production de TRAIL (Diehl et al., 2004). SIGIRR est un récepteur qui possède un domaine TIR. Contrairement aux autres récepteurs composés de ce domaine, il n'initie aucune voie de signalisation en aval. Il peut cependant séquestrer MyD88, ce qui régule négativement la voie de signalisation en aval des TLRs (Gong et al., 2010; Wald et al., 2003). ST2 est connu pour être un régulateur négatif de la voie de signalisation en aval

de TLR2, en séquestrant MyD88 et Mal/TIRAP ou en bloquant la dégradation de I κ B (Brint et al., 2004; Buckley et al., 2011; Takezako et al., 2006). RP105 possède une structure homologue à celle des TLRs mais il a perdu un des domaines TIR. De manière similaire à l'hétérodimère TLR4/MD2, RP105 forme un complexe avec MD1. Des études *in vitro* ont montré que les deux hétérodimères s'expriment dans les mêmes types cellulaires et interagissent directement, ce qui diminue l'affinité du LPS pour TLR4/MD2. MD2 étant un corécepteur de TLR2, RP105 peut également inhiber sa signalisation en aval (Tada et al., 2008).

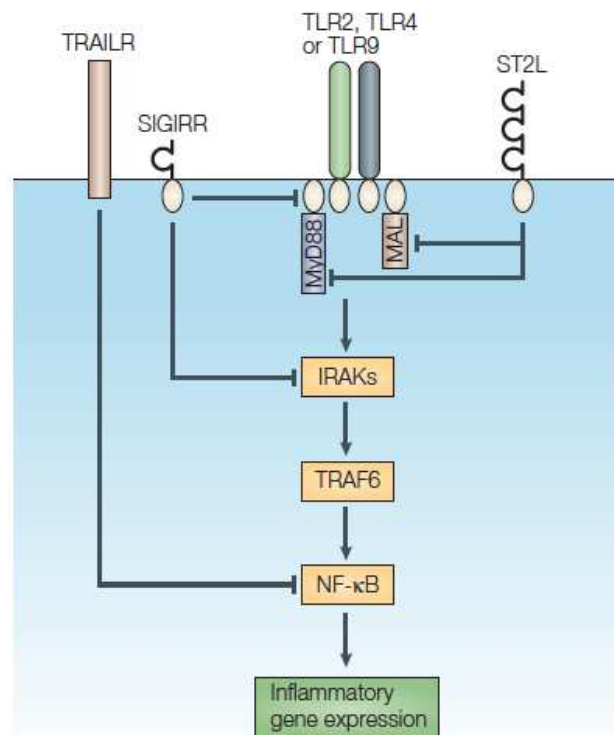


Figure 10. Représentation de la régulation des TLRs par des modulateurs transmembranaires. La signalisation en aval des TLRs peut être contrôlée par des régulateurs associés à la membrane. ST2L (interleukin 1 receptor-like 1) interagit avec MyD88 et Mal. Il séquestre les composants de la famille des facteurs de transcription NF- κ B dépendants de MyD88 et activés par TLR2, TLR4 et TLR9. SIGIRR (Single ImmunoGlobulin IL1R-Related molecule) se fixe sur TLR4 et IRAK et stoppe les voies de signalisation en aval. ST2L et SIGIRR n'affectent pas les voies de signalisation des TLRs indépendantes de MyD88. TRAIL-R (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor) supprime l'activation de la famille des facteurs de transcription NF- κ B en aval des TLRs. Il semble stabiliser I κ B et bloquer sa dégradation ce qui lui permet de réguler les voies dépendantes et indépendantes de MyD88.

D'après Liew et al, Nature Reviews Immunology, 2005.

Certaines bactéries engagent des récepteurs membranaires inhibiteurs leur permettant de détourner la réponse inflammatoire afin de survivre. C'est ainsi que le récepteur transmembranaire CEACAM1 reconnaît les protéines de surfaces bactériennes (uspA1 et opA) ce qui inhibe la signalisation en aval de TLR2 (Slevogt et al., 2008).

2.2. La régulation intra-cytoplasmique

2.2.1. Les régulateurs intracellulaires

Comme dans la régulation membranaire de la voie TLR - NF- κ B, les TLRs peuvent interagir avec d'autres récepteurs de l'immunité. Dans ce cas, les récepteurs sont des récepteurs solubles, les NLRs. Par exemple, l'inflammasome NALP3 intervient en aval de certaines voies de signalisation des TLRs. En effet, en aval de la stimulation de TLR4, il participe à la maturation de la pro-IL1 β et IL1 β et donc à l'activation de la caspase 1 (Giamarellos-Bourboulis et al., 2009). D'autres voies de signalisation, en aval de TLR7 et de TLR2/TLR6, aboutissent également à une activation de la caspase 1 par le mécanisme de l'inflammasome mais indépendamment de MyD88, Tirap/Mal ou TRIF (Kanneganti et al., 2006a, 2006b; Kleinnijenhuis et al., 2009; Yamamoto et al., 2004). Les NODs et les TLRs ont une molécule commune à leurs voies de signalisation, la kinase RICK (Receptor-Interacting serine/threonine Kinase). Les récepteurs pourraient amplifier mutuellement le produit de leur signalisation (Fritz et al., 2006; Tada et al., 2005).

Afin d'éviter les dommages hyper-inflammatoires, les voies de signalisation en aval des TLRs doivent être activées de manière transitoire. Elles sont donc composées de nombreux immuno-modulateurs solubles (Figure 11). Ils agissent essentiellement au niveau de la formation du complexe d'activation, suite à la reconnaissance du signal de danger par les TLRs, ou de la cascade de phosphorylations (Liew et al., 2005). Parmi eux, IRAKM inhibe la dissociation du complexe IRAK1/IRAK4, ce qui favorise la tolérance endotoxique (Kobayashi et al., 2002). IRAK2 possède de nombreux variants basés sur l'épissage du gène. Certains d'entre eux sont dépourvus de région DD, ce qui inhibe l'activation de NF- κ B de façon dose dépendante. TOLLIP (Toll Interacting Protein) est recrutée dans le complexe membranaire d'activation par le PIP3 membranaire. Elle interagit alors avec TLR2 ou TLR4 et bloque la voie d'activation de NF- κ B dépendante de MyD88 (Capelluto, 2012). MyD88s est un variant d'épissage de MyD88. Il séquestre MyD88 en s'hétérodimérisant, ce qui bloque spécifiquement l'activation de NF- κ B au niveau d'IRAK1 (Jeong and Lee, 2011).

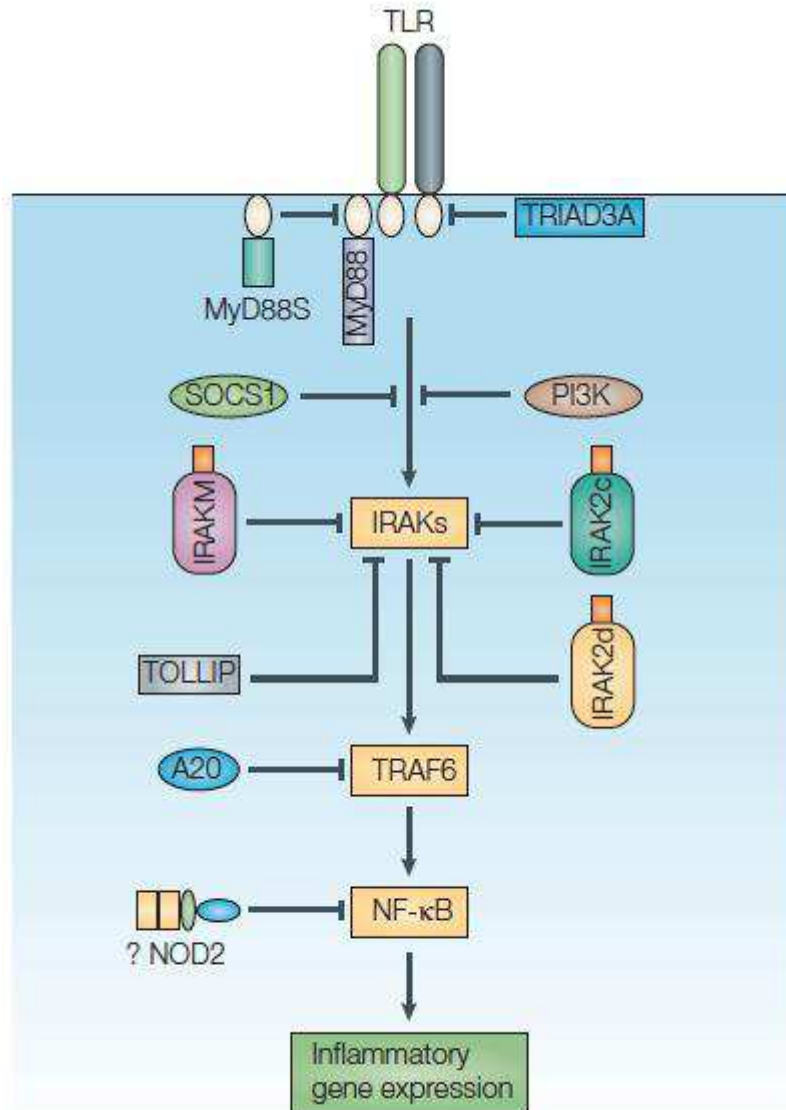


Figure 11. Représentation de la régulation des TLRs par des modulateurs intracellulaires. Les voies de signalisation en aval des TLRs sont finement régulées par des régulateurs endogènes. TRIAD3A induit l'ubiquitination et la dégradation de certains TLRs alors que MyD88s a des fonctions antagonistes de MyD88. Les protéines inhibitrices telles que SOCS1 (Suppressor Of Cytokine Signalling 1), IRAKM, TOLLIP (Toll-Interacting Protein), IRAK2c et IRAK2d suppriment sélectivement les fonctions de IRAK en ciblant les voies de signalisation en aval des TLRs. La PI3-K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) régule négativement les voies de signalisation en aval de certains TLRs. A20 dé-ubiquitine TRAF6 et affecte les voies de signalisation dépendantes et indépendantes de MyD88. NOD2 peut inhiber la signalisation en aval de TLR2 en supprimant l'activité de la famille des facteurs de transcription NF-κB.
D'après Liew et al, Nature Reviews Immunology, 2005.

2.2.2. Les cascades de phosphorylations

Le transfert de l'information des récepteurs jusqu'aux facteurs de transcriptions nécessite une séquence d'activité enzymatique. Les enzymes les plus fréquemment associées à la régulation de la défense anti-infectieuse sont les protéines kinases (Manning et al., 2002;

Murphy et al., 2012). Les résidus ciblés par ces enzymes sont les sérines, thréonines et tyrosines. Les phosphorylations de ces résidus ne sont pas exclusives. Leur équilibre permet la régulation de l'activité enzymatique des intermédiaires de la signalisation. Il est intéressant de noter que les phosphorylations sur sérines/thréonines sont plus fréquentes que celles sur tyrosines. Ces dernières sont pourtant indispensables à la signalisation dans la réponse immunitaire innée (Murphy et al., 2012; Nag and Chaudhary, 2009).

Des études expérimentales ont montré que les phosphorylations sur TLR2, TLR3, TLR4 et TLR5 sont essentielles à l'initiation des événements de signalisation en aval. Les tyrosines 616 et 761 sont les clés de la signalisation activatrice de la voie NF- κ B en aval de TLR2, alors que les 759 et 858 le sont pour TLR3. La kinase essentielle en aval des TLRs est la PI3-K. La sous-unité p85 se fixe aux résidus tyrosines phosphorylés *via* son domaine SH2. Les deux tyrosines de TLR2 sont essentielles au recrutement de la PI3-K alors que seule la tyrosine 759 est indispensable à TLR3. Certains des résidus tyrosines de TLR4 et TLR5 sont aussi indispensables à ce recrutement, comme la tyrosine 798 de TLR5 et les tyrosines 674 et 680 de TLR4 (Carpenter and O'Neill, 2009).

Des travaux complémentaires ont montré l'implication des modifications post-traductionnelles des molécules adaptatrices comme TIRAP/Mal ou MyD88. Mal est requise en aval de TLR4 et TLR2. Elle est sujette à de nombreuses modifications. Elle possède un domaine de fixation au PIP2, qui la localise dans la membrane plasmique où elle peut agir avec MyD88. Elle induit la phosphorylation de la Bruton's tyrosine kinase (Btk). Ses tyrosines 86, 106, 159 et 187 sont essentielles à la liaisons à Btk et à l'activation de NF- κ B (Carpenter and O'Neill, 2009). La protéine MyD88, quant à elle, possède un domaine reconnu par les SH2 en C-terminal. Des études sur TLR4 et TLR5 ont montré que la phosphorylation de ce motif « YxxM » permet le recrutement de la sous-unité p85 de la PI3-K, qui participe alors à l'activation de NF- κ B en aval de la signalisation (Laird et al., 2009; Rhee et al., 2006).

2.2.2.1. Les tyrosines kinases

Dans les cellules de l'immunité innée, les premières étapes de phosphorylation sur tyrosine sont à l'origine de fonctions anti-infectieuses telles que la phagocytose. En effet, la chaîne FcR γ est une molécule adaptatrice s'associant aux récepteurs dépourvus de domaine ITAMs comme les FcRs (Fc receptor) et la dectine 2. Elle leur permet d'initier la transduction du signal (Sánchez-Mejorada and Rosales, 1998; Sato et al., 2006). Les tyrosines kinases

Régulation de la réponse immunitaire

peuvent être des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) ou des protéines tyrosines kinases (PTK) cytoplasmiques. Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires composées d'un domaine à activité tyrosine kinase dans le compartiment cytoplasmique et d'un domaine de reconnaissance du ligand dans le milieu extracellulaire. L'interaction du ligand avec son récepteur induit une dimérisation de deux RTKs, leur phosphorylation et leur activation. Cette phosphorylation activatrice a surtout pour cible les tyrosines de motifs consensus tels que les domaines ITIMs (Immunoreceptor tyrosine based inhibition motifs) ou ITAMs (Immunoreceptor tyrosine based activation motifs). Ces sites consensus phosphorylés sur tyrosine présentent plus d'affinité pour de nombreux partenaires intracytoplasmiques, eux-mêmes impliqués dans la signalisation (Abram and Lowell, 2007; Verbrugge and Meyaard, 2005). Les kinases agissent donc rarement de manière isolée. Le plus souvent, elles sont au cœur de réseaux complexes d'autres kinases, de récepteurs, de protéines adaptatrices et de facteurs de transcription. La régulation de ce réseau est basée sur la localisation des partenaires et leur capacité à interagir. En effet les kinases peuvent posséder des domaines du type SH2 (Src Homology 2), SH3, PH (Pleckstrine Homology) ou GPI. Ces domaines interagissent respectivement avec les motifs phosphorylés sur tyrosines (ITIMs, ITAMs), les motifs riches en prolines, les régions membranaires riches en PIP3 ou les radeaux lipidiques (Manning et al., 2002).

Régulation de la réponse immunitaire

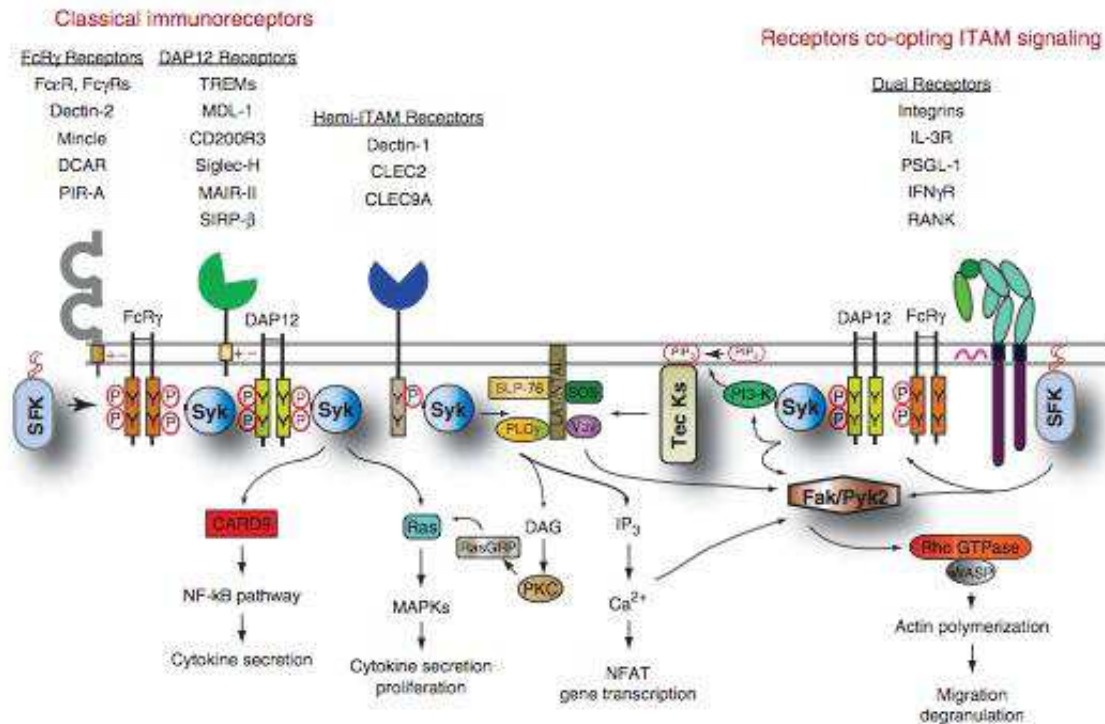


Figure 12. Représentation schématique de l'implication des PTKs cytoplasmiques utilisant des adaptateurs contenant des domaines ITAMs, dans la voie de signalisation activatrice. Les immunorécepteurs, les récepteurs hémis-ITAM « C-type lectin » et les récepteurs non-immunitaires peuvent utiliser des adaptateurs contenant des domaines ITAM et des tyrosines kinases cytoplasmiques. Les immunorécepteurs classiques engagent des molécules de signalisation, directement couplés aux adaptateurs FcR γ ou à DAP12, grâce aux modifications de charge des résidus transmembranaires (« + » et « - » sur la figure). Ces immunorécepteurs sont composés de protéines de la superfamille des immunoglobulines (comme FcR, PIR-A (Paired-immunoglobulin-like receptor) ou TREM (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells)) ou les CLR (comme la dectine 2, Mincle, MDL-1 (Myeloid DAP12-associating Lectin)). Les récepteurs peuvent utiliser leurs adaptateurs spécifiques de la signalisation. Les CLR, par exemple, ont des séquences ITAM-like assemblées avec leur queue cytoplasmique (comme la dectine 1, CLEC2 (C-type lectin-like receptor 2) et CLEC9A). Cette séquence diffère par le résidu tyrosine (« YxxxL » ou « YxxxI ») distal et non par celui (« YxxL ») localisé au niveau de la tyrosine proximale. Cette modification rend la tyrosine distale superflue dans la signalisation, d'où la désignation de ces récepteurs comme étant des molécules « hémis-ITAM ». Contrairement aux Fc γ RIIA, qui possèdent une séquence ITAM dans leur queue cytoplasmique, les FcR nécessitent des adaptateurs comme le FcR γ et DAP12. L'association entre ces récepteurs et les molécules adaptatrices est encore peu décrite. Elle est représentée par un « ~ ». Malgré les différences dans l'initiation des voies de signalisation spécifiques de chacun des récepteurs, les événements généraux qui succèdent à leur engagement sont similaires. La première étape implique l'activation des Src kinases, représentées par « SFK », qui sont ancrées à la membrane par leurs sites d'acétylation N-terminaux. Les Src kinases phosphorylent les adaptateurs ITAM, impliquant le recrutement de la Syk kinase, qui phosphoryle alors de nombreux autres substrats comme les molécules d'échafaudage (SLP76 (Lymphocyte cytosolic protein 2), LAT (raft-associated linker for activation of T cells) ou NTAL (Non-T cell Activating Linker)), qui recrutent des molécules de la famille de Vav pour initier la réponse. La fonction de Syk est essentielle pour l'activation de la PI3-K, qui génère du PIP3 membranaire. Ce lipide sert de point d'ancrage aux kinases de la famille des Tec. Les membres de la famille des Tec kinases contribuent à la phosphorylation des protéines d'échafaudage. Ces trois kinases cytoplasmiques participent à la voie de signalisation dépendante du calcium, à l'activation des MAPK et à l'activation de NF- κ B. Syk et les Src kinases induisent l'activation d'autres kinases (FAK/Pyk2). Elles participent à la polymérisation de l'actine, dépendante des voies Rho/WASP, (Wiskott-Aldrich syndrome protein) et à l'origine des mouvements du cytosquelette des cellules de l'immunité innée indispensables aux mécanismes d'adhésion, de migration et de dégranulation.

D'après Lowell, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2010.

Régulation de la réponse immunitaire

Par exemple, dans l'immunité innée, la signalisation en aval des TLRs est conditionnée par les cascades de phosphorylations sur tyrosines. Trois familles principales de kinases sont impliquées, la famille des Src kinases, celle de Syk (Spleen tyrosine Kinase)-Zap70 (70 kDa Zeta-chain Associated Protein) et celle des Tec (Tyrosine kinase Expressed in hepatocellular Carcinoma).

La famille des Src kinases est composée de huit membres contre cinq pour les Tec et deux, pour les Syk-Zap70. Les cellules de l'immunité innée n'expriment que quatre des Src kinases (Hck, Fgr, Lyn et Src), Syk et trois des Tec (Btk, Bmx et Tec) (Figure 12). De manière générale, les kinases tendent à agir séquentiellement dans la signalisation avec les Src kinases qui agissent en amont et les Tec en aval de la voie (Lowell, 2010; Melcher et al., 2007). Ces kinases ont été décrites comme étant les premières molécules impliquées dans la signalisation, en aval des récepteurs de l'immunité innée. Des études utilisant des inhibiteurs spécifiques et des souris déficientes ont démontré leur rôle fondamental dans la défense de l'hôte et les conditions inflammatoires (Ingley, 2012; Lowell, 2010; Okutani et al., 2006). Dans certains cas, ces kinases jouent un rôle clair et direct dans la signalisation activatrice ou inhibitrice de l'immunité innée. Dans d'autres cas, leur rôle peut être plus indirect comme dans la modulation de la réponse aux cytokines (IL1, IL6, IL12 et TNF α), qui influence la signalisation des TLRs (Chu and Lowel, 2005; Lowell, 2010; Meng and Lowell, 1997). Ces kinases sont responsables des phosphorylations et des activations directes d'autres tyrosines kinases cytoplasmiques, en particulier celles de la famille des Tec, FAK/Pyk2 (Focal adhesion kinase 1/ Protein-tyrosine kinase 2-beta) et moins directement les Syk-Zap70. Les mécanismes d'activation des Src kinases en aval des TLRs restent encore méconnus. En effet, l'activation de TLR9 induit la phosphorylation de Hck et Lyn, ce qui favorise le recrutement et la phosphorylation d'autres kinases (Syk, Pyk2). Cette signalisation est nécessaire à la migration des cellules et à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Sanjuan, 2006). De la même manière, Lyn est recrutée en aval de l'activation de TLR4, ce qui active Lyn et Pyk2. Ce mécanisme joue un rôle essentiel dans l'internalisation de *P.aeruginosa* par les cellules épithéliales (Kannan et al., 2006, 2008). Les Src kinases peuvent aussi agir en aval des TLRs par les petites protéines G. En effet, l'activation de NF- κ B en aval de TLR4 et TLR9 implique la phosphorylation de la Rho GTPase Vav1 (Figure 12) (English et al., 1997; Stovall et al., 2004).

Les voies de signalisation dans lesquelles les Syk kinases sont impliquées, sont beaucoup plus restreintes que celles des Src kinases. Elles sont activées par l'engagement de

leurs SH2 par les domaines ITAMs. Syk est la seule kinase impliquée dans la voie de signalisation dépendante des Src kinases. Néanmoins, les blocages des Src kinases ou de Syk n'ont pas le même phénotype car Syk est aussi impliquée dans des voies indépendantes des Src kinases (Lowell, 2010). Cette protéine est un médiateur reconnu de la voie de signalisation en aval du BCR. Comme pour les Src kinases, son rôle exact en aval des TLRs n'est pas totalement élucidé. Cependant, il est clair qu'elle est activée après la stimulation de TLR4 et de TLR9 et qu'elle participe à l'activation de NF- κ B. Son implication dans la voie de signalisation de NF- κ B passe par la régulation de la voie de la PI3-K (Figure 12) (Arndt et al., 2004; Lee et al., 2009; Sanjuan, 2006). Le blocage de Syk et l'utilisation de souris déficientes pour cette kinase ont montré qu'elle est impliquée dans la régulation de la production d'IL10, IL12 et TNF α (Chaudhary et al., 2007).

Trois des membres de la famille des Tec kinases sont exprimés dans les macrophages, Btk, Tec et Bmx. Des analyses fonctionnelles des macrophages associées à des études biochimiques ont montré l'implication de ces kinases dans l'inflammation. Des études d'inhibition de ces kinases, associées à celles menées sur des souris déficientes, ont montré que cette famille est impliquée dans la signalisation en aval de TLRs. En effet, Btk possède un domaine PH qui l'adresse à la membrane. De plus, elle interagit avec la région TIR de TLR2, TLR4, TLR6, TLR8 et TLR9 de la même manière que MyD88 et Mal. Btk peut alors s'associer à IRAK1 et initier la voie de la PI3-K. En aval de l'engagement de TLR2 ou de TLR4 par son agoniste, Btk est essentielle à l'activation de NF- κ B et donc à la production de cytokines pro-inflammatoires (Doyle et al., 2007; Horwood et al., 2003; Jefferies and O'Neill, 2004; Liljeroos et al., 2007; Melcher et al., 2007; Tan et al., 2013).

2.2.2.2. Les tyrosines phosphatases

L'état de phosphorylation d'une protéine est régulé par l'action antagoniste des protéines tyrosines kinases (PTKs) et des protéines tyrosines phosphatases (PTPs). Cette action permet d'empêcher une activation continue des partenaires de la signalisation et donc d'éviter l'emballlement de la réponse immunitaire. Les PTPs se situent généralement dans l'environnement membranaire. Certaines sont transmembranaires et d'autres sont cytoplasmiques, vésiculaires ou nucléaires mais toutes régulent la signalisation (Hendriks et al., 2013; Tiganis and Bennett, 2007). Toutes les PTPs possèdent un site catalytique spécifique de motifs consensus ainsi que des sites régulant leur localisation ou leur activité, à leurs extrémités N et C-terminales. Comme les PTKs, les PTPs possèdent des domaines SH2,

SH3 et GPI, en plus des domaines de fixation à l'ADN. Leurs sites d'action sont donc les mêmes que ceux des PTKs. L'action des PTKs et des PTPs est agoniste autant qu'antagoniste. En effet, les Src kinases phosphorylent les motifs ITIMs ou ITAMs, ce qui initie le recrutement des PTPs qui peuvent alors potentialiser ou inhiber la signalisation (Daëron et al., 2008; Mustelin et al., 2005).

Dans les voies de signalisation des TLRs, de nombreux signaux inhibiteurs sont médiés de cette manière. Les domaines ITIMs phosphorylés peuvent servir de point d'ancrage pour des phosphatases comme SHP1 ou SHIP1, qui modulent alors la signalisation en déphosphorylant leurs substrats (Lowell, 2010). SHIP1 est une inositol 5-phosphatase qui régule le niveau de PIP3 membranaire, produit par la PI3-K, en le reconvertissant en PIP2. De cette manière, en aval de TLR2, cette phosphatase inhibe la transactivation de NF- κ B ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires dépendantes de la voie de la PI3-K (Figure 13) (Strassheim et al., 2004). La PTP SHP1 joue un rôle inhibiteur sur l'activité de NF- κ B et des MAPKs. Elle bloque ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires en aval de TLR4. Cependant, elle se lie aussi à IRAK1 et l'inhibe, ce qui favorise la production d'IFNs de type I *via* RIG1 ou la voie de MyD88 (An et al., 2008). SHP1 semble également exercer un rôle de régulateur négatif en aval de TLR2. Cependant, dans cette voie de signalisation elle est recrutée sur le domaine ITIM de CEACAM1, ce qui lui permet de déphosphoryler la sous-unité p85 de la PI3-K et donc d'inhiber sa voie (Figure 13) (Cuevas et al., 2001; D'Ambrosio et al., 1995; Nagaishi et al., 2006; Scharenberg and Kinet, 1996; Slevogt et al., 2008).

SHP1 possède deux domaines SH2 qui lui confère la capacité à se fixer aux motifs possédant des résidus tyrosines phosphorylés (Ivashkiv, 2009; Wang et al., 2010b). En plus de ces deux domaines, cette phosphatase est constituée d'un domaine catalytique et d'une queue C-terminale. Les modifications post-traductionnelles (phosphorylation sur sérines ou sur tyrosines) de cette queue régulent l'activité de la phosphatase (Ma et al., 2011; Poole and Jones, 2005) (Figure 14). Dans les cellules hématopoïétiques, les SHPs sont exprimées dans le cytosol et parfois dans le noyau (Craggs and Kellie, 2001; Yang et al., 2002b). SHP1 peut être recrutée à la membrane par sa région C-terminale, qui est composée de six acides aminés « SKHKED ». Elle semble permettre son interaction avec les phospholipides et des protéines de ces microdomaines membranaires comme CD3 et CD5 (Fawcett and Lorenz, 2005; Kosugi et al., 2001; Sankarshanan et al., 2007).

Régulation de la réponse immunitaire

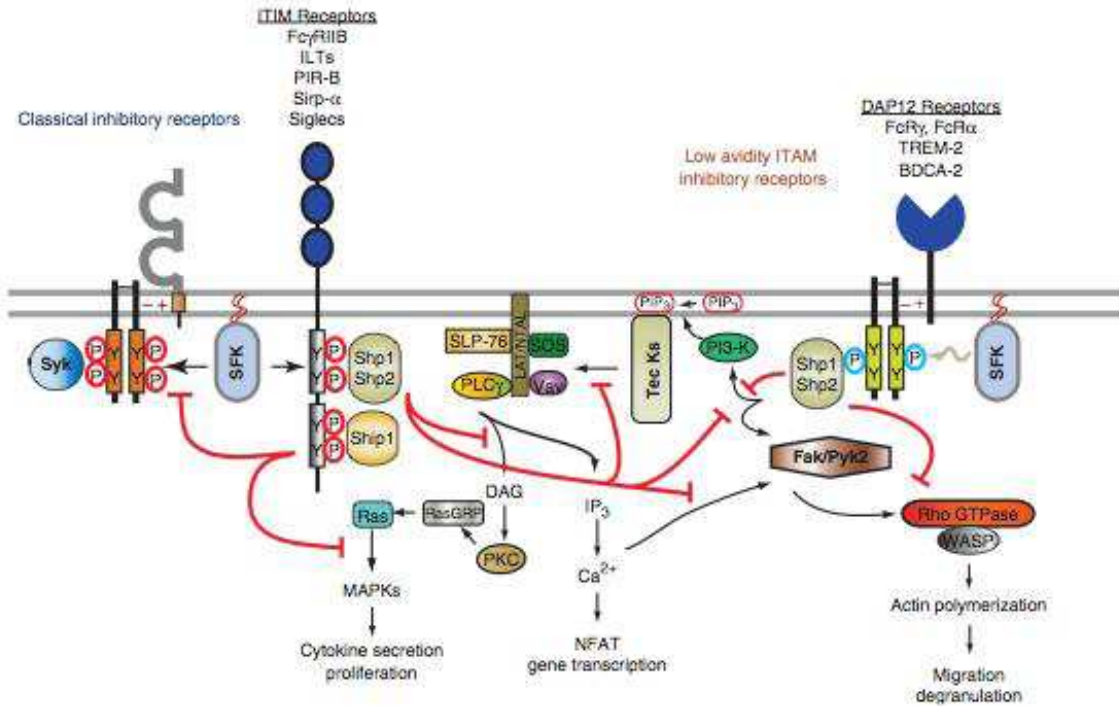


Figure 13. Représentation schématique des voies inhibitrices, dans les cellules de l'immunité innée, utilisant les ITIMs ou les ITAMs inhibiteurs. A gauche, sont situés les récepteurs inhibiteurs classiques qui portent des domaines ITIMs sur leur queue cytoplasmique. Comme les récepteurs activateurs, ils peuvent interagir avec des protéines de la superfamille des immunoglobulines ou des CLR. Les récepteurs inhibiteurs sont souvent engagés en même temps que les récepteurs activateurs, bien qu'ils reconnaissent des classes distinctes de ligands. Les domaines ITIMs de ces récepteurs sont souvent phosphorylés par des Src kinases. Cela aboutit au recrutement de PTPs ou de lipide phosphatases (comme SHP1/2 ou SHIP), qui régulent négativement la signalisation en déphosphorylant leurs cibles. SHIP, convertit directement le PIP3 en PIP2 alors que SHP1 déphosphoryle les résidus tyrosines de motifs consensus comme les ITAMs. Les récepteurs inhibiteurs et activateurs agissent de manière concomitante. A droite, sont représentés les récepteurs portant des domaines ITAMs inhibiteurs. Leurs voies en aval sont connues pour être engagées par des liaisons de faible affinité entre les récepteurs et leurs agonistes. Elles impliquent la phosphorylation partielle des domaines ITAMs (« ~P ») des protéines adaptatrices comme FcR γ et DAP12. Cette phosphorylation incomplète induit le recrutement de SHP1/2 à la place de Syk, ce qui engage une réponse analogue à celle observée dans la voie ITIM classique. Dans cette nouvelle voie, lorsque la liaison entre le récepteur et son agoniste est très affine, la voie de signalisation engagée en aval est activatrice.

D'après Lowell, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2010.

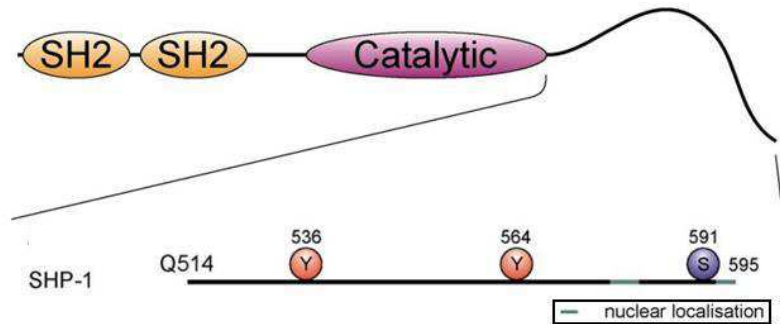


Figure 14. Représentation schématique de la région C-terminale de SHP1. SHP1 est composé de deux domaines Src-Homology-2 (SH2) et d'une région catalytique (PTP). La région C-terminale porte deux sites d'adressage nucléaire ainsi que deux résidus tyrosines et un résidu sérine phosphorylables.
D'après Poole et al., *Cell Signaling*, 2005.

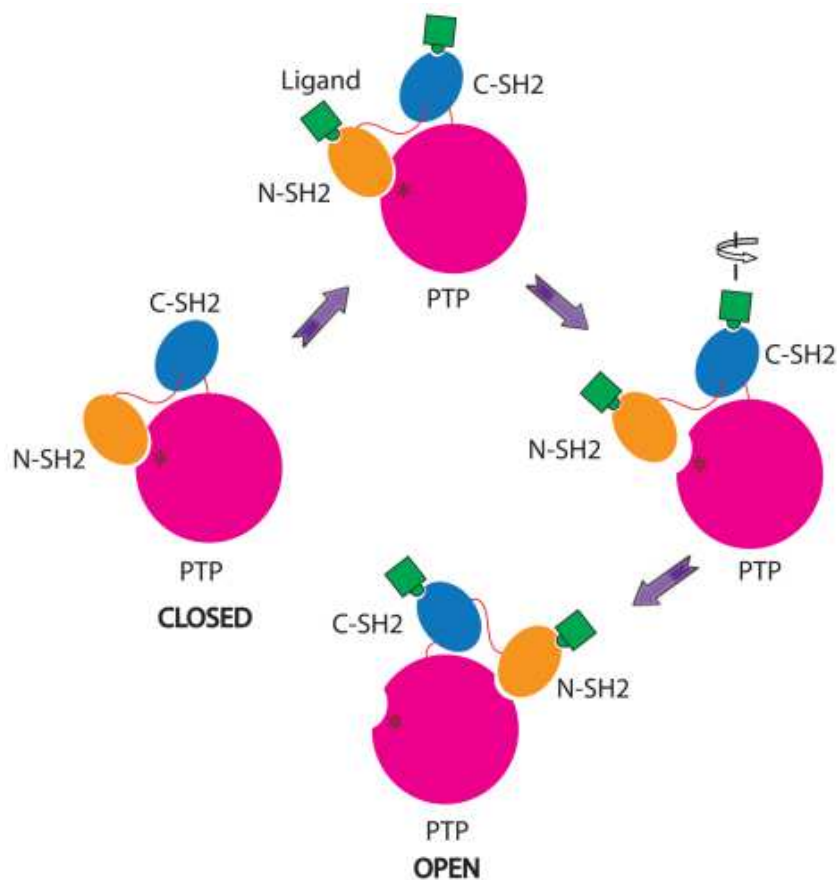


Figure 15. Représentation schématique de l'auto-régulation de SHP1. Le SH2 en N-terminal est en orange, le SH2 C-terminal est en rouge et le domaine PTP est en magenta. Les astérisques représentent les résidus du site actif. Le ligand est en vert. Le SH2 N-terminal bloque le site actif du domaine PTP dans une conformation refermée. La fixation du ligand aux domaines SH2 induit un changement de conformation, résultant en la libération du domaine PTP. La rotation du SH2 C-terminal repositionne son homologue N-terminal et expose le site actif du domaine PTP.
D'après Wang et al., *J Cell Biochem*, 2011.

Les modèles murins présentant des mutations de *ptpn6* sont plus susceptibles aux pathologies inflammatoires, à l'auto-immunité et aux affections pulmonaires (Crocker et al.,

2008). Comme toutes les PTPs, SHP1 est impliquée dans le maintien ou le retour de cellules hématopoïétiques à l'état de repos. Pour éviter des déficits immunitaires, l'activité de SHP1 doit être régulée. Parmi les méthodes de régulation de SHP1, l'une d'entre elles implique une autorégulation basée sur la conformation des deux SH2 (Barford and Neel, 1998). Ces domaines forment des liaisons de charges avec le site catalytique, empêchant ainsi l'accès au substrat. Dans cette conformation, le site de liaison des domaines SH2 est rendu plus accessible. La fixation de ces domaines sur une protéine cible entraîne un changement de conformation qui libère le site catalytique (Wang et al., 2011; Yang et al., 2002a) (Figure 15).

D'autres mécanismes de régulation peuvent être impliqués dans la modulation de l'activité phosphatase de SHP1: les phosphorylations de la partie C-terminale. Cette région porte deux sites d'adressage nucléaire ainsi que deux résidus tyrosines et un résidu sérine phosphorylables (Figure 14). La phosphorylation de la tyrosine 536, outre sa fonction d'interaction avec la protéine adaptatrice Grb2, est un signe d'activation précédent à l'interaction de SHP1 avec les protéines G (Bouchard et al., 1994; Lorenz et al., 1994; Ma et al., 2011; Yang et al., 1998). Les deux tyrosines participent à la potentialisation de l'activité (Zhang et al., 2002). En ce qui concerne la phosphorylation sur la sérine 591, elle est due à l'action de PKC et plus spécifiquement de ses isoformes α et δ . Suite à l'activation cellulaire, PKC phosphoryle SHP1 sur sa sérine 591 ce qui diminue significativement et transitoirement l'activité phosphatase de cette dernière (Brumell et al., 1997; Jones et al., 2004; Lorenz et al., 1994; Poole and Jones, 2005) (Figure 16).

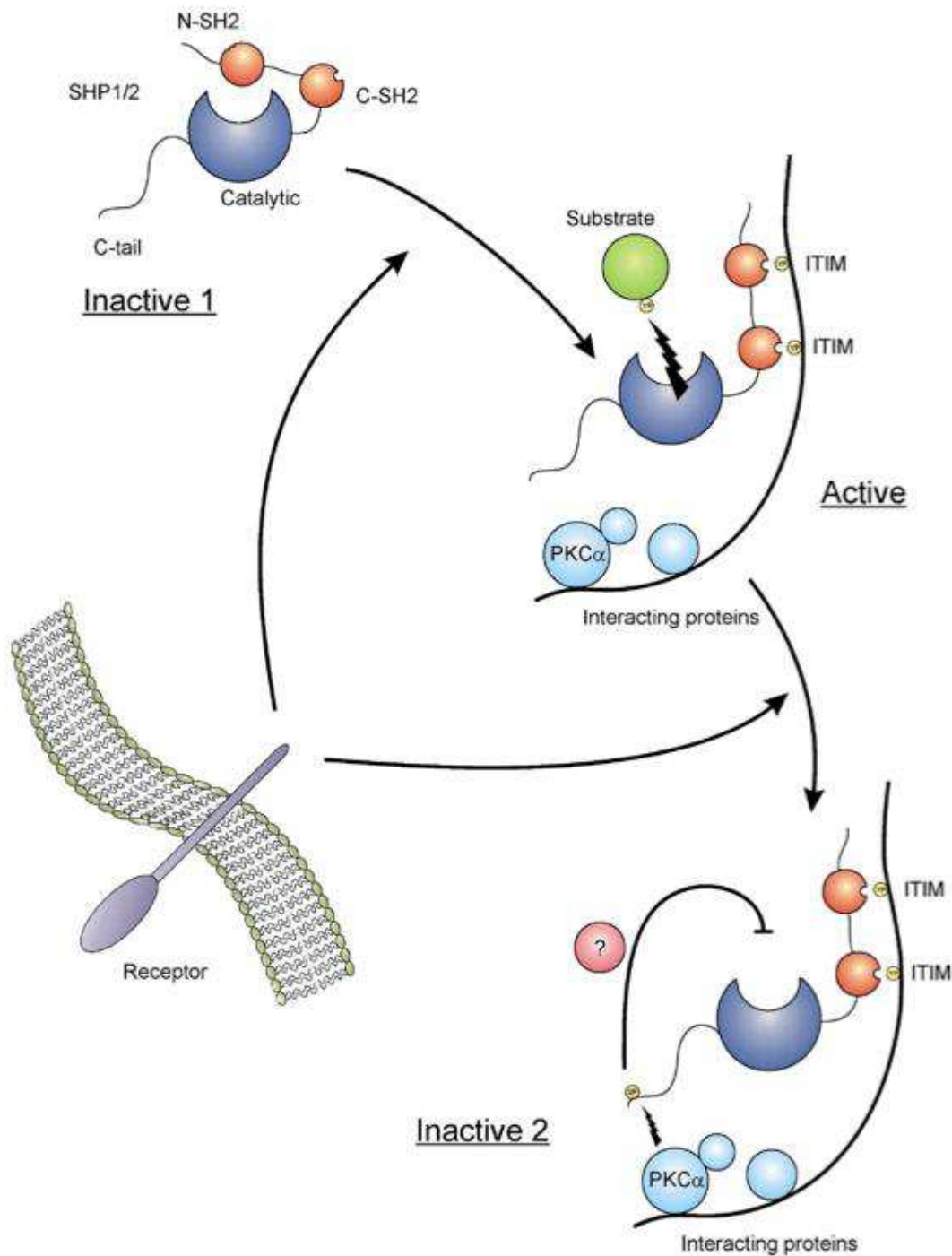


Figure 16. Représentation de la modulation de l'activité de SHP1 par ses N et C-terminaux. L'activation cellulaire, par de nombreux récepteurs, peut induire l'activation ou l'inhibition de la fonction phosphatase de SHP1. Bien que le mécanisme varie entre les types cellulaires, SHP1, à son état basal, est dans une conformation refermée inactive. Suite à l'interaction des domaines SH2 avec un motif phosphorylé sur tyrosine, comme les ITIMs ou ITAMs, la phosphatase s'active. On peut noter une nuance. Dans certains modèles, à l'état basal, SHP1 est en complexe avec des motifs phosphorylés en tyrosine et elle est donc activée. Dans ce cas de figure, l'activation du récepteur induit l'inhibition de la phosphatase. Bien que peu détaillé, le mécanisme d'inhibition de SHP1 repose sur la phosphorylation de sa sérine 591 par une protéine kinase.

D'après Poole et al., Cell Signalling, 2005.

2.2.2.3. Le rôle des protéines à motifs ITAM/ITIMs

De nombreux adaptateurs possèdent des domaines ITIMs ou ITAMs qui recrutent des PTKs ou des PTPs, ce qui module la signalisation en aval des TLRs (Lowell, 2010). Parmi eux, DAP12 et FcR γ ont été identifiés comme participant à la régulation de l'immunité innée (Hamerman et al., 2009; Ivashkiv, 2009). Ils s'associent à des récepteurs comme les FcRs, les β intégrines et les TREMs. Ils dirigent la signalisation de l'inflammation sur une molécule clé, CARD9. Elle forme un complexe, avec Bcl10 et Malt1 (Mucosa Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Translocation protein 1), qui contrôle la production de cytokines en aval des voies d'activation des MAPKs et de NF- κ B (Lowell, 2010).

Les motifs ITAMs de DAP12, reconnus par Syk, sont essentiels à la fonction inhibitrice de l'adaptateur. En effet, des études menées *in vivo*, montrent que la production de cytokines pro-inflammatoires, suite à l'engagement des TLRs, est plus importante chez les souris déficientes pour DAP12 ou FcR γ que chez les sauvages (Chu et al., 2008; Hamerman et al., 2005).

2.2.3. L'ubiquitination

L'ubiquitination est un mécanisme de modification post-traductionnelle. Comme les cascades de phosphorylation, elle joue un rôle dans la signalisation en aval des PRRs. L'ubiquitine se lie aux résidus lysines des protéines selon trois étapes impliquant trois enzymes E1, E2 et E3. Le site de l'ubiquitination est primordial dans le débouché de la modification : activatrice (lysine 63) ou inhibitrice (lysine 48). Ce marquage conduit à la dégradation de la molécule par le protéasome. Ce mécanisme de dégradation est essentiel à la régulation de l'inflammation. En effet, la quantité de TLRs est maintenue et renouvelée grâce à ce mécanisme. La voie de signalisation TRAF6 est activée par l'auto-ubiquitination de la E3 ligase. IRAK1 est ubiquitinylée par les Pellinos. IRAK1 interagit alors avec IRAK4 et phosphoryle les Pellinos, qui peuvent alors ubiquitiner TRAF6. A20, inhibe l'activité des E3 ligases comme TRAF6, ce qui bloque la voie d'activation de l'inflammation (Carpenter and O'Neill, 2009).

2.3. La régulation génétique

2.3.1. NF- κ B : chef d'orchestre de l'inflammation

Tous les membres de la famille des protéines NF- κ B, RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 (précurseur de p105), p52 (précurseur de p100) et Relish ont conservé leurs domaines de fixation à l'ADN et de dimérisation, appelés RHR (Rel homology region). Ils leur confèrent la possibilité de s'homo- ou s'hétérodimériser. RelB et c-Rel contiennent un domaine de transactivation C-terminal (TAD), qui leur permet d'activer l'expression des gènes cibles. p50, p52 et Relish portent un long domaine ankyrine (ARD) sur leur C-terminal, à la place du TAD. Ce domaine ne peut pas activer l'expression du gène cible lorsqu'il est sous forme d'homodimère (Napetschnig and Wu, 2013). Une des sous-unités les plus étudiées est p65. Elle est couramment associée à p50 (Dyson and Komives, 2012). En plus de sa structure primaire ses modifications post-traductionnelles jouent un rôle essentiel dans la régulation de sa fonction. L'autre sous-unité emblématique de NF- κ B est la sous-unité p50. Lorsqu'elle est associée à la sous-unité p105, le complexe est inactif. *A contrario*, la formation d'un complexe entre p50 et une sous-unité Rel a une activité transcriptionnelle, grâce au domaine TAD de cette dernière. Étonnement, un homodimère de p50, dépourvu de TAD, peut avoir une fonction activatrice ou répressive sur l'expression des gènes. Cette activité est due au recrutement de co-activateurs transcriptionnels, comme Bcl3 ou HDAC1 (Cristofanon et al., 2008).

La famille du facteur de transcription Eucaryote NF- κ B régule l'expression d'une large variété de gènes, eux-mêmes impliqués dans de nombreux processus comme l'inflammation, la croissance cellulaire et la différenciation. Ce facteur de transcription est activé en réponse à divers *stimuli* comme les cytokines, les pathogènes, les dommages cellulaires ainsi que les conditions de stress. L'activation des protéines de la famille de NF- κ B est finement régulée car une activation inappropriée peut être à l'origine de phénomènes d'auto-immunité, d'inflammation chronique et de divers cancers (Courtine, 2010). Dans les cellules non-stimulées, NF- κ B est lié à une protéine inhibitrice, I κ B. La liaison de ces deux partenaires, masque le NLS (Nuclear Localization Signal) du facteur de transcription NF- κ B et séquestre le facteur de transcription dans le cytoplasme. Il ne peut alors ni se transloquer, ni se fixer à l'ADN (Napetschnig and Wu, 2013). L'activation de la signalisation de NF- κ B est initiée par un *stimulus* extracellulaire reconnu par des récepteurs. Ces derniers initient une cascade de

signalisation qui aboutit à l'activation d'IKK. Celui-ci phosphoryle alors le I κ B associé à NF- κ B. I κ B libère le facteur de transcription et est dirigé vers le protéasome pour y être dégradé. Le dimère, ainsi libéré, est transporté dans le noyau où il se fixe à ses séquences cibles et active la transcription des gènes (Napetschnig and Wu, 2013). Le facteur de transcription se fixe sur les régions promotrices κ B de l'ADN, où il recrute des co-répresseurs ou des co-activateurs dans un seul complexe, l'enhanceosome. Il permet une régulation spécifique des gènes de l'immunité (Leung et al., 2004). Après des études sur des modèles murins déficients pour chacun des gènes de la famille des facteurs de transcription NF- κ B, les phénotypes obtenus ont suggéré que chaque membre de la famille Rel a une fonction biologique propre (Gerondakis et al., 2006). L'hétérodimère le plus décrit et le plus représenté dans les cellules de l'immunité innée est p65 (RelA)/p50.

2.3.1.1. La sous-unité Rel A

En ce qui concerne la sous-unité p65, elle est impliquée dans la régulation critique de l'apoptose médiée par TNF α au cours de l'embryogénèse. En effet, l'inhibition de la voie de signalisation de TNF α permet de mener le développement embryonnaire à terme alors qu'il était stoppé précocement chez les souris *p65*^{-/-}. Cependant, on constate une surmortalité post-natale ayant essentiellement des causes infectieuses (Alcamo et al., 2001; Beg et al., 1995; Doi et al., 1999). La sous-unité RelA a ainsi un effet protecteur, pour les macrophages et les lymphocytes (T et B) vis-à-vis de l'apoptose médiée par le TNF α (Breg and Baltimore, 1996; Prendes et al., 2003). Elle est aussi impliquée dans la mort cellulaire en réponse à la reconnaissance de l'ADN double brin par TLR3 (Ringelhan et al., 2012). Cette sous-unité est aussi indispensable à la génération des organes lymphoïdes secondaires dont sont dépourvues les souris *rela*^{-/-} et *tnfr*^{-/-} (Alcamo et al., 2001). Par ailleurs, p65 peut exercer un rôle pro-apoptotique en potentialisant l'expression du gène *FAS* (Liu et al., 2012). L'importance de cette sous-unité, dans la réponse anti-infectieuse, a été montrée dans des études cliniques. En effet, dans la phase initiale pro-inflammatoire du sepsis, le dimère p65/p50 est responsable de la transcription des gènes pro-inflammatoires dans les PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cell), ce qui est associé à un mauvais pronostic pour ces patients (Arnalich et al., 1999; Ghosh et al., 1998; Yoza et al., 2006).

La sous-unité RelA subit des modifications post-traductionnelles du type phosphorylation ou acétylation. La sous-unité p65 possède au moins huit sites de

phosphorylation. Parmi eux, la sérine 276 et la sérine 536 sont des marqueurs fonctionnels de l'activité canonique de NF- κ B. La sérine 276 est essentielle au déplacement du répresseur transcriptionnel, HDAC1 (histone deacetylases 1), et au recrutement du co-activateur transcriptionnel, CBP/p300 (CREB (c-AMP Response Element-Binding protein) Binding Protein) (Haybaeck et al., 2009; Vermeulen et al., 2003; Zhong et al., 1998). La réponse à une stimulation par du LPS et du TNF α induit la phosphorylation sur cette sérine. La sérine 536 est localisée dans le domaine de transactivation de p65. Sa phosphorylation résulte de l'activité de IKK1, IKK2, IKKi (IKKe) et RSK (p90 ribosomal S6 Kinase). L'activité de p65 varie alors selon la kinase impliquée dans la phosphorylation de ce résidu sérine (Adli, 2006; Perkins, 2004; Sakurai, 1999). En effet, la sérine 536 est essentielle à de multiples fonctions de p65 (translocation nucléaire, durée de l'activité transcriptionnelle, taux de dégradation) (Lawrence et al., 2005; Mattioli et al., 2004; Sasaki, 2005). Par ailleurs, l'acétylation des lysines participe à la liaison à l'ADN et à l'optimisation de la transcription (Chen and Greene, 2004; Jamaluddin et al., 2007; Zhong et al., 1998). Un autre mécanisme de régulation de la transcription est fondé sur la dégradation de la sous-unité p65, par le système ubiquitine-protéasome (Tanaka et al., 2007). Les dimères de NF- κ B sont recrutés différenciellement en fonction de l'adéquation des gènes cibles avec la cinétique de l'inflammation (Adib-Conquy et al., 2003; Sacconi et al., 2000).

2.3.1.2. La sous-unité p50

Son hétérodimère, p50, a un rôle critique dans la prolifération lymphocytaire, la production d'anticorps, l'activité immunosuppressive de l'IL10 et la réponse immunitaire innée. En effet, les modèles murins déficients pour p50 sont plus susceptibles aux infections à *L. monocytogenes*, *S. pneumoniae* ou *E. coli* et elles produisent moins de IL4, IL5, IL10 et IL13 (Cao et al., 2006; Carmody et al., 2007; Das et al., 2001).

L'activité transcriptionnelle des dimères de NF- κ B, notamment du p50/p50 est modulée par l'interaction de membres de la famille I κ B. Ce dimère peut interagir avec Bcl3, qui inhibe l'expression génique en stabilisant la liaison de ce NF- κ B inactif avec l'ADN (Carmody et al., 2007). Sa liaison avec CBP lui permet de transcrire des gènes codant pour le mécanisme anti-inflammatoire comme IL10 (Cao et al., 2006). L'interaction avec I κ B ζ lève l'inhibition de l'expression des gènes pro-inflammatoires, exercée par l'homodimère. Cependant, cette molécule potentialise leur répression lorsqu'elle se fixe à l'hétérodimère

p50/p65 (Motoyama et al., 2004). La synthèse d'I κ BNS (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, delta) est induite par l'IL10. Elle favorise la liaison p50/p50 aux sites promoteurs κ B et inhibe la synthèse de l'IL6 (Hirotsu et al., 2005).

2.3.2. Les modifications épigénétiques

La régulation de l'expression des gènes de l'immunité innée, comme le reste du génome, implique des modifications épigénétiques. Elles sont chimiques, héréditaires et réversibles. Sans introduire de mutation dans la séquence d'ADN, elles induisent une variation de l'expression d'un ou plusieurs gènes (modification du phénotype sans modification du génotype) aboutissant par exemple, à des modifications de la régulation de l'inflammation ou à une susceptibilité au sepsis (Medzhitov and Horng, 2009; Wen et al., 2007; Xu et al., 2009). Elles ont pour origine celles des histones et la méthylation de l'ADN (Musselman et al., 2012). La méthylation de l'ADN joue un rôle clé dans la régulation de l'expression génique chez les Eucaryotes. Bien qu'héréditaires, les profils de méthylation de l'ADN génomique et de l'ADN mitochondrial peuvent être modifiés par la différenciation cellulaire, les maladies et l'influence de l'environnement. Les modifications des histones (phosphorylations, méthylations, ubiquitinations, sumoylations et ribosylations) sont localisées sur leur région N-terminale. Elles sont responsables de la régulation de la condensation de l'hétérochromatine, et donc, de la répression génique (Rando, 2012).

Celles de la chromatine permettent également de réguler négativement la réponse inflammatoire. Le meilleur exemple de la dualité de ce phénomène se retrouve dans le mécanisme de tolérance au LPS des macrophages (Ciarlo et al., 2013; Foster et al., 2007).

2.3.3. Les micros ARNs

Les micros ARNs (miARNs) sont de petits ARNs non-codants qui inhibent l'expression post-traductionnelle des gènes. Au cours des dernières années, certaines études ont montré leur implication dans la régulation des phénotypes des monocytes/macrophages (Graff et al., 2012). Ils agissent en inactivant les molécules de signalisation ou la stabilité des cytokines en aval de l'engagement des PRRs. Plusieurs miARNs ont été mis en évidence dans la régulation des voies de signalisation en aval de TLR2, TLR4 et TLR5. En effet des miARNs comme le miR146, le mi155 et le mi125a inhibent respectivement IRAK1/TRAF6, IKK α /IKK β et le TNF α (Baltimore et al., 2008). D'autre part, les miR29b et miR125b

inhibent l'expression d'un régulateur négatif de la voie NF- κ B, TNFAIP3 (Tumor Necrosis Factor, Alpha-Induced Protein 3) (Graff et al., 2012).

3. Variabilité de la réponse anti-infectieuse

L'invasion de l'organisme par un agent infectieux peut aboutir à des tableaux cliniques de sévérité variable. De nombreux facteurs, dépendant du pathogène et de l'hôte, conditionnent la sévérité des phénotypes cliniques et biologiques observés. Une réponse pro-inflammatoire exacerbée peut aboutir à des lésions tissulaires et aux défaillances d'organes observées dans le choc septique (Annane et al., 2005; Hotchkiss and Karl, 2003). A l'extrême, l'amplification de la réponse anti-inflammatoire risque d'entraîner une immunodépression secondaire et l'apparition d'infections nosocomiales (Angus et al., 2001; Annane et al., 2005; Boldrick et al., 2002; Grimaldi et al., 2011; Hotchkiss et al., 2013; Pene et al., 2012; Vianna et al., 2004). Depuis le séquençage du génome humain, de nouveaux outils regroupés sous le nom de « omique », se sont développés et permettent aux chercheurs d'appréhender les mécanismes qui sous-tendent la variabilité de la réponse de l'hôte au pathogène (Narjoz et al., 2010). L'objectif est de mieux comprendre les tableaux cliniques, d'identifier les patients à risque d'infection sévère ou d'évolution défavorable, et à terme de personnaliser les traitements (Figure 17).

Plusieurs facteurs susceptibles d'influencer le pronostic du patient ont été identifiés:

- les facteurs liés au pathogène et à l'efficacité potentielle des traitements anti-infectieux (virulence du pathogène, antibiothérapie adaptée, résistance au traitement, site de l'infection et charge bactérienne ou virale) (Casadevall and Pirofski, 2003; Hornef et al., 2002).
- les facteurs liés à l'hôte et à son environnement : âge, immunodépression, insuffisance cardiaque, cirrhose, cancer (Angus et al., 2001; Annane et al., 2005; Sutherland and Walley, 2009; Vianna et al., 2004)
- dysrégulation des réponses immunitaires innée et adaptative
- des facteurs génétiques (Dahmer et al., 2005; Holmes et al., 2003; Kellum et al., 2007, 2007; De Maio et al., 2005).

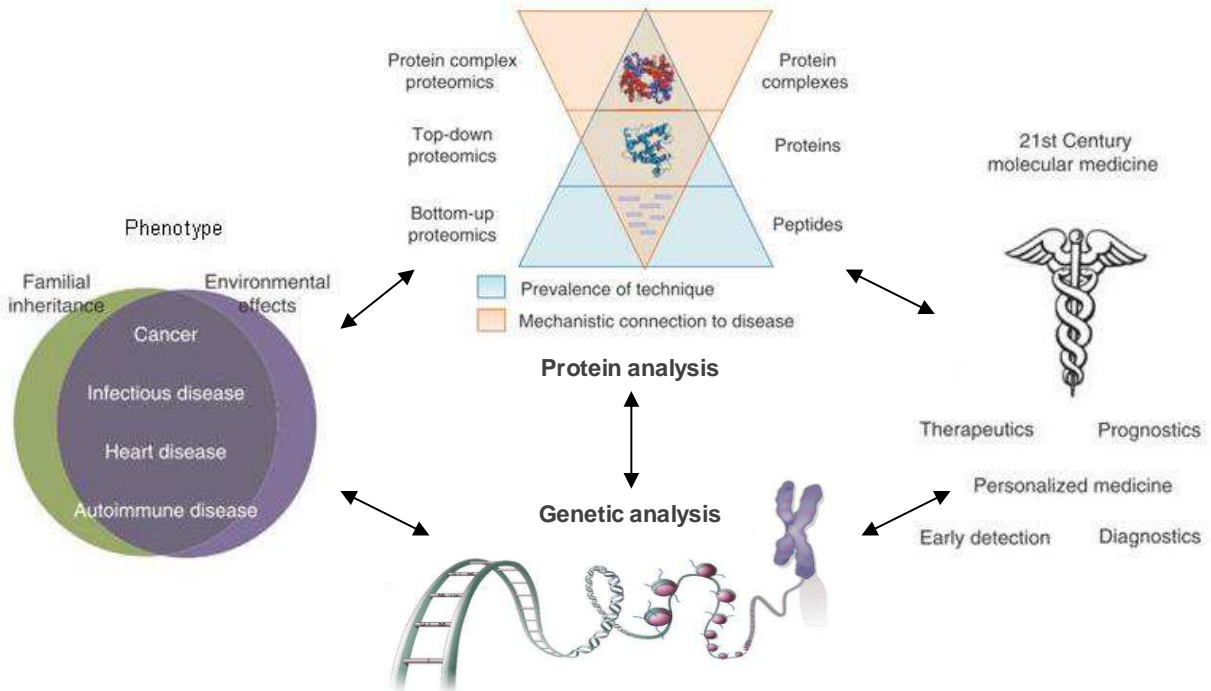


Figure 17. Approches de diagnostic et pronostic des pathologies. Les pathologies sont le produit de modifications post traductionnelles des protéines, de variations dans leur stabilité ou de changements dans leur compartimentation. Elles peuvent avoir des causes génétiques héritées ou induites. La compréhension de l'origine de ces phénotypes physiopathologiques devrait permettre, à terme, d'améliorer les soins et de les personnaliser.

D'après Savaryn et al., Genome Medicine, 2013 & U.S. National Library of Medicine.

En effet, le rôle des facteurs génétiques influençant la susceptibilité et la gravité du sepsis a été exploré au cours de ces dernières années (Dahmer et al., 2005; Holmes et al., 2003; Kellum et al., 2007, 2007; De Maio et al., 2005). De nombreux polymorphismes génétiques affectant la reconnaissance du pathogène ou l'organisation de la réponse inflammatoire ont été associés avec une augmentation de la susceptibilité ou de la sévérité du sepsis (Brenmoehl et al., 2007; Henckaerts et al., 2009; Lorenz et al., 2004).

3.1. Variabilité de la réponse immune liée au pathogène

La reconnaissance des bactéries est un phénomène complexe qui nécessite la participation coordonnée de plusieurs TLRs (Fan and Cook, 2004; Foster et al., 2007). Ainsi, la reconnaissance de *S. pneumoniae* implique TLR2, TLR4 et TLR9 (Van der Poll and Opal, 2009). Celle de *P. aeruginosa* implique TLR2, TLR4 et TLR5 (Ramphal et al., 2008). L'engagement de TLRs distincts est conditionné par les différents PAMPs présentés par le pathogène, mais également par l'importance de l'inoculum ou le temps passé depuis l'infection. De récents travaux ont ainsi montré que dans un modèle murin de pneumonie à *K.*

pneumoniae, TLR4 et TLR2 jouent un rôle complémentaire dans la reconnaissance et la clairance bactérienne (Wieland et al., 2010). A faible inoculum, la réponse anti-bactérienne est surtout dépendante de TLR4 alors que TLR2 est indispensable dans les étapes tardives de l'infection lorsque l'inoculum augmente (Wieland et al., 2010).

3.2.La variabilité liée à l'hôte

Plusieurs pathologies sont dues à des polymorphismes déjà caractérisés par diverses études. Un polymorphisme génétique est une variation de séquence du génome dont la fréquence est supérieure à 1% dans la population générale (Burton et al., 2005). Les polymorphismes sont de deux types :

1. Les polymorphismes de répétition : Ils représentent des répétitions en tandem de minisatellites hypervariables (une séquence de 10 à 30 nucléotides répétée 3 à 30 fois) et de microsatellites (une séquence de 2 à 10 nucléotides répétée 10 à 60 fois). Ces marqueurs spécifiques des régions non codantes sont uniformément répartis dans tout le génome.
2. Les polymorphismes de séquence : Ils représentent des variations isolées dues à des substitutions, insertions ou délétions de un à plusieurs nucléotides. Les substitutions d'un nucléotide (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) peuvent être dans des régions codantes ou non codantes. Les SNPs fonctionnels font l'objet d'études car ils modifient la fonction ou la quantité de protéine. Ils sont composés de variations de nucléotides dans les régions codantes aboutissant à la substitution d'un acide aminé par un autre et modifiant structurellement ou fonctionnellement la protéine (Gutmacher and Collins, 2005). Les SNPs des régions non codantes peuvent également être fonctionnels s'ils sont dans des régions participant à la transcription ou d'épissage de l'ADN ainsi que dans celles modifiant la traduction ou la demi-vie de l'ARNm. Les SNPs peuvent avoir plusieurs *loci* dans un même chromosome, ils sont donc héréditaires et forment des haplotypes.

Il peut s'avérer nécessaire de détecter les marqueurs des pathologies avant les premiers symptômes ou précocement dès leurs apparitions (Boehm, 1989; El-Sagheer and Brown, 2012; Eshaque and Dixon, 2006; Gholami et al., 2013; Lühken, 2012; Nielsen and Egholm, 1999; Olivier, 2005; Romppanen, 2005; Shouten et al., 2002; Syvänen, 1999; Tsongalis et al., 2001; Vester and Wengel, 2004). En effet des études génétiques ont montré que la présence

d'un polymorphisme peut être associée à un phénotype, comme *IRAK1* avec une prolongation de la durée de la ventilation mécanique chez les patients septiques (Toubiana et al., 2010) ou le génotype *TLR2-1350T/C* qui a un effet protecteur sur les infections sévères du tractus urinaire (Cheng et al., 2013). Un certain nombre de pathologies comme les cancers ou les maladies génétiques sont encore associées à des mutations inconnues sur un ou plusieurs gènes (Hoshino et al., 2012; Ozcelik et al., 2012; Zhang et al., 2012).

Les avancées dans la compréhension du lien entre l'expression génique et le phénotype ont conduit à de nombreuses études épidémiologiques. D'une part, elles ont souligné l'importance des facteurs génétiques humains dans la susceptibilité aux infections graves. D'autre part, elles ont montré des différences ethniques dans la susceptibilité à un pathogène sévissant dans un même environnement, ce qui suggère que ce phénomène aurait des bases génétiques (Frodsham, 2004; Hill, 1998; Stead et al., 1990). Par ailleurs, une étude prospective sur 100 ans, menée aux Etats-Unis, a souligné une prédisposition génétique à la sévérité des infections à *H. influenzae* (Albright et al., 2008). De plus, des études sur des fratries jumélaires ont montré une augmentation de la susceptibilité d'un individu à une infection si son jumeau monozygote a déjà été atteint (Casselbrant ML et al., 1999; Chang et al., 1996; Christensen et al., 2010; Comstock, 1978). Enfin, des études épidémiologiques ont analysé l'importance des facteurs génétiques par rapport aux facteurs environnementaux (Peterson et al., 2008; Sørensen et al., 1988).

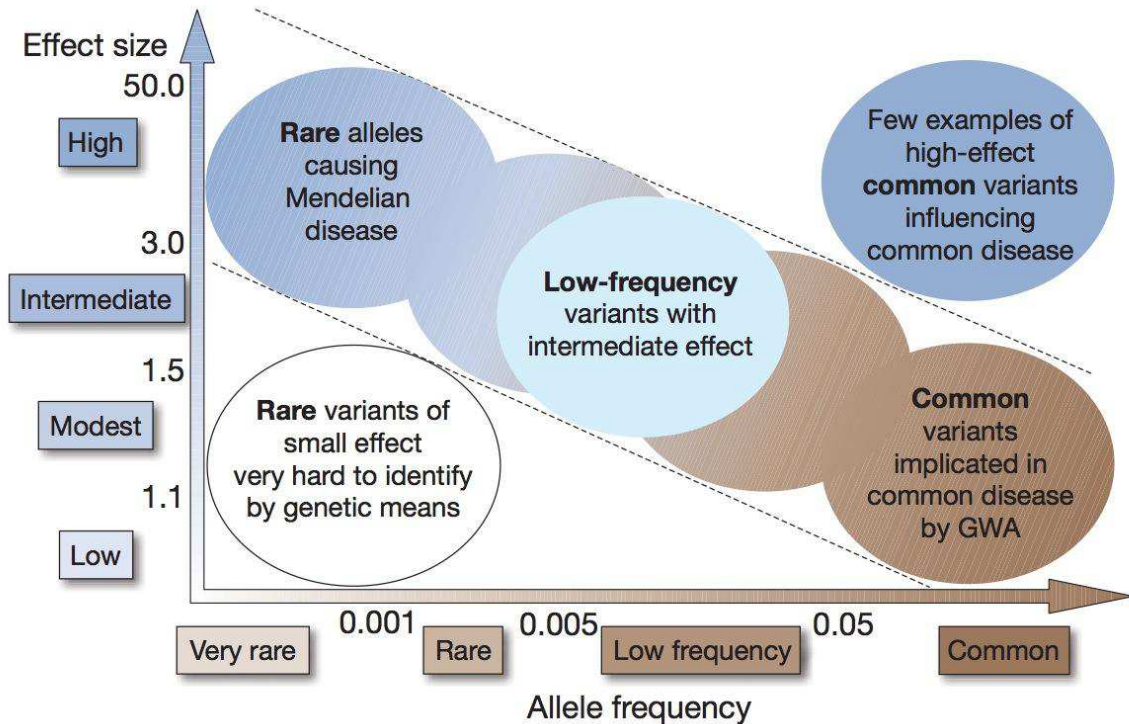


Figure 18. Effet des variants génétiques sur la susceptibilité aux infections. Dans le cas des maladies mendéliennes, des allèles rares sont à l'origine de phénomènes marqués. Sur ce principe, plus le variant est commun dans la population, moins il a d'effet. Cette approche est très courante dans les études GWA (Genome Wide Association). Il existe des pathologies en dehors de ces schémas : i) des allèles variants très rares dans la population et avec peu d'effet qui sont donc extrêmement difficiles à identifier ; ii) des allèles communs à l'origine de phénomènes facilement identifiables et influençant la réponse aux pathologies courantes. D'après Manolio et al., *Nature*, 2009.

Cette implication des facteurs génétiques dans la susceptibilité aux infections a aussi été mise en évidence par l'étude de déficits immunitaires monogéniques et héréditaires, dits classiques. Ils confèrent une susceptibilité, dès la petite enfance, à des germes peu virulents qui conduisent à des infections graves et récurrentes. Par ailleurs, il existe des déficits non classiques ne rendant le sujet sensible qu'à un seul type de germe (Bustamante et al., 2008). Ces prédispositions mendéliennes sont rares mais elles présentent un phénotype clairement identifiable (Figure 18) (Manolio et al., 2009). Les facteurs environnementaux peuvent augmenter le facteur de risque génétique dans des pathologies multifactorielles complexes et hétérogènes (Figure 18) (Manolio et al., 2009). Ces pathologies sont souvent le fruit de variants plus ou moins communs à l'origine de faibles phénomènes. Ces prédispositions génétiques non-mendéliennes sont des polymorphismes génétiques, qui représentent des facteurs de risque ou de gravité.

3.3. La variabilité à l'origine des phénotypes complexes

La survie des patients aux infections graves nécessite une réponse immunitaire appropriée (Xiao et al., 2011). Par une approche transcriptomique, les différences entre les patients ayant subi des complications et ceux sans complication ont été étudiées. Quel que soit le *stimulus* initial (polytraumatisme, brûlure, endotoxémie à faible dose), les variations observées entre les deux populations sont uniquement d'ordre quantitatif et concerne 80% des leucocytes. En effet, ces observations confirment l'hypothèse de « l'inflammation non-résolue » selon laquelle, les patients à phénotype complexe destinés à succomber à leurs pathologies engagent les mêmes processus génétiques que les patients qui se rétablissent. La différence réside dans le degré et la durée de la réponse inflammatoire aiguë (Nathan and Ding, 2010). En effet, la transition de l'inflammation aiguë à celle chronique est associée à une augmentation du risque de mortalité (Davidson et al., 2011). Ces variations extrêmes sont très finement régulées et reproductibles selon les agressions initiales. Contrairement au dogme admis (Xu et al., 2009; Zhang et al., 2010), les variations à l'origine des phénotypes complexes concernent les gènes impliqués dans les mécanismes pro- et anti-inflammatoires de l'immunité innée comme de l'immunité adaptative. Le niveau basal d'expression génique après les variations initiales est retrouvé entre 7 et 14 jours après l'agression primaire pour les patients sans complications. En revanche, il faut attendre près de 28 jours chez les patients à phénotype complexe. Chez ces derniers, dans les étapes précoces, la régulation positive des gènes de l'immunité innée est concomitante d'une régulation négative de ceux de l'immunité adaptative. Des anomalies portant à la fois sur l'immunité innée et adaptative expliquent donc les phénotypes complexes, notamment inflammatoires (Xiao et al., 2011).

Depuis la définition du syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS), la complexité des cas de sepsis a été étudiée d'un point de vue protéomique et génomique. Les connaissances ainsi développées ont permis de mieux appréhender i) le contrôle de l'infection par la régulation de l'immunité adaptative *via* l'immunité innée et par la modulation des molécules essentielles à l'interaction entre les monocytes/macrophages et les lymphocytes ainsi que ii) la complexité de la réponse immunitaire à une infection ou à des dommages tissulaires (Figure 19) (Salomao et al., 2012). Après des études génétiques, le mécanisme de régulation négative a été décrit comme étant le pilier dans l'issue du sepsis. Un modèle bi-phasique a été proposé : il est composé d'une phase inflammatoire suivie d'une phase anti-inflammatoire. Cette phase anti-inflammatoire, à l'origine du phénomène d'immunosuppression, semble aboutir à des dérégulations majeures retrouvées chez les patients

septiques. En effet, dans le cas des patients n'ayant pas résolu la primo-infection, la diminution des cytokines pro-inflammatoires et l'activation de l'immunité adaptative induisent une réponse inefficace face à la persistance du pathogène et peuvent être à l'origine d'une aggravation du pronostic. Ce phénomène est observé chez les patients succombant aux pathologies septiques (Hotchkiss and Karl, 2003; Hotchkiss et al., 2013). Les études génétiques comparant les patients septiques à ceux traumatiques sans sepsis ont permis de révéler des variations dans l'expression de près de 3000 gènes en réponse au LPS. Parmi eux, 84 sont impliqués dans la signalisation des TLRs (Salomao et al., 2012). Ces gènes appartiennent à deux groupes : i) les gènes de tolérance codant pour les cytokines pro-inflammatoires et la régulation de la présentation des antigènes et ii) les gènes de non-tolérance codant pour les facteurs anti-inflammatoires et les effecteurs anti-microbiens.

De manière intéressante, dans le cas des patients avec les pathologies les plus sévères (sepsis sévère et choc septique), des études ont montré que les gènes de la signalisation des TLRs sont peu surexprimés voire réprimés (Figure 20). Des gènes et des protéines différents sont donc activés ou réprimés chez des patients dont le tableau clinique est celui d'une infection, d'un sepsis ou d'un choc septique (Salomao et al., 2012).

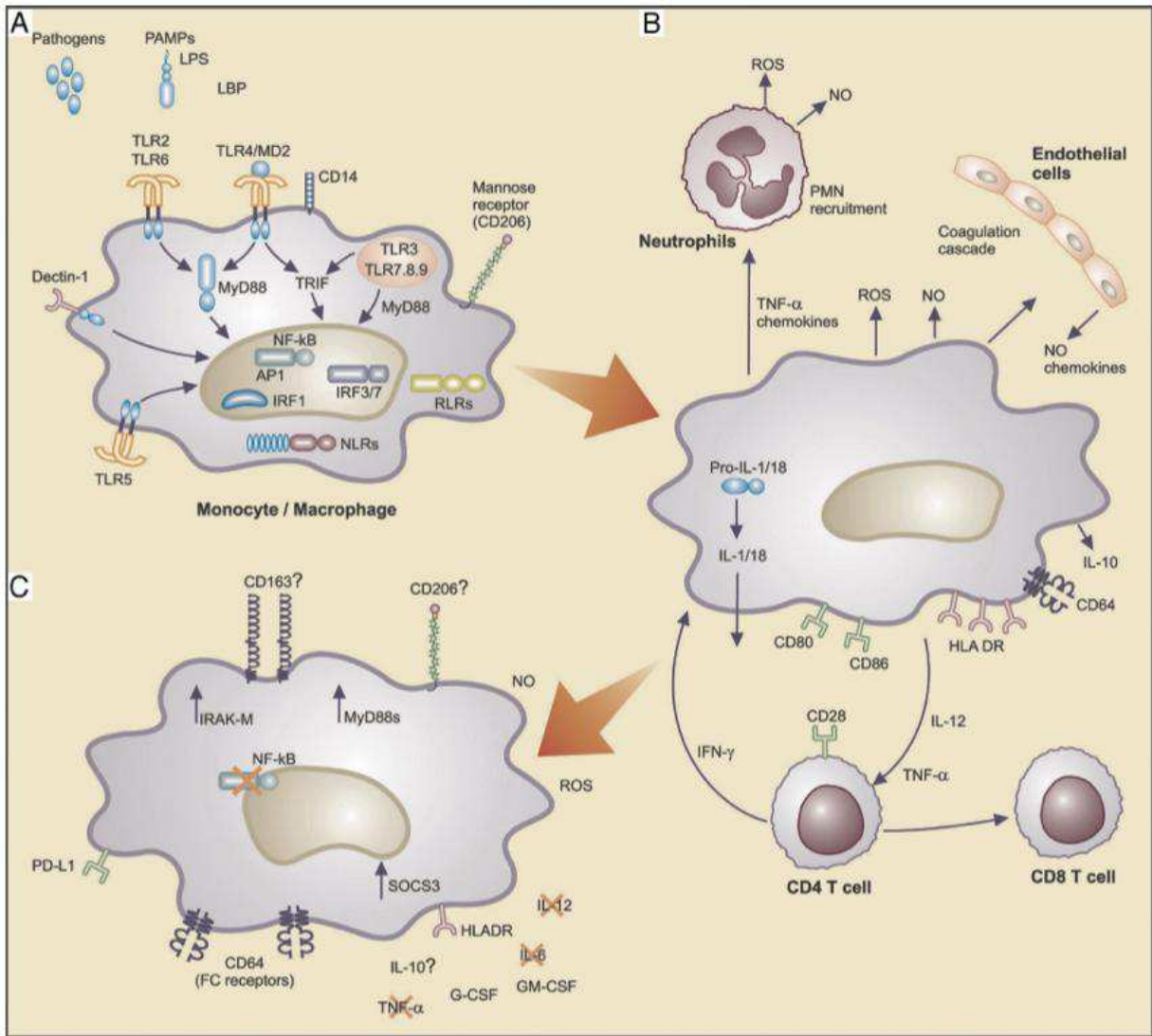


Figure 19. Reconnaissance bactérienne et réponse inflammatoire durant le sepsis. A. Activation de la réponse cellulaire dans les stades précoces de l'infection. B. Amplification de la réponse inflammatoire induisant l'activation des lymphocytes et le recrutement des PNNs. C. Retour à l'homéostasie post-infectieuse. D'après Salomao et al., Schock, 2012.

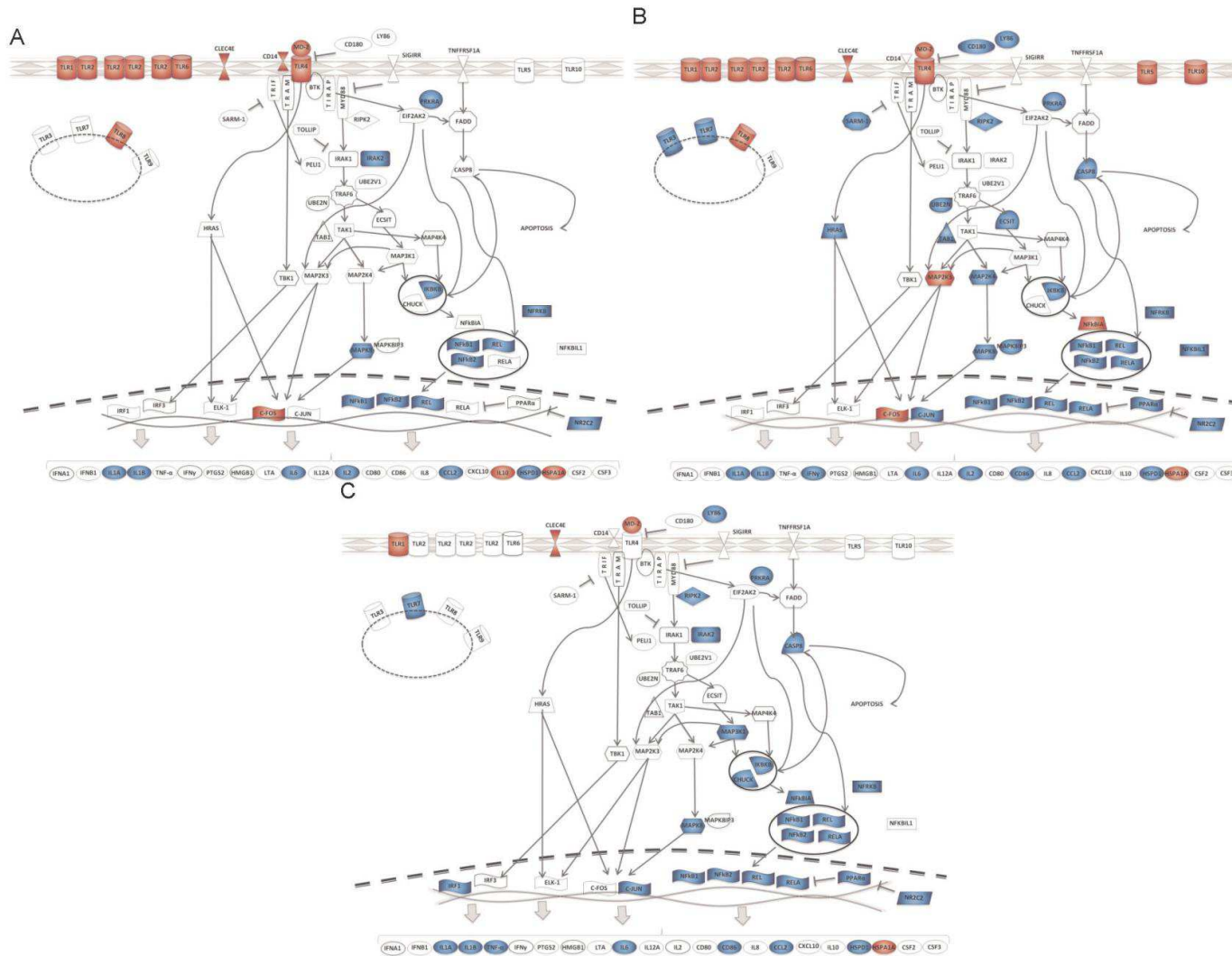


Figure 20. Voie de signalisation des TLRs dans les PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cell) de patients septiques (A), en sepsis sévère (B) ou en choc septique (C) comparés à des patients sains. Les gènes en rouge sont surexprimés (changement ≥ 2), ceux en bleu sont réprimés (changement ≤ 2) et ceux en blanc ne subissent pas de variation significative (changement ≤ 2). Chez les patients avec les pathologies les plus sévères (sepsis sévère et choc septique), les gènes de la signalisation des TLRs tendent à être réprimés.
D'après Salomao et al., Schock, 2012.

4. L'identification de composants du cluster moléculaire d'activation

La variabilité de la réponse anti-infectieuse est dépendante de l'expression génique et de la régulation protéique mais aussi de la localisation et des complexes protéiques ainsi que de la protéoforme. Par leur composition, les plateformes de signalisation membranaires permettent aux protéines de former des clusters transitoires facilitant l'intervention des différents modulateurs de la signalisation en aval des TLRs, notamment de TLR2 (Dykstra et al., 2003; Horejsí et al., 1999; Rajendran and Simons, 2005). En effet, deux travaux significatifs ont montré que TLR2 et ses molécules de signalisation sont recrutés transitoirement dans les radeaux lipidiques de monocytes stimulés avec des lipopeptides (Soong et al., 2004; Triantafilou et al., 2002).

A travers la combinaison de techniques de protéomique différentielle, le laboratoire a caractérisé le protéome des radeaux lipidiques de monocytes suite à leur stimulation par des agonistes de TLR2 (Toubiana, 2010). Une approche par 2D-DIGE (Two Differential Gel in Electrophoresis) a permis l'étude de la cinétique d'inclusion/exclusion protéique et des modifications post-traductionnelles subies différemment suivant l'état d'activation cellulaire (Figure 21). L'analyse par un logiciel permet de faire une quantification relative de l'intensité des spots et de déterminer lesquels seront prélevés pour être identifiés par MS (Mass Spectrometry). Du fait des propriétés des radeaux lipidiques qui induisent une perte de rendement lors des études sur gel, il a été nécessaire de compléter l'étude du recrutement protéique par une approche « off-gel », l'iTRAQ (isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification). Cette approche complémentaire a permis d'identifier 72 protéines recrutées et/ou phosphorylées. Le lien de ces protéines avec la signalisation NF- κ B a été analysé par Ingenuity[®] (Ingenuity System, Redwood City CA), permettant ainsi de mettre en évidence deux protéines d'intérêt : la tyrosine kinase Lyn et l'enzyme Inosine monophosphate déshydrogénase II (IMPDHII) (Figure 22).

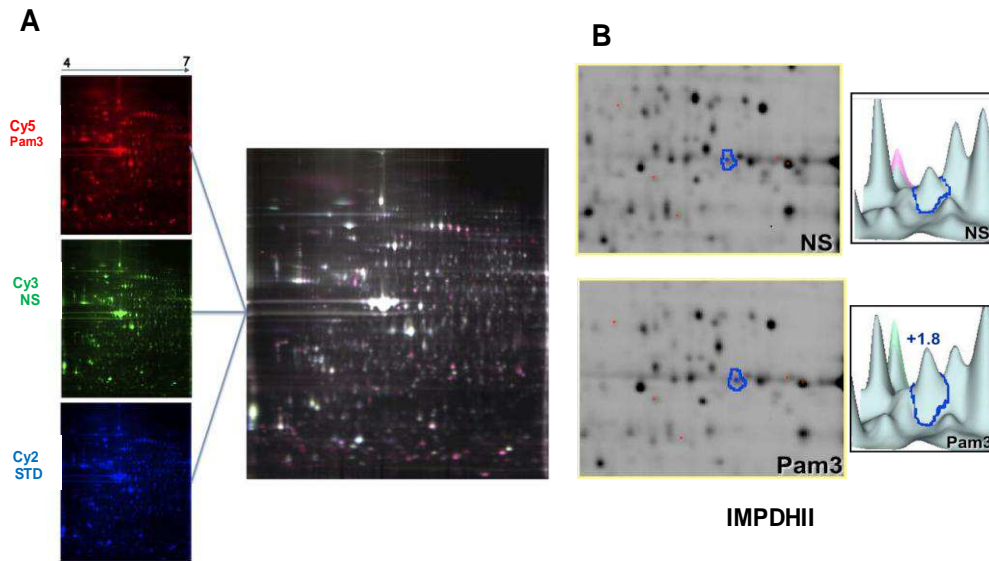


Figure 21. Approche d'électrophorèse bidimensionnelle. A. Exemple de gel obtenu par 2D-DIGE digitalisée. Ce gel contient des protéines de deux conditions différenciées par le marquage Cy3 et Cy5. Le Cy2 est le standard interne (mélange à quantité égale des échantillons des deux conditions étudiées). Les gels ainsi scannés sont analysés avec le logiciel DeCyder[®]. B. Représentation graphique, par DeCyder[®], des variations quantitatives de IMPDHII en fonction des conditions de stimulation (NS, non-stimulée ; Pam3, stimulée avec le lipopeptide tri-acétylé Pam3) de lignées monocytaires (THP1).

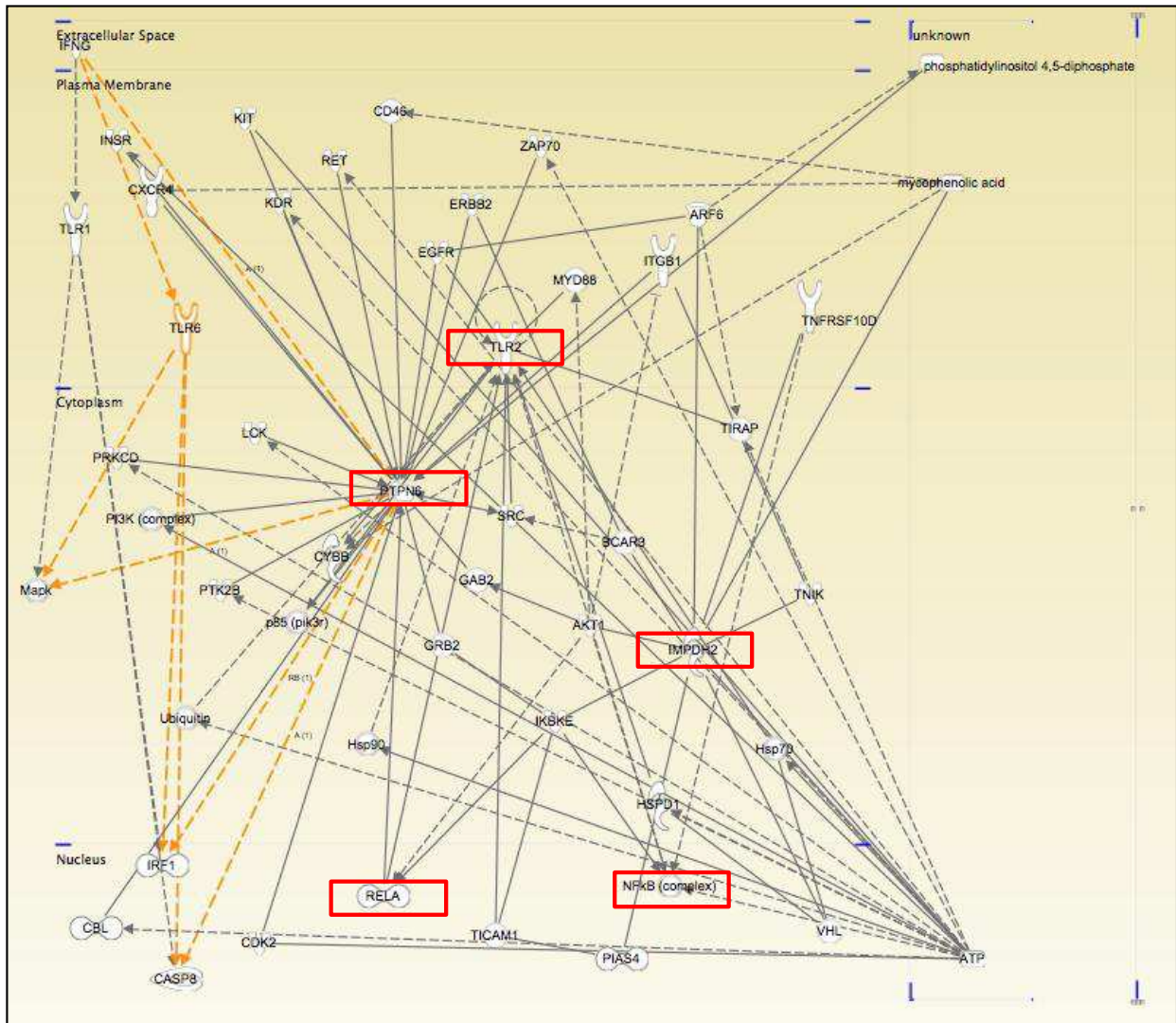


Figure 22. Représentation d'un réseau de la signalisation TLR2 - NF-κB par Ingenuity®. IMPDHII et SHP1 ont été intégrées dans le réseau de signalisation TLR2-NF-κB par l'utilisation d'une base d'extraction bibliographique. IMPDHII, SHP1 (PTPN6), TLR2, et NF-κB sont encadrées de rouge.

4.1.Lyn : fonction, structure et régulation

Parmi les PTKs identifiées, Lyn a été choisie pour son rôle de régulateur essentiel à différents niveaux de la réponse immunitaire. Comme de nombreuses études l'ont suggéré, la Src kinase Lyn est associée aux microdomaines membranaires. Ces mêmes travaux ont mis en lumière son rôle dans la régulation de la signalisation en aval des TLRs.

Comme toutes les Src kinases intracellulaires associées aux membranes, Lyn porte des signaux d'adressage : un site de myristoylation et un (des deux sites possibles) de palmitoylation dans sa région N-terminale (Resh, 1999). Lyn est également composée de

L'identification de composant du cluster d'activation moléculaire

domaines favorisant les interactions entre protéines (SH2 et SH3) ainsi que d'une région à activité kinase (Figure 23) (Boggon and Eck, 2004).



Figure 23. Représentation schématique de l'architecture de Lyn et des motifs phosphorylés sur tyrosines qui sont essentiels. Lyn est composée d'un domaine SH2, d'un domaine SH3, d'un motif proline (« P ») et d'un domaine à activité kinase. Elle subit des modifications post-traductionnelles : myristoylation (bleu marine), palmitoylation (cyan) et des phosphorylations sur résidus tyrosines (activatrices (vert) ou inhibitrices (rouge)).

D'après Ingley, Cell communication and signaling, 2012.

Lyn a deux polymorphismes issus des variations d'épissage de son exon 2, LynA (56KDa) et LynB (53KDa). Chacun de ces variants ne diffère que de 20 acides aminés dans les régions de palmitoylation et de myristoylation (Hibbs et al., 1995a; Yi et al., 1991).

Sous sa forme active, Lyn est phosphorylée en C-terminal par Csk (C-terminal Src kinase), ce qui crée un site de fixation pour son propre domaine SH2. De plus, le domaine SH3 de Lyn peut interagir avec son propre domaine riche en proline, qui est situé entre le domaine SH2 et le domaine à activité kinase (Ingley, 2012). L'activation de Lyn implique la déphosphorylation de la tyrosine 508, en C-terminal, par CD45 et une PTP, SHP2 (Futami et al., 2011; Wang et al., 2002). Lyn peut alors s'autophosphoryler sur sa tyrosine 397 ce qui conduit à la formation d'une protéine hyperactive (Xu et al., 1999). Cette modification post-traductionnelle modifie l'accessibilité aux domaines SH2 et SH3. En effet, la boucle d'activation/désactivation de Lyn est contrôlée par son interaction avec des adaptateurs moléculaires ou des protéines chaperonnes spécifiques de chaque compartiment cellulaire (Brdička et al., 2000; Ingley, 2009; Ingley et al., 2006; Kawabuchi et al., 2000). Dans le cycle d'inactivation de Lyn, les PTPs SHP1 et SHP2 peuvent déphosphoryler la tyrosine hyperactivatrice, ce qui régule négativement cette enzyme (Somani et al., 2001).

Parmi les fonctions de Lyn en aval des PRRs et notamment des TLRs, elle est impliquée dans la phosphorylation de MD2, suite à l'engagement de TLR4 dans les lignées cellulaires de HEK293 (Gray et al., 2011). Lyn participe à l'internalisation TLR2-dépendante de *P.aeruginosa* par les cellules de l'épithélium alvéolaire (Kannan et al., 2006). Enfin, en aval des TLRs, Lyn peut exercer deux fonctions antagonistes sur NF- κ B, en activant ou en réprimant son activité transcriptionnelle dans les monocytes/macrophages (Keck et al., 2010; Sanjuan, 2006).

L'identification de composant du cluster d'activation moléculaire

Dans l'immunité adaptative, Lyn est aussi caractérisée pour sa capacité à réguler positivement, comme négativement, les voies de signalisation des BCRs, par la modulation de l'activité PI3-K (Hawkins et al., 2006). Les fonctions antagonistes de Lyn sur l'activation des cellules de l'immunité dépendent du type cellulaire, du stade de différenciation cellulaire, du type de récepteurs impliqués aussi bien que de l'état d'activation de l'enzyme et de ses partenaires. Toutes ces données conduisent à penser que l'activité de Lyn est conditionnée par le contexte.

4.2. IMPDHII : fonction, structure et inhibition

L'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH) est présente sous deux isoformes : IMPDHI et IMPDHII. Chacune est encodée par son propre gène, eux-mêmes respectivement localisés sur les chromosomes 7 et 3. Les ADNs complémentaires de chacune des isoformes encodent pour des protéines de la même taille (514 acides aminés) avec 84% d'identité de séquence (Natsumeda et al., 1990). IMPDHI est constitutivement présente dans différents types cellulaires, comme les leucocytes, les érythrocytes et les lymphocytes, alors que IMPDHII est exprimée dans les cellules stimulées, en phase proliférative, en phase de croissance ou en phase de différenciation (Bremer et al., 2007; Jain et al., 2004). De nombreuses études se sont intéressées au rôle de IMPDHII dans la prolifération des lymphocytes T et B qui dépend principalement de la synthèse *de novo* de guanine (Simoneau et al., 2008). Cette activité enzymatique, dépendante du NADH, permet l'oxydation de l'IMP en XMP. Elle est limitante dans la synthèse *de novo* de Guanosine-5'-triphosphate (GTP) et deoxyGuanosine-5'-triphosphate (dGTP), nucléotide essentiel à la synthèse d'ADN et d'ARN (Figure 24A) (Colby et al., 1999). La fonction de IMPDHII dans la signalisation des cellules de l'immunité innée est encore peu décrite (Ignoul and Eggermont, 2005; Jonsson and Carlsten, 2002). Bien que son rôle d'immuno-modulateur de la défense anti-virale dépendante de TLR7 dans les macrophages murins ai été identifié (Lee et al., 2006), son implication dans la défense anti-bactérienne est encore peu connue.

L'identification de composant du cluster d'activation moléculaire

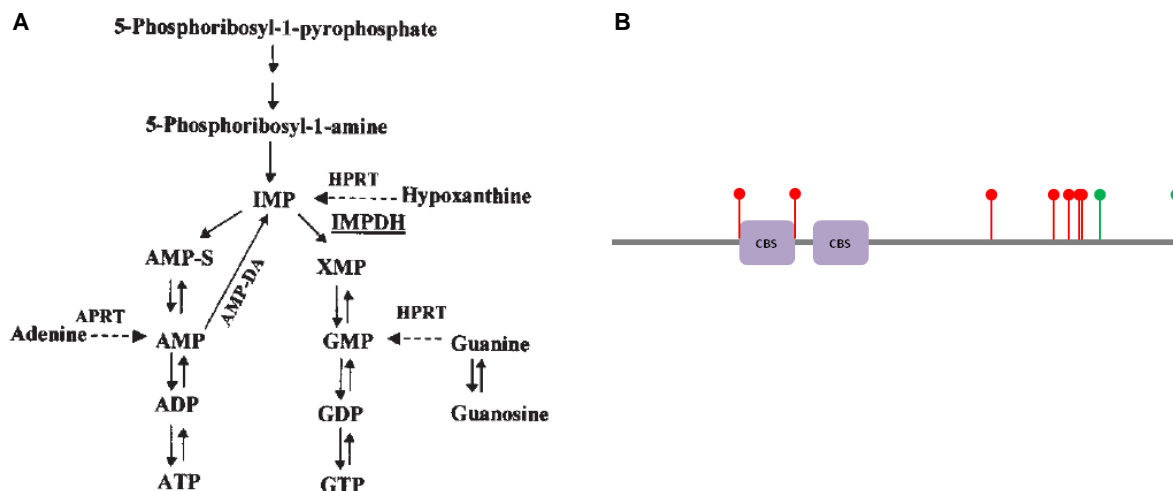


Figure 24. Représentation de IMPDHII. A. Rôle des IMPDHs dans la synthèse *de novo* de purine. B. Schéma d'organisation de IMPDHII. IMPDHII possède deux domaines CBS. Elle subit des modifications post-traductionnelles du type phosphorylations (boules rouges) et acétylations (boules vertes). D'après Gu et al., *JCI*, 2010 et Human Protein Reference Database, ID : 00895.

La déshydrogénase présente une organisation sous forme de tétramère. Chaque monomère est composé de deux domaines : un domaine catalytique et un petit domaine flanquant constitué des deux sous-domaines cystathionine β -synthase (CBS) (Figure 24B) (Colby et al., 1999). La région portant les domaines CBS, sans lien avec la fonction catalytique productrice de GTP de IMPDHII, est un trans-régulateur négatif de la synthèse d'adénine nucléotide (Pimkin and Markham, 2008; Pimkin et al., 2009).

La structure du site actif permet de créer des interactions non-covalentes entre le ribose de la poche IMP et l'anneau purine de l'inosine. Au cours de la réaction, l'intermédiaire XMP crée une liaison covalente avec la cystéine 331 ainsi que de nombreuses liaisons hydrogènes entre l'anneau purine du substrat et le site actif (Figure 25). Le XMP forme des liaisons hydrogènes avec la tyrosine 411 et la sérine 329 (Sintchak and Nimmesgern, 2000). Ces résidus sont donc essentiels à l'activité productrice de XMP de l'enzyme. La liaison à son produit fait passer IMPDHII d'une conformation ouverte à une conformation fermée (Figure 26) (Nimmesgern et al., 1996). En effet, la fixation de l'IMP ou du XMP diminue radicalement la protéolyse subie par la région comprise entre les résidus 412 et 441, ce qui traduit de ce changement de conformation. Les avancées technologiques ont permis d'identifier que la stabilité de la structure de IMPDHII est assurée par des liaisons hydrogènes entre quatre molécules d'eau conservées et quatre acides aminés essentiels du site actif dont la cystéine 331 et la tyrosine 411. La conformation est alors défavorable à la fixation du ligand et du cofacteur, mimant celle en présence des inhibiteurs (Bairagya et al., 2011).

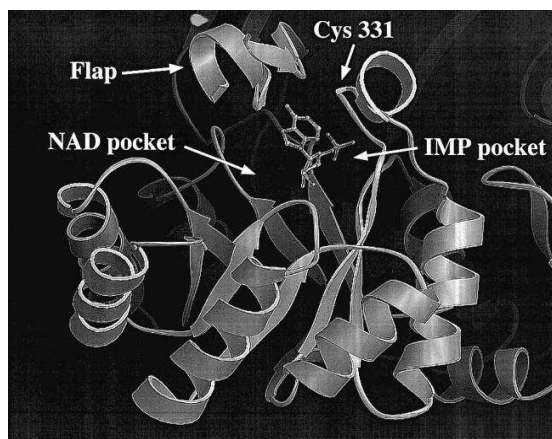


Figure 25. Modèle du site actif de IMPDHII. Un IMP est fixé sur la boucle en C-terminal du tonneau du domaine catalytique. La cystéine 331 du site actif, les poches de fixation du substrat (IMP) et du cofacteur (NAD) et le rabat du site actif sont identifiés.

D'après Sintchak et Nimmesgern, Immunopharmacology, 2000.

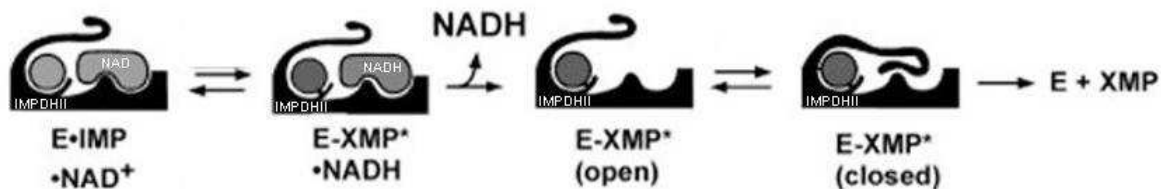


Figure 26. Changement de conformation de IMPDHII. IMPDHII est préférentiellement dans la conformation ouverte ce qui induit une grande affinité de la poche de l'enzyme pour son ligand.

D'après Hedstrom, Chemical Reviews, 2009.

Cette déshydrogénase est la cible de molécules comme l'acide mycophénolique (MPA) (Shu and Nair, 2008). Le MPA est un inhibiteur incompétitif dont la forme active est le Mycophenolate mofetil (MMF, Cellcept®). L'isoforme IMPDHII est environ quatre à cinq fois plus sensible au MPA que l'isoforme IMPDHI (Carr et al., 1993; Futer et al., 2002; Jain et al., 2004; Langman et al., 1996; Vannozzi et al., 2004). Le MPA agit sur le complexe lorsque IMPDHII n'est pas associée à son cofacteur, le NAD. Le groupement hydro-phénolique du MPA forme des ponts avec la thréonine 333 et la glutamine 441, ce qui remplace la molécule d'eau assurant la conversion de l'intermédiaire du XMP en son produit final (Sintchak et al., 1996). Le MPA maintient ainsi l'enzyme dans une conformation intermédiaire, liée au XMP et refermée (EMC Medicine, 2012; Jonsson and Carlsten, 2002; Nimmesgern et al., 1996; Novartis Pharmaceuticals Corporation, 2013). L'efficacité de cet inhibiteur a été prouvée dans la prévention des rejets de greffe aigus (Kaufman et al., 2004; Zhang et al., 2009). Son mode d'action est d'induire des changements conformationnels de IMPDH liée au GDP aboutissant à la formation d'agrégats. En revanche, cette drogue n'agit pas sur la forme IMPDH-GTP (Ji et al., 2005).

Objectifs

Objectifs

L'initiation et l'organisation de cette réponse immunitaire innée nécessitent l'intervention des récepteurs Toll (TLRs), et leur coopération avec de multiples protéines formant un complexe multimoléculaire dans les radeaux lipidiques (Soong et al., 2004; Triantafilou et al., 2006). Parmi elles, un certain nombre d'enzymes et molécules adaptatrices participent à la régulation positive ou négative des voies de signalisation engagées (Ghosh and Hayden, 2008; Triantafilou et al., 2002). La réponse immunitaire, ainsi engagée, est coordonnée par le facteur de transcription NF- κ B. Cette mise en œuvre coordonnée de l'immunité peut cependant être déséquilibrée par la perte de régulation précise ou par des facteurs génétiques influençant les molécules de signalisation. Par des techniques de protéomique différentielle, nous avons récemment identifié deux protéines recrutées à la membrane après engagement de TLR2, la tyrosine kinase Lyn et l'enzyme IMPDHII. L'objectif principal de ce travail a été de caractériser le rôle de ces deux potentiels régulateurs dans la variabilité de la réponse immunitaire innée.

Plus précisément, nous avons tenté :

- 1) d'identifier le rôle de la tyrosine kinase Lyn dans les mécanismes de signalisation cellulaire et dans la réponse inflammatoire après engagement de TLR2
- 2) de caractériser l'implication de IMPDHII dans la régulation de l'activation de NF- κ B
- 3) d'identifier le rôle d'un variant commun de *IMPDHII*, *IMPDHII-3757T/C*, dans la sévérité du choc septique chez les patients admis en réanimation (Partenariat avec le service de Réanimation médicale de l'Hôpital Cochin).

Résultats

Chapitre 1. Lyn : activateur de la voie NF- κ B en aval de TLR2

Lyn controls the PI 3-kinase pathway to NF- κ B activation after stimulation of Toll-like receptor 2

Anne-Lise Rossi *, Julie Toubiana *, Nadia Belaïdouni, David Grimaldi, Christophe
Rousseau, Philippe Chafey, Béatrice Comba, Luc Camoin, Georges Bismuth, Yann-Erick
Claessens, Jean-Paul Mira, Jean-Daniel Chiche

Soumis au Journal of Leucocyte Biology

Chapitre 2. IMPDHII : inhibiteur de la voie NF- κ B en
aval de TLR2

IMPDHII Protein Inhibits Toll-like receptor 2-mediated Activation
of NF- κ B

Toubiana J, Rossi AL, Grimaldi D, Belaïdouni N, Chafey P, Clary G, Courtine E, Pene
F, Mira JP, Claessens YE, Chiche JD

J Biol Chem. 2011 Jul 1;286(26):23319-33

2.1. Rôle de IMPDHII dans les mécanismes d'activation de TLR2

Les TLRs sont essentiels à l'initialisation de l'inflammation et à l'engagement de la réponse immunitaire. Cependant une amplification de la boucle de régulation de leurs voies de signalisation peut induire une activation immunitaire excessive associée à une réponse cytokinique entraînant des dommages tissulaires qui, eux-mêmes, activent les TLRs (Tsujiimoto et al., 2007). Le sepsis est un syndrome clinique qui résulte d'une dérégulation du système immunitaire (Hotchkiss and Karl, 2003). Le facteur transcriptionnel NF- κ B est impliqué dans le contrôle de la transcription de gènes codant pour des protéines essentielles à la réponse immunitaire innée et adaptative. Ses régulateurs peuvent donc être considérés comme des cibles thérapeutiques.

Des travaux préliminaires de l'équipe ont identifié 72 protéines comme étant recrutées et/ou phosphorylées sur tyrosines, dans le complexe membranaire d'activation formé au niveau des radeaux lipidiques, suite à la stimulation des hétérodimères de TLR2. L'objectif de ce travail a été d'établir le rôle de l'une d'entre-elles, la déshydrogénase IMPDHII. Suite à une stratégie fondée sur l'utilisation de modèles cellulaires humains (HEK293-TLR2, THP1-CD14 et PBMC) et différentes techniques d'inhibition ou de surexpression de IMPDHII (inhibiteur chimique ou siARN), les résultats peuvent être résumés ainsi :

1. Afin de déterminer si IMPDHII est recrutée dans les radeaux lipidiques et quels types de modifications post-traductionnelles cette déshydrogénase subit, nous avons utilisé une approche protéomique de 2D-DIGE et d'immunoblots. Nous avons montré que, suite à la stimulation de TLR2, IMPDHII est recrutée dans les radeaux lipidiques ou elle subit des phosphorylations sur tyrosine.
2. La reconnaissance des agonistes par TLR2 aboutit à l'activation du facteur de transcription NF- κ B, qui initie la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Afin de caractériser le rôle de IMPDHII dans la voie d'activation de NF- κ B, nous avons utilisé une technique de gène rapporteur luciférase, permettant de mesurer l'activité de NF- κ B, puis nous avons dosé la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α . Toutes ces données suggèrent que IMPDHII agit comme un régulateur négatif de l'activité NF- κ B suite à la stimulation de TLR2.

3. L'activation de NF- κ B peut impliquer trois voies principales, la voie des MAPKs, celle de la libération de NF- κ B suite à la dégradation d'I κ B et enfin celle de la transactivation de la sous-unité p65 (Kawai and Akira, 2010). Pour identifier avec quelle voie IMPDHII interfère, nous avons analysé les profils d'activation de chacune par immunoblot. Nous avons montré que IMPDHII inhibe la phosphorylation transactivatrice de la sous-unité p65 de NF- κ B.
4. La transactivation de NF- κ B suite à la stimulation de TLR2 est dépendante de l'activation de Akt (Arbibe et al., 2000). Afin de déterminer l'effet de IMPDHII sur cette kinase, nous avons déterminé son profil d'activation par immunoblot. Nous avons montré que IMPDHII inhibe l'activation de Akt.
5. L'activation de Akt est dépendante de son recrutement membranaire à proximité de la PI3-K activée (Liljeroos et al., 2007; Strassheim et al., 2004). L'activation de la PI3-K implique son recrutement dans le complexe moléculaire d'activation, au niveau de TLR2. Afin de déterminer si IMPDHII est aussi recrutée dans ce complexe et y modifie le recrutement de la PI3-K, nous avons pratiqué des co-immunoprécipitations sur des lysats cellulaires. Nous avons montré que IMPDHII est recrutée dans ce complexe sans altérer celui de la PI3-K.
6. Afin de déterminer si IMPDHII diminue la quantité de PIP3, produit de la PI3-K, nous avons étudié le recrutement membranaire d'Akt. Nous avons donc transfecté une protéine de fusion composée du domaine PH d'Akt et de la GFP, puis nous avons étudié sa localisation cellulaire par microscopie confocale. Nous avons donc montré que IMPDHII régule négativement le recrutement membranaire d'Akt ce qui suggère un rôle inhibiteur sur l'activité de la PI3-K.
7. SHIP1 est une phosphatase qui inhibe l'activité de la PI3-K en déphosphorylant le PIP3 (Strassheim et al., 2004). Afin de déterminer si IMPDHII régule cette phosphatase, nous avons utilisé des immunoblots pour analyser le profil d'activation. Nous avons montré que IMPDHII inhibe la voie de transactivation de p65 en amont de la PI3-K, indépendamment de SHIP1.
8. L'activité de la PI3-K dépend de la phosphorylation sur tyrosine de ses deux sous-unités (al-Shami et al., 1997). Afin de déterminer si IMPDHII module le profil de

tyrosine phosphorylation de la PI3-K, nous avons utilisé les révélations d'immunoprécipitations sur des immunoblots. Nous avons ainsi montré que IMPDHII inhibe la phosphorylation sur tyrosine de la sous-unité régulatrice de la PI3-K, p85 α , sans modifier celle de la sous-unité catalytique, p110.

9. La phosphatase SHP1 est connue pour être impliquée dans la régulation de l'immunité innée en inhibant la PI3-K par la déphosphorylation de la sous-unité p85 α (Cuevas et al., 2001; Hajishengallis et al., 2008; Slevogt et al., 2008). Afin de déterminer si IMPDHII interfère avec la voie de la PI3-K par SHP1, nous avons mesuré l'activité luciférase dans des cellules HEK293-TLR2 transfectées avec un plasmide codant pour SHP1 et traitées avec du DMSO et du MPA. Ces données suggèrent que IMPDHII régule la voie d'activation de la PI3-K en amont, par SHP1.
10. Afin de déterminer comment IMPDHII interagit avec SHP1, nous avons co-immunoprécipité les partenaires à partir de lysats de cellules traitées avec du DMSO ou du MPA. IMPDHII et SHP1 interagissent constitutivement et sans altération de ce profil dans les conditions d'inhibition de IMPDHII.
11. Afin de mieux appréhender l'interaction entre IMPDHII et SHP1, nous avons voulu vérifier si IMPDHII modifie l'activité de SHP1. Nous avons donc immunoprécipité SHP1 dans les lysats de THP1 incubées avec du MPA ou du DMSO. L'activité phosphatase a été quantifiée en mesurant l'absorbance à $\lambda = 410\text{nm}$. Ces données suggèrent que IMPDHII contribue à l'activation de SHP1, suite à la stimulation de TLR2.
12. L'activité de SHP1 dépend des changements de conformation induit par l'interaction de ses domaines SH2 avec des motifs phosphorylés sur tyrosine, comme les domaines TIR de TLR2 (Barford and Neel, 1998; Wang et al., 2011; Yang et al., 2002b). Par technique d'immunoblots, nous avons montré que SHP1 est recrutée dans les radeaux lipidiques suite à la stimulation de TLR2. Afin de déterminer si IMPDHII module l'interaction entre SHP1 et TLR2, dans un premier temps, nous avons déterminé, par microscopie confocale, la localisation de SHP1 et de TLR2 dans des THP1 traitées au MPA ou au DMSO. Nous avons ainsi observé que la stimulation de TLR2 induit une colocalisation de SHP1 et de TLR2, facilitée par IMPDHII. Dans un deuxième temps, nous avons co-immunoprécipité les deux partenaires depuis des lysats de cellules

incubées avec du DMSO ou du MPA. Nous avons montré que l'interaction entre TLR2 et SHP1, n'est pas régulée par IMPDHII.

13. L'activité de SHP1 dépend de l'équilibre entre les phosphorylations activatrices, sur tyrosines, et les inhibitrices sur sérines. Nous avons utilisé des immunoprécipitations pour étudier les profils de phosphorylation sur tyrosines et sur sérines. Suite à l'incubation des THP1 dans du MPA, nous avons montré que l'inhibition de IMPDHII ne modifie pas le profil de phosphorylations sur résidus tyrosines mais augmente celles des résidus sérines. Ces données suggèrent que IMPDHII protège SHP1 de son inhibition.

Ce travail introduit de nouvelles perspectives dans le rôle de IMPDHII dans l'immunité innée. Nos résultats révèlent le rôle inhibiteur de IMPDHII sur le facteur de transcription NF- κ B en régulant négativement la voie de la PI3-K/Akt par SHP1. Ils soulèvent néanmoins des questions sur la mécanistique de l'inhibition par IMPDHII.

1. Par quels mécanismes IMPHII favorise-t-elle l'activité immuno-modulatrice de SHP1 en aval de TLR2 ?

Ce travail a montré que l'action de IMPDHII sur SHP1 n'est pas dépendante de la stabilité de leur interaction, mais implique une modification du profil de phosphorylations sur sérines. Des études ont montré que ces sérines phosphorylations de SHP1 inhibent son activité phosphatase (Jones et al., 2004; Poole and Jones, 2005). IMPDHII peut moduler l'activation de SHP1 par un intermédiaire, non encore identifié, contenant des motifs ITIMs ou ITAMs. En effet, l'activation de SHP1 requiert son interaction avec des motifs phosphorylés sur tyrosines (Hamerman et al., 2009; Poole and Jones, 2005). De nombreuses molécules transmembranaires ou cytosoliques comme CEACAM1 ou IRAK1 contiennent des ITIMs (Abu-Dayyeh et al., 2008; Slevogt et al., 2008). De plus, certains récepteurs, comme les β intégrines, couplés avec des adaptateurs contenant des domaines ITAMs, interfèrent avec la signalisation en aval des TLRs (Hamerman et al., 2009; Wang et al., 2010b; Waterman and Cambier, 2010). Il est intéressant de noter que des molécules, comme les β intégrines, interagissent avec la famille des PKCs. Certains des membres de cette famille de kinases phosphorylent SHP1 sur ses résidus sérines inhibiteurs (Abram and Lowell, 2007; Brumell et al., 1997; Jones et al., 2004; Poole and Jones, 2005).

2. IMPDHII possède-t-elle des résidus essentiels à son rôle inhibiteur sur l'activité du facteur de transcription NF- κ B ?

Pour sa fonction productrice de purines, IMPDHII comporte plusieurs domaines et résidus essentiels (<http://www.uniprot.org/uniprot/P12268>) (Colby et al., 1999; Nimmesgern et al., 1996; Pimkin and Markham, 2008; Pimkin et al., 2009; Sintchak and Nimmesgern, 2000). Ces résidus, notamment les tyrosines et les sérines, lui permettent d'interagir avec les protéines de son environnement (http://elm.eu.org/cgimodel.py?fun=smartResult&userId=nNzYTQWOoXExP&EXPECT_CUTOFF=100&r=1&bg=on). En revanche, les résidus essentiels à son rôle inhibiteur dans la signalisation TLR2 - NF- κ B sont encore inconnus. Parmi les protéines avec lesquelles IMPDHII peut potentiellement interagir, quatorze sont également des partenaires de SHP1, dont trois possèdent des domaines SH2. IMPDHII semblant agir sur la signalisation en aval de TLR2, par le biais de SHP1, il serait intéressant i) de connaître les sites de IMPDHII essentiels à son activité sur la voie TLR2 et sur le contrôle de l'activité de NF- κ B et ii) de déterminer s'ils sont associés à une modification de l'activité phosphatase de SHP1.

3. A l'échelle clinique, y a-t-il des polymorphismes de IMPDHII associés à un phénotype infectieux particulier ?

IMPDHII joue un rôle de régulateur négatif dans la voie NF- κ B dépendante de TLR2. NF- κ B est associée à la gravité clinique au cours du sepsis (Arnalich et al., 2000; Hotta et al., 2007). A l'échelle humaine, IMPDHII a surtout fait l'objet d'études portant sur son rôle dans l'immunité adaptative et son implication en tant que cible de l'acide mycophénolique, dans le rejet de greffe rénale (Gu et al., 2000; Pazik et al., 2011). Il serait intéressant de connaître l'impact de IMPDHII dans les mécanismes de défense innée anti-infectieuse. De récentes études ont décrit plusieurs polymorphismes génétiques de *IMPDHII* avec un impact plus ou moins important sur son activité. Ces polymorphismes ont été principalement étudiés en pharmacogénétique à travers les variations inter-individuelles observées dans le rejet de greffe (Shah et al., 2012; Sombogaard, 2010). Il serait intéressant d'étudier le rôle potentiel de ces polymorphismes dans la gravité du sepsis.

2.2. Publication

Supplemental Material can be found at:
<http://www.jbc.org/content/suppl/2011/04/01/M110.201210.DC1.html>

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 286, NO. 26, PP. 23319–23333, JULY 1, 2011
 © 2011 BY THE AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC. PRINTED IN THE U.S.A.

IMPDHII Protein Inhibits Toll-like Receptor 2-mediated Activation of NF- κ B^{*§}

Received for publication, November 6, 2010, and in revised form, March 29, 2011. Published, JBC Papers in Press, April 1, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.201210

Julie Toubiana^{†§1}, Anne-Lise Rossi^{‡§}, David Grimaldi^{†§¶2}, Nadia Belaidouni^{†§}, Philippe Chafey^{‡§||}, Guilhem Clary^{†§||}, Emilie Courtine^{†§}, Frederic Pene^{‡§¶}, Jean-Paul Mira^{†§¶}, Yann-Erick Claessens^{†§¶}, and Jean-Daniel Chiche^{†§¶3}

From the [†]Paris Descartes University, 75006 Paris, France, [‡]INSERM U1016/CNRS UMR 8104 and the ^{||}Proteomic Platform, Cochin Institute, 75014 Paris, France, and the [¶]Medical Intensive Care Unit, Cochin University Hospital, 75014 Paris, France

Toll-like receptor 2 (TLR2) plays an essential role in innate immunity by the recognition of a large variety of pathogen-associated molecular patterns. It induces its recruitment to lipid rafts induces the formation of a membranous activation cluster necessary to enhance, amplify, and control downstream signaling. However, the exact composition of the TLR2-mediated molecular complex is unknown. We performed a proteomic analysis in lipopeptide-stimulated THP1 and found IMPDHII protein rapidly recruited to lipid raft. Whereas IMPDHII is essential for lymphocyte proliferation, its biologic function within innate immune signal pathways has not been established yet. We report here that IMPDHII plays an important role in the negative regulation of TLR2 signaling by modulating PI3K activity. Indeed, IMPDHII increases the phosphatase activity of SHP1, which participates to the inactivation of PI3K.

Toll-like receptors (TLRs)⁴ play an essential role in innate immunity by recognizing invading microorganisms through conserved pathogen-associated molecular patterns. The binding of microbial ligands to TLRs elicit a sequence of molecular events leading to the activation of transcription factors such as nuclear factor κ B (NF- κ B) that control the organization of the proinflammatory response (1, 2). Among the 10 TLRs involved in human antimicrobial defense, TLR2 is characterized by its wide repertoire of recognized pathogens (3, 4) and its ability to heterodimerize with TLR1 or TLR6 to bind diacyl or triacyl lipopeptides, respectively (5, 6).

These preformed heterodimers are recruited to membrane microdomains or lipid rafts where they contribute to the constitution of a molecular cluster essential to downstream signal transduction (7, 8). In immune cells such as monocyte/macrophages, the TLR2 activation cluster includes the adaptor protein myeloid differentiation factor 88 (MyD88) upstream of a cascade of protein kinases that ultimately lead to the activation of MAP kinase pathways, phosphorylation of I κ B, and nuclear translocation of NF- κ B (1, 2). TLR2-mediated activation of NF- κ B requires phosphorylation of its p65 subunit through a second pathway that involves Rho-GTPase Rac1, phosphoinositide 3-kinase (PI3K), and AKT (9–13).

Because prolonged or excessive activation may result in excessive inflammation, tissue injury septic shock, and multiple organ failure (14), TLR activation is fine-tuned through complex interactions with negative regulators. Signaling proteins that inhibit TLR signaling include IRAKM, ST2, SIGIRR, SOCS1, TANK, tumor suppressors CYLD and A20 (14–18). Of note, they all interact with components of the NF- κ B canonical activation pathway. We characterized the proteome of lipid rafts following stimulation of TLR2 by lipopeptides to identify new proteins involved in TLR2 signaling. Following an Ingenuity (Ingenuity Systems, Redwood City, CA) analytic output of differentially regulated proteins focused on NF- κ B signaling pathways, we found that inosine monophosphate dehydrogenase II (IMPDHII), a rate-limiting enzyme for GTP *de novo* synthesis, is a negative regulator of TLR2-mediated NF- κ B activation and is recruited and phosphorylated in lipid rafts. We report that IMPDHII inhibits NF- κ B transactivation via the activation of SHP1 phosphatase, which in turn negatively regulates PI3K activation. This study provides the first evidence for a negative role of IMPDHII in TLR2 signaling.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents and Cell Culture—We used the human monocyte cell line THP1 stably transfected with human CD14 and human embryonic kidney (HEK) 293 cells stably transfected with TLR2 (HEK293-T2). HEK293-T2 cells were maintained in low glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), HEPES (10 mM), L-glutamine (2 mM), penicillin (100 units/ml), and streptomycin (100 μ M). THP-1-CD14 cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FBS, HEPES (10 mM), L-glutamine (2 mM), penicillin (100 units/ml), and streptomycin (100 μ M).

* This work was supported by grants from INSERM and the Cochin Association for Research on Inflammation, Sepsis, and Molecular Advances (CARISMA).

§ The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. 1–3.

¹ Supported by grants from Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP)-CNRS and Fondation pour la Recherche Médicale and by the Levi Montalcini Biomedical Sciences Award from the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM).

² Supported by a grant from Fondation pour la Recherche Médicale.

³ To whom correspondence should be addressed: Cochin University Hospital, Medical Intensive Care Unit, 27 Rue du Faubourg St. Jacques, 75014 Paris, France. Tel.: 33-158412501; Fax 33-158412505; E-mail: jean-daniel.chiche@cch.aphp.fr.

⁴ The abbreviations used are: TLR, Toll-like receptor; IMPDHII, inosine monophosphate dehydrogenase type II; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; MAP, mitogen-activated protein; MPA, mycophenolic acid; MBS, MES buffer saline; IPG, immobilized pH gradient; DIGE, differential in-gel electrophoresis; ABC, ammonium bicarbonate; ACN, acetonitrile; PI, phosphatidylinositol; DMSO, dimethyl sulfoxide; ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif.

IMPDHII Inhibits TLR2 Signaling

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from healthy volunteers using a discontinuous 33/66% Ficoll gradient (GE Healthcare). PBMCs were washed in RPMI medium and then incubated in RPMI 1640 medium containing and 10% FBS. Cells were incubated in low attachment plates (Corning) for stimulation studies with synthetic lipopeptides.

Pam3-Cys-KKKK (Pam3; EMC Microcollections) mimics the bacterial triacyl component after ligation to the heterodimer TLR-1/2. Pam2-Cys-FEPPPATTT (Pam2; EMC Microcollections) mimics bacterial diacyl lipoprotein after ligation to the heterodimer TLR-2/6. LPS (Sigma-Aldrich), agonist of TLR4, and flagellin (*Salmonella typhimurium* flagellin; InvivoGen, San Diego, CA), agonist of TLR5, were also used. Mycophenolic acid (MPA; Sigma-Aldrich) was used *in vitro* at a sufficient dose to induce inhibition of IMPDHII as described previously (19–21) and to induce inhibition of NF- κ B activity with a minimum cell death (<5%). LY-294002 and guanosine were obtained from Sigma-Aldrich.

Protein G-agarose was from Sigma. Polyclonal anti-p85 was a kind gift from Dr. Tamborini, Cochin Institute. Polyclonal anti-IMPDHII and anti-SHP1 were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Polyclonal antibodies to phospho-Akt (Ser-473), Akt, phospho-p65 (Tyr-536), p65, phospho-p38, phospho-Erk, phospho-Sap/Jnk, Erk, Sap/Jnk, I κ B, P-SHIP-1, and SHIP-1 and monoclonal antibody p38 were obtained from Cell Signaling (Danvers, MA). Monoclonal antibody to FLAG was from Sigma. Monoclonal antibodies against amino acid 800–1139 of human p110 isoforms and antibodies against SHP1, TLR2, and Rac1 were from Santa Cruz Biotechnology. Anti-phosphotyrosine (4G10 clone) and anti-phosphoserine (4A4 clone) antibodies were obtained from Upstate Biotechnology Inc. (Charlottesville, VA).

Preparation of Lipid Raft Proteins and Two-dimensional Electrophoresis—Lipid rafts isolation is based on their resistance to Triton X-100 detergent (detergent-resistant membrane). THP1 cells (1×10^9) were lysed at 4 °C in 1.4 ml of MES buffer saline (MBS) (25 mM MES, 150 mM NaCl, and 1 mM EDTA, pH 6.5) containing 1% Triton X-100 (Sigma), 1 mM sodium vanadate, and protease inhibitor mixture (Sigma) and homogenized 10 times with a Dounce homogenizer. The homogenates were then mixed with an equal volume of 85% sucrose/MBS and transferred to Ultracentrifuge tubes. The samples were overlaid by 4 ml of 30% sucrose/MBS and 2 ml of 5% sucrose/MBS. The gradients were centrifuged at $250,000 \times g$ at 4 °C for 16 h in a Beckman SW 41 rotor (Beckman L-80 Ultracentrifuge). 12 fractions (833 ml each) were collected from the top; fractions 2–4 were pooled as detergent-resistant membrane fractions. To concentrate lipid rafts, the pooled fractions were diluted four times in a HEPES buffer without NaCl (25 mM HEPES, 1 mM EDTA, and 1 mM PMSE, pH 6.5) and ultracentrifuged at $140,000 \times g$ for 1 h at 4 °C in a SW 41 Beckman rotor. After centrifugation, the resulting pellets were homogenized for 1 h at 4 °C in 120 μ l of UTCD buffer (8 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS detergent, and 50 mM dithiothreitol) and then centrifuged. Supernatants were collected, and proteins were precipitated with a 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare). Pellets were solubilized in 100 μ l of UTCD buffer without DTT, and the

protein concentration was determined using a Bradford assay (Bio-Rad).

Four duplicates of each condition (namely, samples of lipid rafts from nonstimulated, Pam2-stimulated, and Pam3-stimulated THP1) were used for two-dimensional difference gel electrophoresis (DIGE) analysis. 50 μ g of each sample were alternatively labeled with Cy3 and Cy5 CyDyes™ Fluor minimal dyes (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. The internal standard, prepared by combining equal portions of each of the samples used for the study, was labeled with Cy2. Two-dimensional gel electrophoresis was performed with pH 4–7 IPG strips (24 cm, GE Healthcare) at 20 °C using IPGphor3 (GE Healthcare) for a total of 100 kV/h. After equilibration the IPG strips were placed onto homemade polyacrylamide gels (8–18%), and electrophoresis was done at 20 °C in the EttanDalt II system (GE Healthcare) at 4 watts/gel for 30 min then 18 watts/gel for ~5 h (until the bromophenol blue dye front reached the bottom of the gel). We performed all electrophoresis procedures in the dark. The Cy2, Cy3, and Cy5 components in each gel were imaged individually using a Typhoon 9400 variable mode imager (GE Healthcare). The images were scanned using optimal excitation/emission wavelength for each DIGE Fluor (Cy2, 488/520 nm; Cy3, 532/580 nm; Cy5, 633/670 nm). Spot detection, relative quantification of spot intensity, and statistical evaluation were carried out with DeCyder 7.0 software (GE Healthcare). Protein spot fold changes $\geq +1.4$ or ≤ -1.4 were set as thresholds. Spots with a Student's *t* test *p* value of less than 0.05 in a comparison of log-standardized abundance values of Pam2- or Pam3-stimulated lipid raft samples *versus* nonstimulated samples were retained for protein identification.

For two-dimensional electrophoresis gel multiplexed staining and Western immunoblotting, 80 μ g of proteins for each condition were resolved by two-dimensional electrophoresis using pH 4–7 IPG strips (7 cm, GE Healthcare). The first dimension was performed at 20 °C using the IPGphor system (GE Healthcare) for a total of 6 kV/h, and then equilibrated strips were inserted onto 11% polyacrylamide gels (Mini Protean III, Bio-Rad) in the second dimension. Two-dimensional gels were either stained or transferred onto nitrocellulose membrane. For multiplexed staining, two-dimensional electrophoresis gels were fixed in a mixture of 50% ethanol and 10% acetic acid three times for 30 min. Afterward, gels were washed three times for 10 min in ultra-pure water and stained for 1 h with Pro-Q Diamond as recommended by the manufacturer (Molecular Probes, Invitrogen). Phosphoproteins were visualized by gel scanning with a Typhoon 9400 Imager (GE Healthcare). Afterward, a SYPRO Ruby (Bio-Rad) total protein stain was performed. For Western analysis, nitrocellulose membranes were blocked for 1 h using blocking buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.5% Tween 20, 1% BSA). Membranes were probed overnight at 4 °C with anti-IMPDHII antibodies, washed three times in washing buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5, and 0.5% Tween 20), and probed with HRP-conjugated secondary antibodies. Immunopositive proteins were visualized using ECL+ (GE Healthcare) as directed by the manufacturer.

IMPDHII Inhibits TLR2 Signaling

Identification by Mass Spectrometry (MS)—Spots of interest were excised in a Coomassie Blue-colored gel following differential analysis. Spots were first destained twice with a mixture of 100 mM ammonium bicarbonate (ABC) and 50% acetonitrile (ACN) for 45 min at 22 °C and then dried using 100% ACN for 15 min. Protein spots were then reduced with 25 mM ABC containing 10 mM DTT for 1 h at 60 °C and then alkylated by 55 mM iodoacetamide in 25 mM ABC for 30 min in the dark at 22 °C. Gel pieces were washed twice with 25 mM ABC; finally they were shrunk with 100% ACN for 15 min and dried using 100% ACN for 10 min. Bands were completely dehydrated after 1 h at 60 °C. Gel pieces were incubated with 13 μ l of sequencing grade modified trypsin (Promega, Madison, WI; 12.5 μ g/ml in 40 mM ABC, 10% ACN, pH 8.0) overnight at 40 °C. After digestion, peptides were washed with 30 μ l of 25 mM ABC, shrunk with 100% ACN, and extracted twice with a mixture of 50% ACN, 5% formic acid. Extracts were dried using a vacuum centrifuge (Eppendorf). Peptides were then desalted using C18 ZipTips (Millipore) with two elutions, first with 50% ACN, 5% formic acid and then with 80% ACN, 5% formic acid. Pooled elutions were left to dry at ambient temperature. For MS and MS/MS analysis, peptides were redissolved in 4 μ l of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (5 mg/ml in 50% ACN, 0.1% trifluoroacetic acid). 1 μ l of each sample was spotted directly onto a MALDI plate (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sample analysis was performed using a MALDI-TOF-TOF 4800 mass spectrometer (Applied Biosystems). Spectral acquisition and processing was performed using the 4000 Series Explorer software (Applied Biosystems) version 3.5.28193 in positive reflectron mode at fixed laser fluency with low mass gate and delayed extraction. External plate calibration was performed with four calibration points spotted onto the four corners of the plate using a mixture of five external standards (PepMix 1, LaserBio Labs, Sophia Antipolis, France). Peptide masses were acquired in steps of 50 spectra for the range of 900 to 4000 Da. MS spectra were summed from 500 laser shots from an Nd-YAG laser operating at 355 nm and 200 Hz. After filtering of tryptic, keratin, and matrix contaminant peaks, up to 15 parent ions were selected for subsequent MS/MS fragmentation according to mass range, signal intensity, signal to noise ratio, and absence of neighboring masses in the MS spectrum. MS/MS spectra were acquired in 1 kV positive mode, and 1000 shots were summed by increments of 50. Database searches were carried out using Mascot version 2.2 (Matrix Science, London, UK) via GPS Explorer software (Applied Biosystems), version 3.6, combining MS and MS/MS interrogations on human proteins from the SwissProt data bank. The search parameters were as follows: carbamidomethylation was used as a variable modification for cysteines and oxidation as a variable modification for methionines. Up to one missed tryptic cleavage was permitted, and a mass accuracy tolerance of 30 ppm for precursors and 0.3 Da for fragments was used for all tryptic mass searches. Positive identification was based on a Mascot score above the significance level (*i.e.* <5%). The reported proteins were always those with the highest number of peptide matches. Under our identification criteria, no result was found to match to multiple members of a protein family.

Two-dimensional Data Analysis—Protein lists of differentially expressed proteins in lipid rafts were analyzed using the Ingenuity Pathways Analysis application (IPA, Ingenuity Systems). Proteins that interacted with the NF- κ B canonical pathway were selected for further functional analyses.

Transfection—HEK293-T2 cells were transfected with NF- κ B-responsive luciferase reporter (5 \times NF- κ B-Luc, 40 ng) and β -galactosidase (40 ng) plasmids (Promega) to measure luciferase activity. Luciferase assays were done using the Luciferase Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions. Luciferase activity was normalized to β -galactosidase to standardize transfection efficiency. Wild type IMPDHII and the negative dominant form of PI3K regulatory subunit p85 (DP85N) were subcloned in pCMV6 vector; the GFP-Akt-PH construct was a kind gift from Dr. G. Bismuth (22). cDNA for wild type SHP1 subcloned into the p3 vector was from Addgene (Cambridge, MA). All constructs were confirmed by DNA sequencing. These constructs were transiently transfected using Lipofectamine Plus (Invitrogen). IMPDHII and SHP1 siRNA SMARTpools ON-TARGETplus and the negative control siRNA Nontargeting Pool were obtained from Dharmacon (Logan, UT). Transient transfection of siRNA constructs was done using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol.

Western Blotting and Immunoprecipitation Assays—Cells (1.10⁶) stimulated or not with Pam2 or Pam3 were washed three times in PBS and then solubilized in a buffer containing 25 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 1 mM sodium vanadate, 1 mM DTT, protease inhibitors (Roche), and 1% Nonidet P-40. Protein extracts were solubilized for 5 min at 100 °C in Laemmli buffer (65 mM Tris, pH 6.8, 20% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue, and 2% SDS). Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Membranes were incubated in TBS-Tween (10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20) and 5% low-fat milk for 2 h to saturate nonspecific sites and then in specific antibody overnight at 4 °C. The membranes were then washed with TBS-Tween and incubated with secondary antibody for 1 h at room temperature. In some experiments, mouse TrueBlot (1:1,000, Cliniscience Laboratories, Montrouge, France) was used as the secondary antibody for enhanced chemiluminescence to avoid immunodetection of immunoglobulins. Proteins were revealed with a chemiluminescent kit according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences).

A Rac PBD (p21-binding domain) pulldown assay was realized as described (Benard, Bohl, Bokoch, 1999). Briefly, lysates (600 μ g) from HEK293-T2 cells incubated with MPA and stimulated with Pam3 were incubated with recombinant GST-PBD beads. Rac-GTP was observed by immunoblot with anti-Rac antibodies.

Protein extracts obtained from THP1 and HEK293-T2 cells were quantified with a BCA colorimetry assay (Pierce) using a SMARTSpec 3000 spectrometer (Bio-Rad). Regarding immunoprecipitation assays, cell lysates (300–500 μ g) were incubated at 4 °C with 3 μ g of primary antibodies for 2 h and then incubated with protein G-agarose beads (Roche). Immunopre-

IMPDHII Inhibits TLR2 Signaling

cell cultures were washed three times with lysis buffer and then incubated with Laemmli buffer at 95 °C for 10 min.

Immunofluorescence Staining and Confocal Microscopy—293-TLR2 cells (12.10^3 /ml) were plated in their culture medium on glass coverslips (BD Biocoat; Bedford, MA) and incubated at 37 °C for 1 day. Cells were transfected with an Akt-PH construct and then starved for 20–24 h before the experiment in basal culture medium. For IMPDHII inhibition experiments, 293-TLR2 cells were co-transfected with pCMV6-IMPDHII or preincubated for 120 min with MPA (10 μ M) before the TLR2 agonist Pam3 was added. Cells were then washed in PBS, fixed with 4% paraformaldehyde, and washed with 0.1 M glycine.

THP1-CD14 cells (1×10^6) were seeded on 6-well dishes and starved for 20 h before stimulation with Pam3. Cells were then washed in PBS, fixed with 4% paraformaldehyde and then washed with 0.1 M glycine. Cells were then permeabilized with PBS, 1% BSA containing 0.05% saponin for 20 min and labeled with anti-TLR2 and anti-SHP1 antibodies for 1 h at room temperature. Cells were subsequently incubated with Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 594 anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies for 30 min. Cells were washed with PBS and mounted on slides. All images were obtained using a confocal Leica DMIRE2 microscope and analyzed using ImageJ 1.40 software.

Assay of Kinase and Phosphatase Activities—PI3K activity was assayed with a PI3K ELISA kit (Echelon Biosciences, Salt Lake City, UT) according to manufacturer's instructions. In brief, cell lysates were prepared, and PI3K was immunoprecipitated with antibody against the p85 α subunit and incubated with phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PI(4,5)P₂). The reaction products were incubated with a PI(3,4,5)P₃ detector protein and then added to a PI(3,4,5)P₃-coated microplate for competitive binding. A peroxidase-linked secondary detection reagent and colorimetric detection were used to detect PI(3,4,5)P₃ detector protein binding to the plate. The colorimetric signal was inversely proportional to the amount of PI(3,4,5)P₃ produced by PI3K activity.

SHP1 activity was assayed as described (23). THP1 cells (15×10^6) were starved for 20 h and incubated or not with MPA before stimulation with Pam3. Cells were lysed in a lysis buffer without any phosphatase inhibitors. Proteins (800 μ g) were immunoprecipitated with 3 μ g of anti-SHP1 mouse monoclonal antibody and incubated for 2 h with agarose beads. Immunoprecipitates were washed twice with lysis buffer and then twice with a phosphatase buffer (50 mM HEPES, pH 5.0, 6.25 mM EDTA, and 12.5 mM dithiothreitol). The reaction was initiated by the addition of 25 mM *para*-nitrophenyl phosphate for 30 min at 30 °C. The reaction was stopped by the addition of 0.6 ml of 1 N NaOH, and sample absorbances were measured at 410 nm.

Measurement of Cytokine Production—The IMPDHII activity of THP1 and HEK293-T2 cells (10^6 /ml) was inhibited by MPA or siRNA, and cells were stimulated by Pam3. Concentrations of TNF α in culture supernatants were determined by ELISA according to the manufacturer's protocol (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Statistical Analysis—Continuous variables were represented as means \pm S.D. Statistical comparisons were assessed using the Student's *t* test (for comparison between two groups) or one-way analysis of variance with Tukey's post hoc test (for multiple groups). *p* values < 0.05 indicated statistically significant differences.

RESULTS

IMPDHII Is Recruited to Lipid Rafts following TLR2 Stimulation and Subjected to Post-translational Modifications—Synthetic lipopeptides Pam2 and Pam3 initiate effective immune response after specific recognition by TLR2/6 and TLR2/1, respectively, by inducing the formation of a signaling cluster within lipid rafts (4, 7). To characterize the molecular composition of the signaling cluster following TLR2 stimulation, we used a proteomic approach to identify proteins recruited to or excluded from lipid rafts 5 min after stimulation of TLR2 with Pam3 or Pam2. Rafts were isolated from THP1 cells; the proteome of the lipid rafts was compared between TLR2-stimulated and control cells. Among the spots revealed by two-dimensional DIGE analysis as differentially expressed following Pam2 or Pam3 stimulation, IMPDHII was found theoretically to interact with the NF- κ B canonical pathway in an Ingenuity analysis (data not shown). The levels of IMPDHII in lipid rafts of THP1 cells increased 1.7-fold after stimulation of TLR2/TLR1 or TLR2/TLR6 with Pam3 or Pam2 (Fig. 1A). To confirm the recruitment of IMPDHII to lipid rafts, we performed an immunoblot on THP1 lipid rafts obtained from the solubilization of low density fractions (2–3 and 4) in a sucrose gradient (Fig. 1B, upper panel). IMPDHII levels in the lipid rafts fraction increased significantly 5 min after stimulation of THP1 cells with Pam2 or Pam3 and remained high for up to 30 min (Fig. 1B, lower panel). Two-dimensional gel analysis facilitates the identification of post-translational modifications.

To determine whether IMPDHII was subjected to post-translational modifications within lipid rafts following TLR2 stimulation, we used a polyclonal anti-IMPDHII antibody to perform an immunoblot after two-dimensional separation of lipid raft proteins isolated from THP1 stimulated with Pam3. As shown in Fig. 1C, TLR2 stimulation induced a change in the isoelectrophoretic mobility of IMPDHII, suggesting that post-translational modifications of this protein are associated with its recruitment in lipid rafts. As phosphorylation results in changes to the isoelectric profile of proteins and because IMPDHII contains serine and tyrosine phosphorylation sites, we investigated whether IMPDHII is phosphorylated upon TLR2 stimulation. In-gel staining with a ProQ Diamond dye specific for phosphorylated proteins revealed spots that showed a significant increase in their phosphorylated forms following TLR2 stimulation with Pam2 and Pam3. Mass spectrometry analysis enabled us to identify IMPDHII as one of the proteins that undergoes phosphorylation after TLR2 stimulation (Fig. 1D, upper panel). To determine the nature of these phosphorylations, we performed immunoprecipitation of protein extracts with an anti-IMPDHII antibody and submitted the immunoprecipitates to immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibodies. As shown in Fig. 1E, stimulation of THP1 cells with TLR2 agonists induced tyrosine-phosphorylation of IMPDHII.

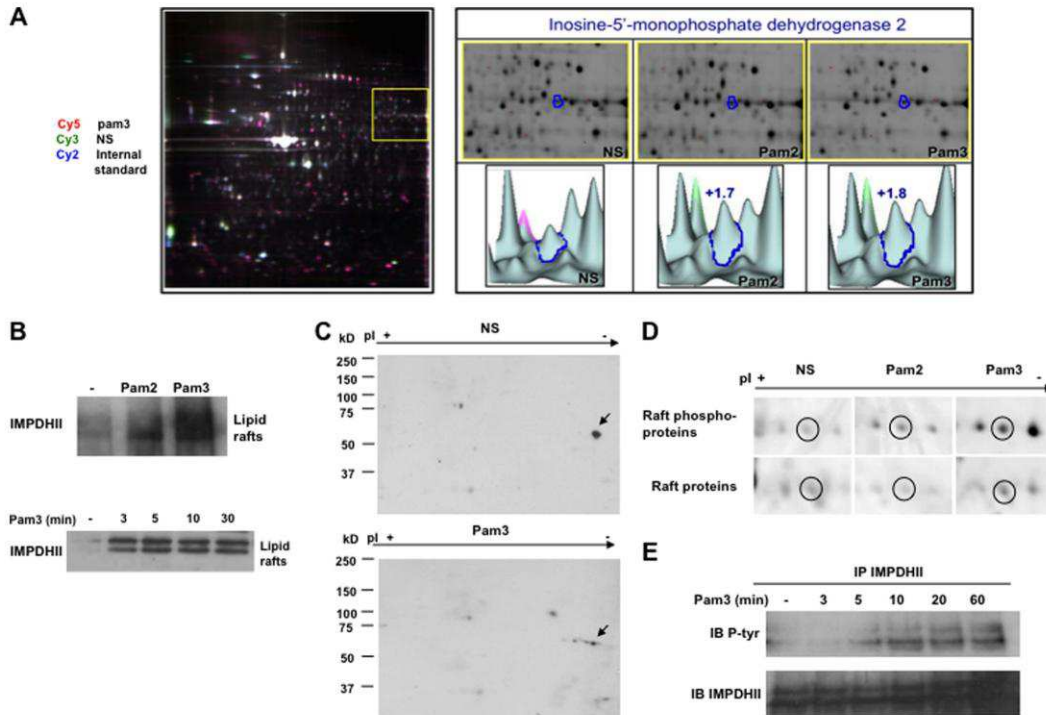


FIGURE 1. IMPDHII is recruited to lipid rafts following TLR2 stimulation and is subjected to post-translational modifications. *A*, left panel, image of one gel selected from the 12 gels realized for two-dimensional DIGE analysis. This gel contains lipid rafts proteins prior to (Cy3, green) and following a 5-min stimulation with Pam3 (Cy5, red). Cy2 is an internal standard and corresponds to a 1:1 ratio of unlabeled proteins from both groups. Right panel, DeCyder relieve presentation of the identified IMPDHII spot volume in control, Pam2-, and Pam3-stimulated THP1 cells. Gels were analyzed by DeCyder software, and statistics were generated for up-regulated and down-regulated proteins such as IMPDHII. *B*, confirmation of two-dimensional DIGE findings by immunoblotting. THP1 cells were stimulated with Pam2 or Pam3 (100 ng/ml) and lysed with 1% Triton X-100. Lipid rafts were isolated by ultracentrifugation (fractions 2–4), and lipid raft proteins were subjected to SDS-PAGE. IMPDHII was revealed by immunoblot in lipid rafts. *C*, lipid rafts were isolated from THP1 cells stimulated with Pam3 (100 ng/ml) for 5 min and subjected to two-dimensional electrophoresis. Two-dimensional gels were then transferred onto nitrocellulose membranes and subjected to immunoblot with anti-IMPDHII antibodies. *D* and *E*, phosphorylation changes following stimulation of TLR2 by lipopeptides. *D*, lipid raft phosphoprotein profiles of nonstimulated and stimulated (Pam3, 5 min) THP1 were viewed on a two-dimensional gel using in-gel staining with ProQ Diamond. Total protein stain of lipid rafts was performed with SYPRO Ruby. Here is a “zoom” view of a two-dimensional gel, centered on one spot identified by MALDI-TOF as IMPDHII (circles). *E*, THP1 cells were stimulated with Pam3, and cell lysates were immunoprecipitated with 3 μg of IMPDHII monoclonal antibodies. Tyrosine-phosphorylated proteins were then visualized by immunoblot with anti-phosphotyrosine antibodies (4G10 clone). *IB*, immunoblot; *NS*, nonstimulated.

Downloaded from www.jbc.org at INSERM, on August 18, 2011

IMPDHII Inhibits NF-κB Activity following TLR2 Stimulation—Stimulation of TLR2 initiates a cascade of signaling events that leads to activation of NF-κB. To investigate whether IMPDHII plays a role in the TLR2-dependent activation of innate immune responses, we used a gene reporter assay to measure NF-κB activity in HEK293-T2 stimulated with Pam2 or Pam3 in the presence or absence of MPA, the chemically noncompetitive inhibitor of IMPDHII. Stimulation with either Pam2 or Pam3 resulted in a 3–4-fold increase in NF-κB activity (Fig. 2*A*). Inhibition of IMPDHII with MPA further increased NF-κB activity in a significant and dose-dependent manner in the stimulated cells (Fig. 2, *A* and *B*), indicating that IMPDHII negatively regulates NF-κB activity under physiological conditions. The addition of guanosine in the cell media before stimulation reversed the potentiating effect of MPA on NF-κB activity. To confirm that IMPDHII negatively regulates NF-κB

activity, we transfected HEK293-T2 with a siRNA targeting IMPDHII. As shown in Fig. 2*C*, extinction of IMPDHII significantly increased TLR2-mediated NF-κB activity. Conversely, overexpression of IMPDHII inhibited NF-κB activity following TLR2 stimulation and reversed the effects of MPA (Fig. 2*D*).

NF-κB activation following stimulation of TLR2 leads to the synthesis of proinflammatory cytokines such as TNFα (2, 24). To determine whether inhibition IMPDHII modifies cytokine expression, we measured the amounts of TNFα excreted by THP1 or HEK293-T2 cells following Pam2 and Pam3 stimulation. THP1 cells incubated with MPA and HEK293-T2 transfected with 16 ng/ml siRNA specific for IMPDHII were compared with control cells. As shown under control conditions, the stimulation of THP1 and HEK293-T2 by Pam2 and Pam3 induced a significant increase in TNFα excretion (Fig. 2, *E* and *F*). Inhibition of IMPDHII by either MPA or IMPDHII-specific

IMPDHII Inhibits TLR2 Signaling

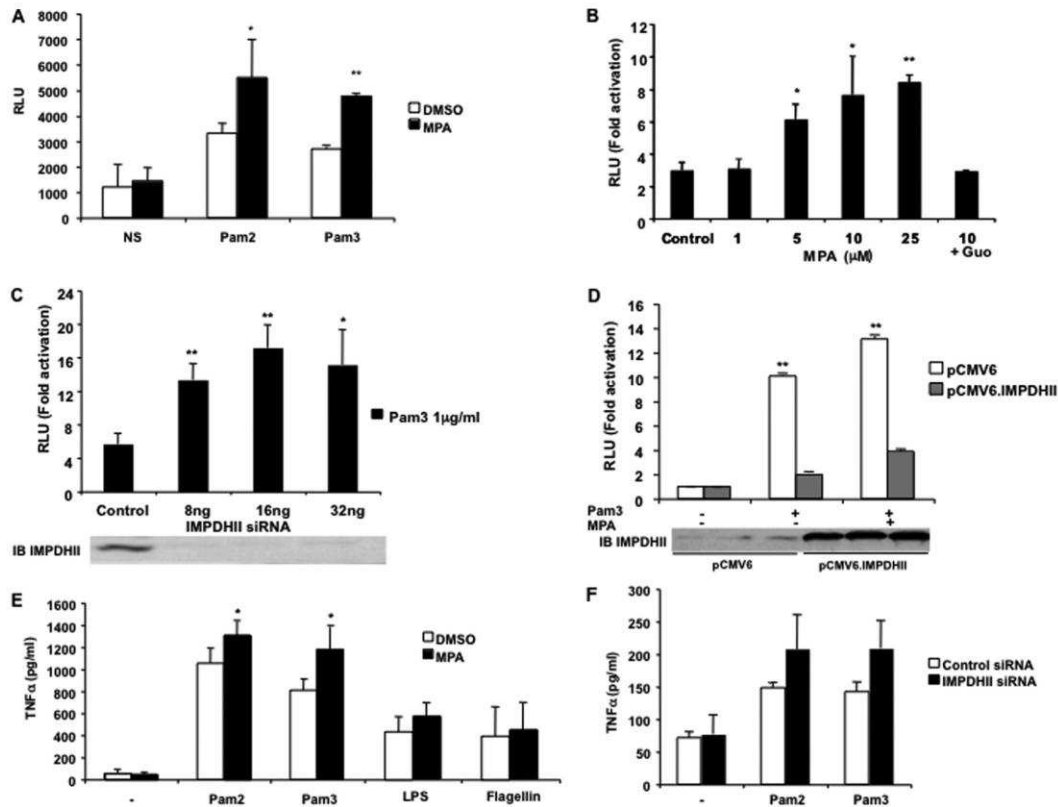


FIGURE 2. IMPDH II inhibits NF- κ B activation following TLR2 stimulation. A–D, *in vitro* NF- κ B-driven luciferase activity in HEK293-T2 cultures after stimulation for 6 h with Pam2 (200 ng/ml) or Pam3 (1 μ g/ml). HEK293-T2 cells were co-transfected with 5 \times κ B-luciferase promoter gene plasmid (40 ng/ml) and β -galactosidase expression vector (40 ng/ml). Cells were stimulated with either Pam2 or Pam3 for 6 h following a 2-h incubation with 10 μ M MPA (A) or various concentrations of MPA (B). NS, nonstimulated; Guo, guanosine (50 μ M) added to the cell media 2 h before stimulation. HEK293-T2 cells were stimulated with Pam3 (1 μ g/ml) following a 24-h transfection with various concentrations of siRNA targeting IMPDHII (C) or with pCMV6.IMPDHII expression vector (250 ng/ml) (D). IMPDHII expression was quantified by immunoblot (IB) using anti-IMPDHII antibody. Control conditions correspond to DMSO, non-interfering scramble siRNAs, or empty pCMV6 vector. NF- κ B luciferase activity was rationalized upon β -galactosidase expression. Results are expressed as arbitrary units (RLU, relative luciferase units) corresponding to “fold activation.” Data are the means \pm S.D. representative of three independent experiments. E and F, TNF α secretion following TLR stimulation. THP1 cells were incubated with MPA (10 μ M) and stimulated with TLR2, TLR4, or TLR5 agonists (E). TNF α concentrations were measured by ELISA in the supernatants of cells incubated with 10 μ M MPA or DMSO following a 24-h stimulation with Pam2 (200 ng/ml), Pam3 (1 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), or flagellin (5 μ g/ml). HEK293-T2 cells were transfected with IMPDHII siRNA or nontargeting scrambled siRNA (16 ng/ml) for 36 h and then were stimulated with Pam2 (200 ng/ml) or Pam3 (1 μ g/ml) for 24 h (F). TNF α concentrations were measured in cell supernatants. Control conditions correspond to DMSO or non-interfering scramble siRNAs. Data are the means \pm S.D. representative of three independent experiments. Group comparisons were assessed using Student’s *t* test or analysis of variance with post hoc test. *, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01; control versus each treated group (HEK293-T2 treated with MPA, siRNA targeting IMPDHII, or pCMV6.IMPDHII expression vector).

siRNA increased TNF α excretion in the media regardless of the agonist used. We also evaluated the effect of IMPDHII inhibition on TLR4- and TLR5-mediated release of TNF α . In THP1 cells stimulated with LPS or flagellin, the inhibition of IMPDHII by MPA did not increase the levels of TNF α in the culture media (Fig. 2E), suggesting that IMPDHII is a TLR2-specific negative regulator of NF- κ B activity.

In addition to activation of NF- κ B, stimulation of TLR2 initiates the signaling events that lead to the activation of MAP kinases (2). Investigating the role of IMPDHII in MAP kinase activation after stimulation of TLR2, we used immunoblotting to study the phosphorylation of Erk, Jnk, and p38 in

HEK293-T2 and THP1 cells stimulated by Pam3 (Fig. 3A). Whereas stimulation of TLR2 induced phosphorylation of MAP kinases, IMPDHII inhibition by MPA or siRNA did not modify MAP kinase activation, suggesting that IMPDHII does not play any role in the TLR2-dependent activation of this pathway. Altogether, these data suggest that IMPDHII acts as a negative regulator of TLR2-stimulated NF- κ B activity.

IMPDHII Inhibits Phosphorylation of p65—Stimulation of TLR2 activates a MyD88-dependent signaling pathway that results in the nuclear translocation of NF- κ B subunits after phosphorylation degradation of I κ B. To test whether IMPDHII interfere with this MyD88-dependent pathway, we analyzed the

Downloaded from www.jbc.org at INSERM, on August 18, 2011

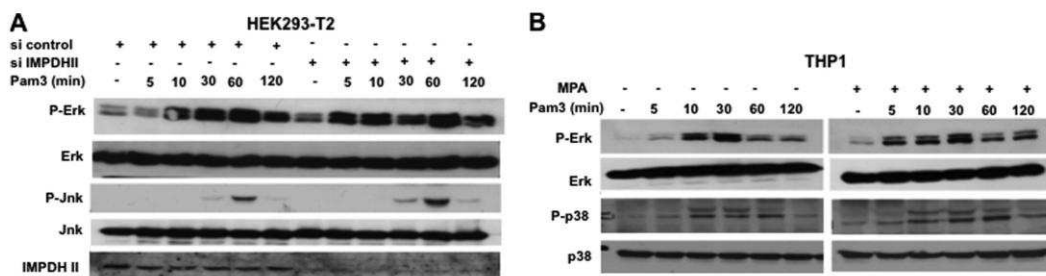


FIGURE 3. IMPDHII does not interfere with MAP kinase activation pathways. *A*, HEK293-T2 were transfected with IMPDHII siRNA (16 ng/ml) for 36 h and stimulated with Pam3 (1 μ g/ml). Cell lysates were subjected to SDS-PAGE, and phosphorylation of Erk and Jnk was quantified by Western blot. *B*, THP1 were pretreated with MPA (10 μ M) for 2 h and stimulated with Pam3 at different time points. Phosphorylation of Erk and p38 were evaluated by Western blot with specific antibodies. Results are representative of two independent experiments.

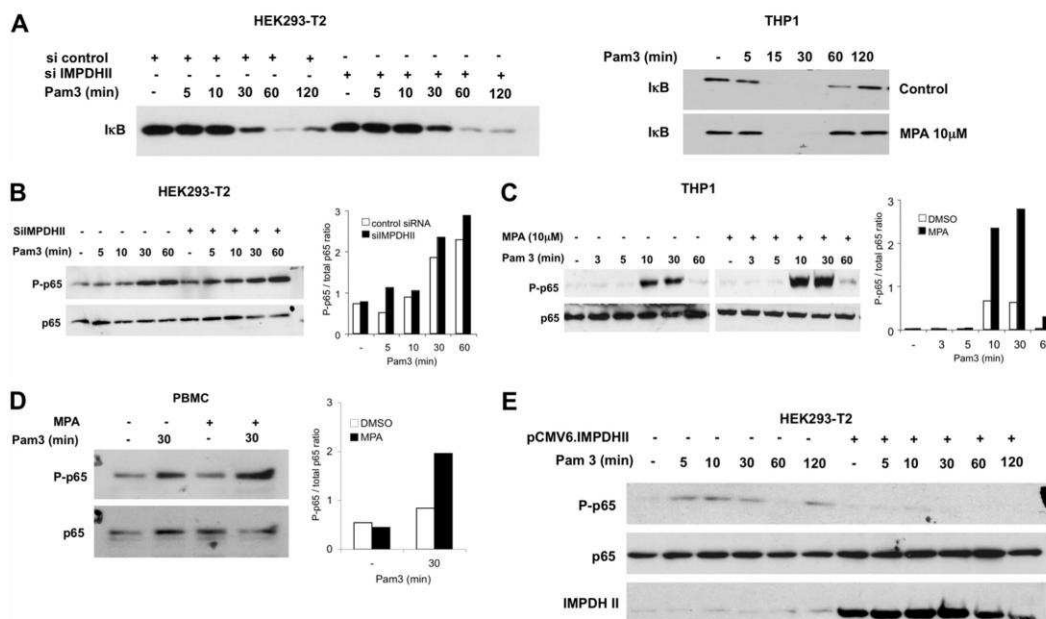


FIGURE 4. IMPDHII inhibits NF- κ B transactivation. *A*, quantification of I κ B expression by Western blot. *Left panel*, HEK293-T2 cells were transfected with siRNA targeting IMPDHII (16 ng/ml) for 36 h. Cells were then stimulated with Pam3 (1 μ g/ml), lysed, and subjected to SDS-PAGE. The kinetics of I κ B degradation following stimulation was observed by Western blot with anti-I κ B antibodies. *Right panel*, THP1 cells incubated or not with MPA (10 μ M) for 2 h were stimulated with Pam3 and lysed, and I κ B degradation was observed by Western blot. *B–E*, phosphorylation of the p65 subunit of NF- κ B. IMPDHII activity of HEK293-T2 cells (*B*) and THP1 monocyte cells (*C*) was inhibited using siRNA targeting IMPDHII (16 ng/ml) and MPA (10 μ M), respectively. Cells were stimulated with Pam3 (1 μ g/ml), lysed, and subjected to SDS-PAGE. Controls correspond to non-interfering scramble siRNAs or DMSO. The phosphorylated form of p65 (P-p65) and the expression of p65 were visualized by Western blot with anti-phospho-p65 (Ser-536) and p65 antibodies. *D*, PBMCs were incubated with MPA or DMSO for 2 h and then stimulated with Pam3, lysed, and subjected to SDS-PAGE. The phosphorylated forms of p65 and total p65 were visualized by Western blot. *E*, HEK293-T2 cells were transfected with pCMV6.IMPDHII (250 ng/ml) or pCMV6 empty vector (250 ng/ml) and stimulated with Pam3 (1 μ g/ml) 36 h after transfection. P-p65, p65, and IMPDHII expression were visualized by Western blot. Densitometry quantification of P-p65 was performed using ImageJ software and normalized with the densities of total p65 for each stimulated condition. Results are representative of three independent experiments.

patterns of I κ B degradation by immunoblot in HEK293-T2 and THP1 cells stimulated with Pam3. In both cell types, I κ B decreased following Pam3 stimulation (Fig. 4A). Neither transfection of siRNA targeting IMPDHII nor exposure to MPA modified the decrease of I κ B expression, suggesting that IMPDHII does not prevent I κ B degradation. As TLR2 stimulation activates a Rac1/PI3K-dependent pathway that is crucial to

transactivation of NF- κ B (9), we assessed the effect of IMPDHII inhibition on this pathway. We used immunoblotting to study the phosphorylation of p65 on serine 536 in Pam3-stimulated HEK293-T2 cells transfected with siRNA interfering with IMPDHII or control scrambled siRNA. In HEK293-T2 cells, the engagement of TLR2 induced phosphorylation of p65 between 10 and 60 min (Fig. 4B). Inhibition of IMPDHII expression with

Downloaded from www.jbc.org at INSERM, on August 18, 2011

IMPDHII Inhibits TLR2 Signaling

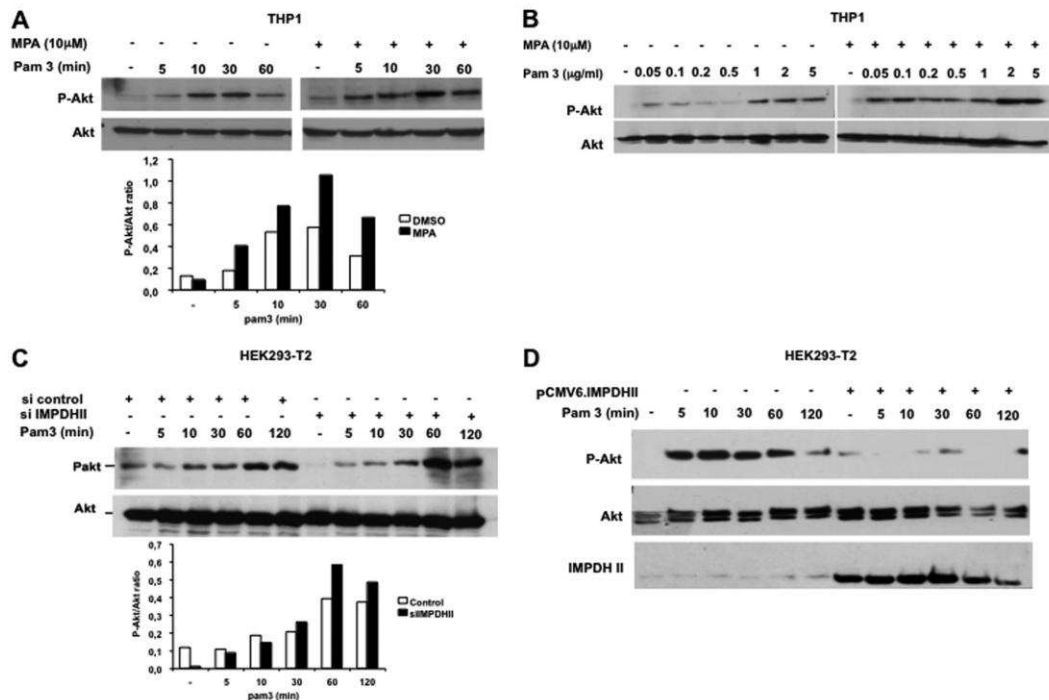


FIGURE 5. IMPDHII inhibits Akt activation following TLR2 stimulation. *A*, THP1 cells were incubated with MPA for 2 h and then stimulated with Pam3 (1 μ g/ml). Cells were lysed and subjected to SDS-PAGE. Phosphorylation of Akt (P-Akt) on serine 473 was evaluated by Western blot. Control conditions correspond to cells incubated with DMSO. Densitometry quantification of P-Akt was performed using ImageJ software and normalized with the densities of total Akt for each stimulated condition. *B*, dose dependence of Pam3-stimulated Akt activation (30 min) in THP1 cells pretreated for 2 h with MPA or DMSO. The phosphorylated form of Akt and total expression of Akt was evaluated by Western blot. *C*, HEK293-T2 cells were transfected with siRNA targeting IMPDHII (16 ng/ml) and then stimulated with Pam3 (1 μ g/ml) 36 h after transfection. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE, and P-Akt and total Akt were visualized by Western blot. Control conditions correspond to cells transfected with scrambled siRNA. Densitometry quantification of P-Akt was performed using ImageJ software and normalized with the densities of total Akt for each stimulated condition. *D*, HEK293-T2 cells were transfected with either IMPDHII expression vector (pCMV6-IMPDHII, 250 ng/ml) or empty vector (pCMV6, 250 ng/ml) and stimulated with Pam3 (1 μ g/ml). P-Akt amounts and IMPDHII expression were evaluated by Western blot. Results are representative of three independent experiments.

specific siRNA further increased the ratio between the phosphorylated forms and total expression of p65 following TLR2 stimulation. Similar results were observed in HEK293-T2 cells stimulated with Pam2 (data not shown). Phosphorylation of p65 was also increased in THP1 cells (Fig. 4C) and human PBMC (Fig. 4D) incubated previously with MPA. To confirm that IMPDHII interferes with the phosphorylation of p65, we transfected HEK293-T2 cells with pCMV6-IMPDHII and assessed the phosphorylation of p65 following TLR2 stimulation. Overexpression of IMPDHII in HEK293-T2 cells led to a significant decrease of p65 phosphorylation, as nearly undetectable levels of phosphorylation were observed after Pam3 exposure (Fig. 4E), suggesting that IMPDHII inhibits NF- κ B transactivation. Finally, inhibition of IMPDHII by MPA did not increase phosphorylation of p65 in THP1 cells stimulated with LPS (supplemental Fig. 3) or flagellin (data not shown), suggesting that the negative regulation mediated by IMPDHII is restricted to TLR2 signaling.

*IMPDHII Modulates PI3K Activation Upstream of Akt—*Transactivation of NF- κ B following TLR2 stimulation depends

upon Akt activation (9, 13). To test the effect of IMPDHII on TLR2-mediated Akt activation, we stimulated THP1 cells with Pam3 after incubation with the IMPDHII inhibitor MPA and studied the phosphorylation of Akt on serine 473 using immunoblotting. Whereas phosphorylation of Akt was observed 10 min after stimulation of THP1 cells under control conditions, phosphorylation occurred earlier and the intensity of Akt phosphorylation was stronger when IMPDHII was inhibited with 10 μ M MPA (Fig. 5A). The dose dependence of Pam3-stimulated Akt observed in control cells was much stronger in MPA-treated cells (Fig. 5B). Similar results were obtained in Pam3-stimulated HEK293-T2 cells in the presence of siRNA targeting IMPDHII (Fig. 5C). Furthermore, overexpression of IMPDHII in HEK293-T2 cells inhibited TLR2-mediated phosphorylation of Akt (Fig. 5D).

Following stimulation of TLR2, phosphorylation of Akt depends on the constitution of a molecular cluster involving TLR2, PI3K, and Rac. To determine whether IMPDHII is part of this activation cluster, we immunoprecipitated IMPDHII within HEK293-T2 whole cell lysates. Immunoblots revealed

Downloaded from www.jbc.org at INSERM, on August 18, 2011

IMPDHII Inhibits TLR2 Signaling

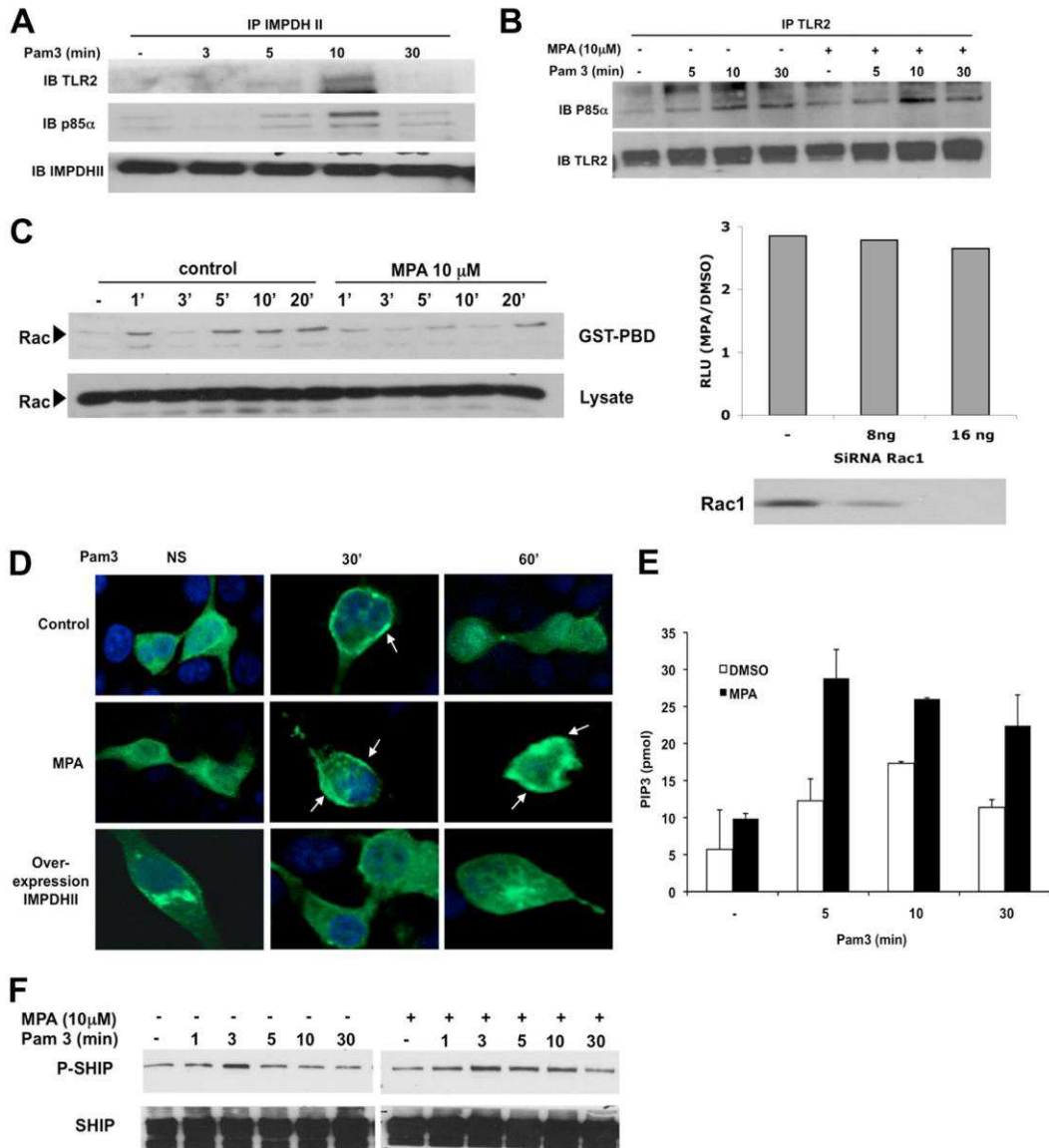


FIGURE 6. IMPDHII is recruited to the TLR2-dependent activation cluster and negatively regulates PI3K activity. *A*, HEK293-T2 cells were stimulated with Pam3 (1 μ g/ml). Cell lysates were immunoprecipitated (IP) with 3 μ g of IMPDHII antibodies, and TLR2, the p85 α subunit of PI3K, or immunoprecipitated IMPDHII was visualized by Western blot (*IB*). *B*, HEK293-T2 cells were incubated with MPA (10 μ M) for 2 h and stimulated with Pam3 (1 μ g/ml). Cell lysates were immunoprecipitated with 3 μ g of anti-TLR2 monoclonal antibody. The P85 α subunit of PI3K and immunoprecipitated TLR2 were revealed by Western blot. *C*, *left panel*, time-dependent activation of Rac was quantified by the presence of Rac-GTP detected by Rac PBD pulldown in HEK293-T2 treated with MPA or DMSO (control cells) and stimulated with Pam3. *Right panel*, HEK293-T2 cells were co-transfected with siRNA targeting Rac1 or non-interfering scramble siRNA and with 5 \times κ B-luciferase promoter gene plasmid (40 ng/ml) and β -galactosidase expression vector (40 ng/ml). Cells were then incubated or not with MPA for 2 h and stimulated with Pam3 for 6 h; NF- κ B-driven luciferase activity was measured and rationalized upon β -galactosidase expression. Results are expressed as arbitrary units corresponding to the MPA/DMSO ratio of NF- κ B activation. *D*, HEK293-T2 cells were transfected with a fusion protein combining GFP and the PH domain of Akt. Transfected cells were either co-transfected with IMPDHII expression vector or incubated with MPA (10 μ M). Cells were then stimulated with Pam3 (1 μ g/ml) and fixed with paraformaldehyde. Cell nuclei were stained with DAPI. Recruitment of the construct to the membrane was observed by confocal microscopy for each condition. *NS*, nonstimulated. *E*, THP1 cells were incubated with MPA (10 μ M) or DMSO for 2 h and then stimulated with Pam3 (1 μ g/ml).

IMPDHII Inhibits TLR2 Signaling

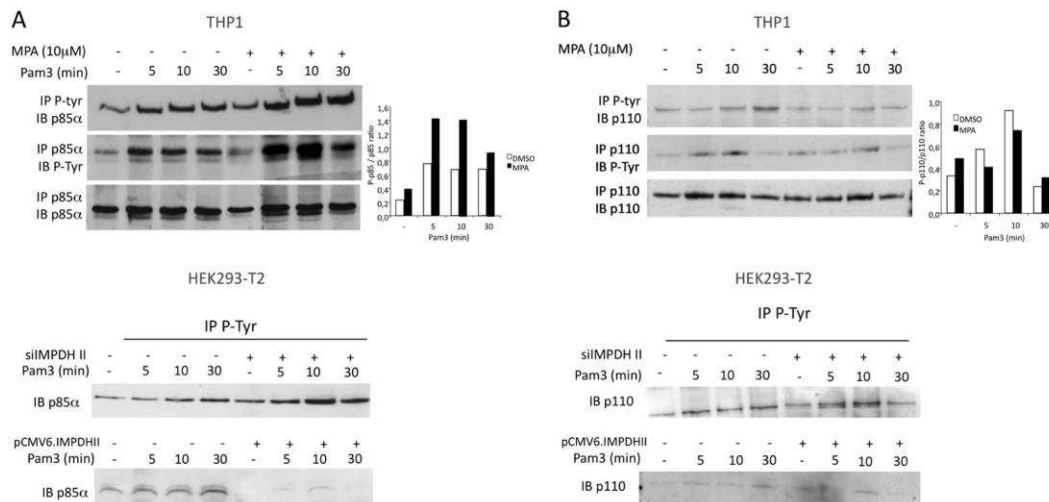


FIGURE 7. IMPDHII modulates tyrosine phosphorylation of p85α regulatory subunit of PI3K. *A, upper panel*, THP1 monocyte cells were incubated or not with MPA for 2 h and stimulated with Pam3. Lysates were immunoprecipitated (IP) with either 3 μg of anti-phosphotyrosine (P-Tyr, 4G10 clone) or anti-p85α antibodies, and precipitates were then immunoblotted with p85α or P-Tyr antibodies. Densitometry quantification of the phosphorylated form of p85α was performed using ImageJ software and normalized with the densities of precipitated p85α for each condition. *Lower panel*, HEK293-T2 cells were transfected either with siRNA targeting IMPDHII or with IMPDHII expression vector. Control conditions correspond to non-interfering scramble siRNAs and empty pCMV6 vector, respectively. Cells were then stimulated with Pam3, lysed, and immunoprecipitated with 3 μg of anti-phosphotyrosine antibodies (4G10 clone) or p110 antibodies, and precipitates were then immunoblotted with anti-p110 or anti-4G10 antibodies. Densitometry quantification of the phosphorylated form of p110 was performed using ImageJ software and normalized with the densities of precipitated p110 for each stimulated condition. *B, upper panel*, THP1 lysates were immunoprecipitated with 3 μg of either P-tyrosine (4G10 clone) or p110 antibodies, and precipitates were then immunoblotted with anti-p110 or anti-4G10 antibodies. Densitometry quantification of the phosphorylated form of p110 was performed using ImageJ software and normalized with the densities of precipitated p110 for each stimulated condition. *Lower panel*, HEK293-T2 cells were transfected either with siRNA targeting IMPDHII or with IMPDHII expression vector. Control conditions correspond to non-interfering scramble siRNAs and empty pCMV6 vector, respectively. Cells were then stimulated with Pam3, lysed, and immunoprecipitated with 3 μg of anti-phosphotyrosine antibodies (4G10 clone). The p110 catalytic subunit of PI3K was revealed by Western blot. Results are representative of three independent experiments.

TLR2 and the p85α regulatory subunit of PI3K, confirming that IMPDHII was transiently recruited to the TLR2-dependent activation cluster after 10 min (Fig. 6A). We then tested whether inhibition of IMPDHII would alter the interaction between the p85α subunit of PI3K and TLR2. As shown in Fig. 6B, preincubation with MPA does not modify the interaction between the two molecules, suggesting that IMPDHII does not control the recruitment of PI3K to the activation cluster (Fig. 6B). We then tested whether Rac was activated after Pam3 stimulation using pull-down experiments. As expected, we observed an early activation of Rac1 after stimulation of TLR2. This activation decreased in HEK293-T2 cells incubated with MPA (Fig. 6C, *left panel*) or siIMPDHII (data not shown). The hyperactivation of NF-κB in MPA-treated cells persisted despite the absence of Rac1 (Fig. 6C, *right panel*).

As phosphorylation of Akt requires activation of PI3K and the formation of phosphatidylinositol 3-phosphate (PIP₃), we used confocal microscopy to investigate the role of IMPDHII on PI3K activity through the recruitment of Akt to membrane-bound PIP₃. We transfected HEK293-T2 cells with a construct encoding a fusion protein between the PH domains of Akt and

GFP and studied the translocation of Akt to the plasma membrane after stimulation with Pam3. In control cells, Pam3 induced a transient translocation of the fluorescent probe to the plasma membrane 30 min after stimulation (Fig. 6D). The inhibition of IMPDHII activity with MPA resulted in a sustained recruitment of Akt to PIP₃, whereas overexpression of IMPDHII prevented the recruitment of Akt to the cell membrane, suggesting that IMPDHII negatively regulates PI3K activity (Fig. 6D). To confirm the effect of IMPDHII on PI3K activity, we used a PI3K activity assay to measure the formation of PIP₃ in Pam3-stimulated THP1 cells in the absence or presence of MPA. Whereas stimulation with Pam3 induced TLR2-dependent PI3K activity after 5 min, the formation of PIP₃ was significantly increased in MPA-treated cells at all time points (Fig. 6E). Similar results were observed in THP1 cells stimulated with Pam2 (Data not shown). As the levels of PIP₃ also depend upon its conversion to phosphatidylinositol 2-phosphate (PIP₂) by SHIP-1 (SH2-containing inositol 5-phosphatase 1) (12), we studied the phosphorylation profile of the tyrosine 1020 of SHIP-1 using immunoblotting to investigate the activity of SHIP-1 (12, 25, 26). Under control conditions, phosphorylation of SHIP-1 increased after

PI3K was then immunoprecipitated with antibody against the p85α subunit and incubated with PI(4,5)P₂. The reaction products were incubated with a PI(3,4,5)P₃ detector protein and then added to a PI(3,4,5)P₃-coated microplate for competitive binding. A peroxidase-linked secondary detection reagent and colorimetric detection buffer were used to detect PI(3,4,5)P₃ detector protein binding to the plate. The amount of PI(3,4,5)P₃ produced by PI3K activity was inversely proportional to the colorimetric signal. Data are the means ± S.D. representative of three independent experiments. *F*, THP1 cells were incubated with MPA (10 μM) and stimulated with Pam3 (1 μg/ml). Immunoblot was assessed on lysates to evaluate the phosphorylation of SHIP-1 on Tyr-1020, reflecting its activation state. Results are representative of two independent experiments.

Downloaded from www.jbc.org at INSERM, on August 18, 2011

IMPDHII Inhibits TLR2 Signaling

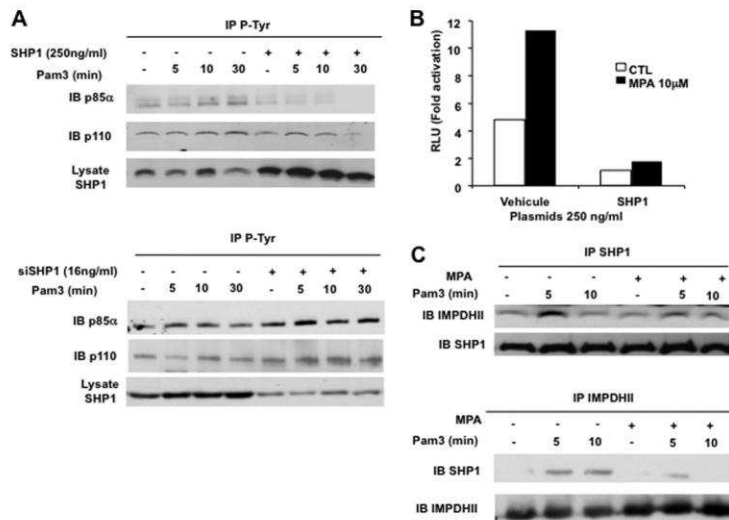


FIGURE 8. IMPDHII interacts with SHP1, which negatively regulates TLR2-mediated phosphorylation of PI3K. A, HEK293-T2 cells were transfected with SHP1 expression vector (250 ng/ml) (upper panel) or siRNA targeting SHP1 (16 ng/ml) (lower panel) and stimulated with Pam3 (1 μ g/ml). Cells were then stimulated with Pam3 and immunoprecipitated with anti-phosphotyrosine antibodies (4G10 clone) (IP). The P85 α and p110 subunits of PI3K were visualized by Western blot (IB). B, HEK293-T2 cells were co-transfected with SHP1 expression vector (250 ng/ml), 5 \times κ B-luciferase promoter gene plasmid (40 ng/ml), and β -galactosidase expression vector (40 ng/ml). Cells were then incubated or not with MPA for 2 h and stimulated with Pam3 for 6 h; NF- κ B-driven luciferase activity was measured and rationalized upon β -galactosidase expression. Results are expressed as arbitrary units (RLU, relative luciferase units) corresponding to "fold activation." C, THP1 cells were exposed to MPA (10 μ M) or DMSO for 2 h. Cells were then stimulated with Pam3 (1 μ g/ml) and immunoprecipitated with 3 μ g of anti-SHP1 or anti-IMPDHII antibodies. IMPDHII and SHP1 were detected by Western blot. Results are representative of three independent experiments.

3 min and then gradually decreased to return to baseline after 30 min (Fig. 6F). The chemical inhibition of IMPDHII by MPA did not change the SHIP-1 phosphorylation profile, suggesting that IMPDHII does not regulate the conversion of PIP₃ to PIP₂. Finally, to confirm that IMPDHII regulates TLR2-mediated NF- κ B activation through the PI3K pathway, we tested whether inhibition of IMPDHII still had an impact on NF- κ B activity in PI3K inhibited cells. Inhibition of PI3K activity by the chemical inhibitor LY294002 or by overexpression of Dp85N, a negative form of the p85 subunit, reversed the effect of MPA on TLR2-mediated NF- κ B activity (supplemental Fig. 1). Furthermore, the increased phosphorylation of Akt observed in MPA-treated cells was reversed by the addition of LY294002 in cell media.

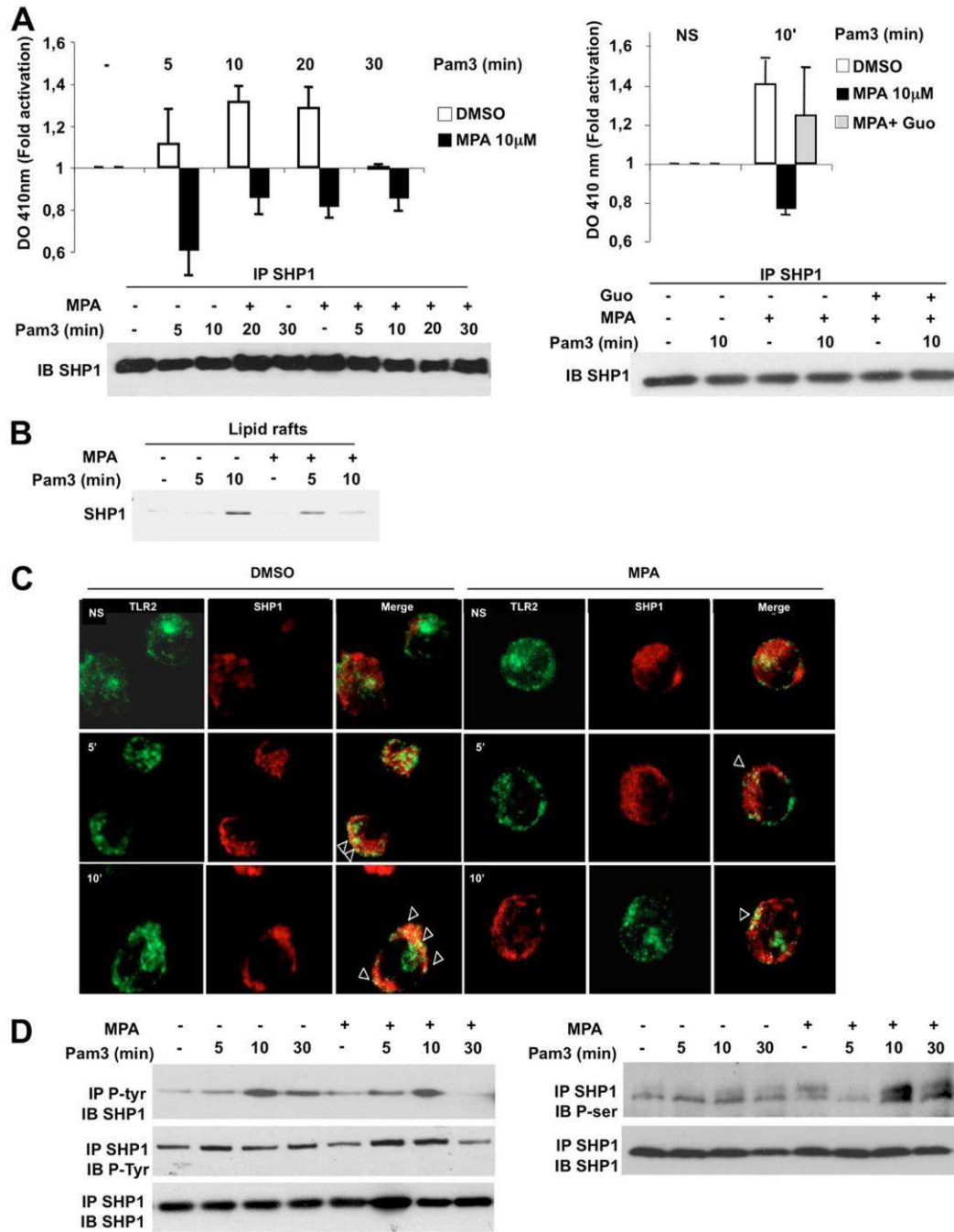
IMPDHII Inhibits Tyrosine Phosphorylation of PI3K p85 α Subunit via Phosphatase SHP1—As several reports indicate that PI3K activity depends on its phosphorylation on tyrosine (27–29), we performed immunoprecipitation studies to test whether IMPDHII regulates PI3K activation through changes in the phosphorylation pattern of its subunits. In cell extracts of THP1 or HEK293-T2 cells stimulated with Pam3, we observed phosphorylation of p85 α after 5 min. Phosphorylation was increased by IMPDHII inhibition in THP1 (Fig. 7A, left panel). Overexpression of IMPDHII in HEK293-T2 cells was associated with a significant decrease in tyrosine phosphorylation of p85 α (Fig. 7A). In contrast, inhibition of IMPDHII did not significantly alter the phosphorylation pattern of the p110 catalytic subunit (Fig. 7B). These data suggest that IMPDHII inhibits PI3K activation through the regulation of p85 α tyrosine phosphorylation.

Several reports indicate that SHP1 regulates the phosphorylation of p85 α (27, 29). We first confirmed that SHP1 regulates phosphorylation of p85 α by comparing the patterns of p85 α phosphorylation in HEK293-T2 cells transfected with wild type SHP1 or with empty vector. As shown in Fig. 8A (upper panel), overexpression of SHP1 significantly reduced tyrosine phosphorylation of p85 α following TLR2 stimulation. In contrast, silencing SHP1 in HEK293-T2 cells increased the intensity of p85 α , Akt, and p65 phosphorylation (Fig. 8A, lower panel, and supplemental Fig. 2). These data confirm that the phosphatase SHP1 is a negative regulator of PI3K-dependent activation of NF- κ B downstream of TLR2. To test whether IMPDHII interferes with SHP1-dependent regulation of NF- κ B activity, we measured NF- κ B activity in HEK293-T2 cells transfected with pJ3.SHP1 and treated with DMSO or MPA. Whereas MPA significantly increased NF- κ B activity in DMSO-treated cells, overexpression of SHP1 decreased NF- κ B activity following stimulation with Pam3 (Fig. 8B). Moreover, the increase in NF- κ B activity induced by pharmacologic inhibition of IMPDHII was totally abolished in HEK293-T2 transfected by pJ3.SHP1. These data suggest that IMPDHII interacts with the TLR2 signaling pathway upstream of or at the level of SHP1. We then tested whether IMPDHII interacted with SHP1. THP1 cells incubated with DMSO or MPA were stimulated with Pam3, and cell extracts were immunoprecipitated with anti-SHP1 or anti-IPMDHII. Immunoblotting with anti-IMPDHII or anti-SHP1 antibodies revealed an interaction between SHP1 and IMPDHII between 5 and 10 min after TLR2 stimulation (Fig. 8C). Inhibition of IMPDHII by MPA did not significantly affect the physical

Downloaded from www.jbc.org at INSERM, on August 18, 2011

IMPDHII : inhibiteur de la voie NF-κB en aval de TLR2

IMPDHII Inhibits TLR2 Signaling



Downloaded from www.jbc.org at INSERM, on August 18, 2011

interaction between IMPDHII and SHP1. Similar results were obtained in HEK293-T2 cells (data not shown).

To further examine the interaction between IMPDHII and SHP1 upon engagement of TLR2, we examined the impact of IMPDHII inhibition on SHP1 activity. We immunoprecipitated SHP1 from Pam3-stimulated THP1 cells treated with MPA or MPA and guanosine. Then, after incubation of immunoprecipitates with a chromogenic substrate of SHP1, phosphatase activity was assessed quantitatively by measuring the absorbance ($A_{410\text{ nm}}$), and activation was evaluated as the ratio between stimulated and unstimulated SHP1 activity. As shown in Fig. 9A, equal amounts of SHP1 were immunoprecipitated under each condition. Stimulation with Pam3 induced maximal activation of SHP1 after 10 min in control conditions. In contrast, inhibition of IMPDHII with MPA dramatically decreased SHP1 activity (Fig. 9A, left panel). The addition of guanosine in the cell media before stimulation reversed the inhibitory effect of MPA on SHP1 activity (Fig. 9A, right panel). Similar results were observed in THP1 cells stimulated with Pam2 (data not shown). These data suggest that IMPDHII contributes to the activation of SHP1 following TLR2 engagement. The activity of SHP1 depends upon the conformational changes induced by its recruitment to the ITIM domains of membranous interacting molecules. To check whether IMPDHII activates SHP1 through its recruitment within the TLR2 activation cluster, we performed immunoblotting of protein extracts from TLR2-stimulated THP1 cells treated with DMSO or MPA. As shown in Fig. 9B, SHP1 was recruited to lipid rafts following TLR2 stimulation independently of IMPDHII activity. We then tested whether IMPDHII activity controls the interaction between SHP1 and TLR2 within its activation cluster. Whereas confocal microscopy studies revealed that SHP1 and TLR2 had a distinct localization in resting cells (Fig. 9C), stimulation with Pam3 induced colocalization of these two proteins in the cell membrane. Inhibition of IMPDHII by MPA did not prevent this interaction, suggesting that the activation of SHP1 by IMPDHII requires post-translational modifications in addition to its recruitment within the TLR2 activation cluster. Activity of SHP1 depends upon its phosphorylation status (30). Phosphorylation of tyrosine residues in the C-terminal tail of the phosphatase conveys its activation, whereas phosphorylation of serine 591 is associated with decreased activity of SHP1 (31, 32). We performed immunoprecipitation studies to investigate tyrosine and serine phosphorylation profiles after TLR2 stimulation (Fig. 9D). Whereas phosphorylation of tyrosine residues was not influenced by inhibition of IMPDHII activity, incuba-

tion of THP1 cells with MPA significantly increased phosphorylation of serine residues. These data are consistent with decreased SHP1 activity following inhibition of IMPDHII.

DISCUSSION

Using a proteomics approach to find novel partners in TLR2-dependent signaling pathways, we have identified IMPDHII as an important negative regulator of NF- κ B activation. The regulation of NF- κ B activity downstream of TLRs is a very complex process that controls the balance between an appropriate immune response to combat infection or a dysregulated pathological inflammation that leads to tissue damage and organ failure. In recent years, positive or negative regulators of NF- κ B activity have been identified at almost every step of the TLR-signaling pathways (14). Recent evidence indicates that lipid rafts play a pivotal role in the fine regulation of the innate immune response through various mechanisms including the recruitment or exclusion of signaling molecules (7, 33, 34). In contrast to a preconceived hypothesis, our proteomics strategy provided an unbiased differential analysis of proteins recruited in lipid rafts following TLR2 engagement, allowing for a systematic characterization of previously unidentified proteins. We report for the first time that IMPDHII is recruited to a TLR2-dependent membrane activation cluster within the lipid rafts after stimulation with lipopeptides. IMPDHII decreases NF- κ B activation through increased SHP1 activity and subsequent dephosphorylation of the p85 α subunit of PI3K, supporting the role of IMPDHII as a negative regulator of the PI3K/Akt-dependent pathway of NF- κ B transactivation.

IMPDHII is a key enzyme of the *de novo* guanosine synthesis through the NAD-dependent conversion of inosine monophosphate (IMP) to xanthosine monophosphate (35, 36). In mammals, the two isoforms (type I and type II) of IMPDH are present as homotetramers (37). In contrast to IMPDH, which display ubiquitous expression, IMPDHII expression is restricted to hematopoietic stem cells. IMPDHII is essential for B- and T-cell proliferation (38, 39) and is hence targeted by immunosuppressive therapies such as mycophenolic acid (19). The role of IMPDHII in innate immune cells has been much less studied. It has been suggested previously that IMPDHII contributes to the production of TNF α and nitric oxide following macrophage stimulation with LPS and interferon- γ through a guanosine-dependent mechanism (40). Paradoxically, noninfectious acute inflammatory syndromes with increased polymorphonuclear leukocyte activation have been reported in patients treated with mycophenolate mofetil, the pro-drug of

FIGURE 9. IMPDHII regulates phosphatase activity of SHP1 downstream of TLR2 but does not affect its recruitment the TLR2 activation cluster. A, THP1 cells were incubated with DMSO, MPA (10 μ M), or MPA with guanosine (Guo, 50 μ M) before stimulation with Pam3. Cells were lysed in a lysis buffer without any phosphatase inhibitors. Proteins were immunoprecipitated with 3 μ g of anti-SHP1 monoclonal antibody and incubated for 2 h with agarose beads. Immunoprecipitates were washed, and the reaction was initiated by the addition of 25 mM *para*-nitrophenyl phosphate for 30 min at 30 $^{\circ}$ C. The reaction was stopped by the addition of 1 N NaOH, and sample absorbances were measured at 410 nm. Results were expressed as “-fold activation.” An equal amount of precipitated proteins was controlled by Western blot (IB). Controls correspond to cells incubated with DMSO. Data are the means \pm S.D. representative of three independent experiments. NS, nonstimulated. B, THP1 cells were incubated with MPA (10 μ M), stimulated with Pam3 (1 μ g/ml), and lysed with 1% Triton X-100. Lipid rafts were isolated by ultracentrifugation (fractions 2–4), and lipid raft proteins were subjected to SDS-PAGE. SHP1 was revealed by immunoblot in lipid rafts. C, THP1 cells were incubated with MPA, stimulated with Pam3 (1 mg/ml), and then fixed with 4% paraformaldehyde and washed with 0.1 M glycine. Cells were then permeabilized with PBS-1% BSA containing 0.05% saponin and incubated with anti-TLR2 and anti-SHP1 antibodies. Cells were subsequently labeled with Alexa Fluor 488- and Alexa Fluor 594-conjugated secondary antibodies combined. Cells were washed with PBS and mounted on slides. All images were obtained using a confocal Leica DMIRE2 microscope and analyzed using ImageJ 1.40 software. D, THP1 cells were incubated or not with MPA, stimulated with Pam3, and lysed. Cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-phosphotyrosine (P-Tyr, 4G10 clone) or anti-SHP1 antibodies. Immunoprecipitates were then submitted to Western blot with anti-SHP1, anti-P-Tyr, and anti-P-Ser antibodies. The results are representative of three independent experiments.

IMPDHII Inhibits TLR2 Signaling

MPA, following kidney transplantation or systemic diseases. Recent studies report that inhibition of IMPDHII by MPA in IL-1- β -stimulated endothelial cells potentiates the NF- κ B-dependent production of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), suggesting that IMPDHII is involved in the negative regulation of signals mediated through the IL-1 receptor family. In this model, IMPDHII prevented degradation of I κ B and subsequent nuclear translocation of the p50/p65 dimer (41). Lee *et al.* (42) have also demonstrated that inhibition of IMPDHII increases TLR7-dependent NF- κ B activity in murine macrophages or human leukocytes. Consistently, we found that IMPDHII is a negative regulator of NF- κ B activation and TNF α production downstream of TLR2. The effect of IMPDHII on NF- κ B activity was specific to the TLR2 signaling pathway, as inhibition of IMPDHII did not significantly influence NF- κ B activity downstream of the membrane-bound TLR4 and TLR5 receptors. The type of TLR2 heterodimers involved had no impact on the inhibitory effect of IMPDHII on NF- κ B activity. Inhibition of IMPDHII activity had no effect on the activation profiles of Jnk, p38, and Erk. Altogether, these data suggest that IMPDHII has a fundamental inhibitory role in TLR2-dependent signal transduction to NF- κ B.

Our results indicate that the inhibitory effect of IMPDHII is mediated through the negative regulation of PI3K activity. Several studies have indicated that in lymphocytes and neutrophils, PI3K activity is regulated by tyrosine phosphorylation of its p85 α subunit (27). This phosphorylation state seems, however, tightly controlled by the tyrosine phosphatase SHP1, which has been found to decrease phosphorylation of p85 α and inhibit human T-cell, neutrophil, and macrophage cell activation (27, 28, 43). Consistent with data demonstrating that SHP1 also modulates PI3K activity downstream of TLR2 in human pulmonary epithelial cells (44), we found that silencing SHP1 expression increased p85 α phosphorylation and Akt-dependent transactivation of p65. Our data show that inhibition of IMPDHII increases phosphorylation of p85 α through increased phosphorylation of SHP1 serine residues and decreased SHP1 activity. The mechanisms underlying the IMPDHII-mediated increased activation of SHP1 in our model are not completely understood. Several hypotheses can be discussed. First, IMPDHII could modulate the activation of SHP1 through as yet unidentified intermediate proteins, such as G-proteins, for which activation is fully dependent on the production of GTP (19, 45). Consistent with this hypothesis, the administration of GTP reversed the NF- κ B potentiation observed after inhibition of IMPDHII. As expected, the activation of the Rho GTPase Rac1 was sensitive to MPA. However, silencing Rac1 did not prevent the MPA-induced increase in NF- κ B activity following stimulation of TLR2. Altogether, these data infer that Rac1 is involved in TLR2 activation upstream of PI3K, as suggested by Arbibe *et al.* (9), and that IMPDHII negatively regulates NF- κ B through PI3K independently and downstream of Rac1. Other candidates could include proteins containing immunoreceptor tyrosine-based activation or inhibition motifs (ITAM or ITIM). Indeed, SHP1 activation requires its interaction with phosphorylated tyrosines on these motifs (30, 46). Several receptor and non-receptor molecules such as CEACAM1 (44) and TLR-signaling proteins, including IRAK1, contain ITIM motifs (23). Moreover, some receptors, such as β -integrins, coupled with

ITAM-containing adaptors interfere with the signaling of TLRs (46, 47). Interestingly, molecules such as β -integrin also interact with PKC (48), the kinase that phosphorylates SHP1 on serine residues (31). Whether IMPDHII regulates an ITIM- or ITAM-containing protein that is yet to be identified remains unknown.

In summary, using an unbiased proteomic differential analysis of the lipid rafts content following TLR2 stimulation, we identified IMPDHII as a novel negative regulator of NF- κ B activation that contributes to the dephosphorylation of the p85 α subunit of PI3K through increased SHP1 activity. The exact mechanism underlying the effect of IMPDHII on SHP1 activity remains to be elucidated. These findings highlight the importance of balanced signals coordinating the inflammatory response to infection and may help to find novel targets in the control of TLR2-mediated sepsis.

REFERENCES

1. Akira, S., and Takeda, K. (2004) *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499–511
2. Kawai, T., and Akira, S. (2010) *Nat. Immunol.* **11**, 373–384
3. Farhat, K., Riekenberg, S., Heine, H., Debarry, J., Lang, R., Mages, J., Buitwick-Beckmann, U., Röschmann, K., Jung, G., Wiesmüller, K. H., and Ulmer, A. J. (2008) *J. Leukoc. Biol.* **83**, 692–701
4. Triantafilou, M., Gamper, F. G., Haston, R. M., Mouratis, M. A., Morath, S., Hartung, T., and Triantafilou, K. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 31002–31011
5. Hajjar, A. M., O'Mahony, D. S., Ozinsky, A., Underhill, D. M., Aderem, A., Klebanoff, S. J., and Wilson, C. B. (2001) *J. Immunol.* **166**, 15–19
6. Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., and Aderem, A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 13766–13771
7. Soong, G., Reddy, B., Sokol, S., Adamo, R., and Prince, A. (2004) *J. Clin. Invest.* **113**, 1482–1489
8. Triantafilou, M., and Triantafilou, K. (2002) *Trends Immunol.* **23**, 301–304
9. Arbibe, L., Mira, J. P., Teusch, N., Kline, L., Guha, M., Mackman, N., Godowski, P. J., Ulevitch, R. J., and Knäus, U. G. (2000) *Nat. Immunol.* **1**, 533–540
10. Liljeroos, M., Vuolteenaho, R., Morath, S., Hartung, T., Hallman, M., and Ojaniemi, M. (2007) *Cell. Signal.* **19**, 625–633
11. Santos-Sierra, S., Deshmukh, S. D., Kalnitski, J., Küenzi, P., Wymann, M. P., Goldenbock, D. T., and Henneke, P. (2009) *EMBO J.* **28**, 2018–2027
12. Strassheim, D., Kim, J. Y., Park, J. S., Mitra, S., and Abraham, E. (2005) *J. Immunol.* **174**, 8064–8071
13. Strassheim, D., Asehnoune, K., Park, J. S., Kim, J. Y., He, Q., Richter, D., Kuhn, K., Mitra, S., and Abraham, E. (2004) *J. Immunol.* **172**, 5727–5733
14. Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K., and O'Neill, L. A. (2005) *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 446–458
15. Shembade, N., Ma, A., and Harhaj, E. W. (2010) *Science* **327**, 1135–1139
16. Kawagoe, T., Takeuchi, O., Takabatake, Y., Kato, H., Isaka, Y., Tsujimura, T., and Akira, S. (2009) *Nat. Immunol.* **10**, 965–972
17. Yoshida, H., Jono, H., Kai, H., and Li, J. D. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 41111–41121
18. Wald, D., Qin, J., Zhao, Z., Qian, Y., Naramura, M., Tian, L., Towne, J., Sims, J. E., Stark, G. R., and Li, X. (2003) *Nat. Immunol.* **4**, 920–927
19. Allison, A. C., and Eugui, E. M. (2000) *Immunopharmacology* **47**, 85–118
20. Franklin, T. J., Morris, W. P., Jacobs, V. N., Culbert, E. J., Heys, C. A., Ward, W. H., Cook, P. N., Jung, F., and Plé, P. (1999) *Biochem. Pharmacol.* **58**, 867–876
21. Jain, J., Almquist, S. J., Ford, P. J., Shlyakhter, D., Wang, Y., Nimmesgern, E., and Germann, U. A. (2004) *Biochem. Pharmacol.* **67**, 767–776
22. Harriague, J., and Bismuth, G. (2002) *Nat. Immunol.* **3**, 1090–1096
23. Abu-Dayyeh, I., Shio, M. T., Sato, S., Akira, S., Cousineau, B., and Olivier, M. (2008) *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2**, e305

Downloaded from www.jbc.org at INSERM on August 18, 2011

IMPDHII Inhibits TLR2 Signaling

24. Russell, J. A. (2006) *N. Engl. J. Med.* **355**, 1699–1713
25. Chacko, G. W., Tridandapani, S., Damen, J. E., Liu, L., Krystal, G., and Coggeshall, K. M. (1996) *J. Immunol.* **157**, 2234–2238
26. Sattler, M., Verma, S., Pride, Y. B., Salgia, R., Rohrschneider, L. R., and Griffin, J. D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 2451–2458
27. al-Shami, A., Bourgoign, S. G., and Naccache, P. H. (1997) *Blood* **89**, 1035–1044
28. Cuevas, B. D., Lu, Y., Mao, M., Zhang, J., LaPushin, R., Siminovitch, K., and Mills, G. B. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 27455–27461
29. Mazerolles, F., Barbat, C., and Fischer, A. (1997) *Eur. J. Immunol.* **27**, 2457–2465
30. Poole, A. W., and Jones, M. L. (2005) *Cell. Signal.* **17**, 1323–1332
31. Brumell, J. H., Chan, C. K., Butler, J., Borregaard, N., Siminovitch, K. A., Grinstein, S., and Downey, G. P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 875–882
32. Jones, M. L., Craik, J. D., Gibbins, J. M., and Poole, A. W. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 40475–40483
33. Triantafilou, M., Miyake, K., Golenbock, D. T., and Triantafilou, K. (2002) *J. Cell Sci.* **115**, 2603–2611
34. Olsson, S., and Sundler, R. (2006) *Mol. Immunol.* **43**, 607–612
35. Collart, F. R., and Huberman, E. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 15769–15772
36. Colby, T. D., Vanderveen, K., Strickler, M. D., Markham, G. D., and Goldstein, B. M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 3531–3536
37. Carr, S. F., Papp, E., Wu, J. C., and Natsumeda, Y. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 27286–27290
38. Jackson, R. C., Weber, G., and Morris, H. P. (1975) *Nature* **256**, 331–333
39. Sintchak, M. D., and Nimmegern, E. (2000) *Immunopharmacology* **47**, 163–184
40. Jonsson, C. A., and Carlsten, H. (2002) *Cell. Immunol.* **216**, 93–101
41. Weigel, G., Bertalanffy, P., and Wolner, E. (2002) *Mol. Pharmacol.* **62**, 453–462
42. Lee, J., Wu, C. C., Lee, K. J., Chuang, T. H., Katakura, K., Liu, Y. T., Chan, M., Tawatao, R., Chung, M., Shen, C., Cottam, H. B., Lai, M. M., Raz, E., and Carson, D. A. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 1828–1833
43. Zhou, D., Collins, C. A., Wu, P., and Brown, E. J. (2010) *J. Leukoc. Biol.* **87**, 845–855
44. Slevogt, H., Zabel, S., Opitz, B., Hocke, A., Eitel, J., N'guessan, P. D., Lucka, L., Riesbeck, K., Zimmermann, W., Zweigner, J., Temmesfeld-Wollbrueck, B., Suttorp, N., and Singer, B. B. (2008) *Nat. Immunol.* **9**, 1270–1278
45. Mondin, M., Moreau, V., Genot, E., Combe, C., Ripoché, J., and Dubus, I. (2007) *Biochem. Pharmacol.* **73**, 1491–1498
46. Hammerman, J. A., Ni, M., Killebrew, J. R., Chu, C. L., and Lowell, C. A. (2009) *Immunol. Rev.* **232**, 42–58
47. Han, C., Jin, J., Xu, S., Liu, H., Li, N., and Cao, X. (2010) *Nat. Immunol.* **11**, 734–742
48. Abram, C. L., and Lowell, C. A. (2009) *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 339–362

Downloaded from www.jbc.org at INSERM, on August 18, 2011

Chapitre 3. Mécanismes de régulation de SHP1, par
IMPDHII, dans l'activation de NF- κ B médiée par
TLR2

Manuscrit en préparation

Chapitre 4. Rôle du variant génétique *IMPDHII-3757C/T* dans la sévérité du choc septique

Association of IMPDHII functional genetic variant and severity of septic shock

Anne-Lise Rossi, Christophe Rousseau, Nadia Belaïdouni, Frédéric Pène, Pierre Asfar, Cedric Daubin, Jean-Paul Mira, Jean-Daniel Chiche and Julie Toubiana

Manuscrit en préparation

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

A chaque étape de l'infection par un pathogène, la variabilité de l'hôte peut modifier sa réponse et déstabiliser l'équilibre fragile entre les mécanismes pro- et anti-inflammatoires. L'activation anarchique de l'inflammation peut ainsi induire des dommages tissulaires et des défaillances d'organes que l'on retrouve dans le choc septique. Une réaction inflammatoire insuffisante favorise, quant à elle, l'invasion des pathogènes et peut conduire à des infections secondaires. Le développement de ces infections secondaires, dites nosocomiales, est d'ailleurs très fréquent chez les patients septiques en réanimation. Les travaux de Landelle et al. ont montré que le choc septique est un facteur de risque pour les pneumonies secondaires (Landelle et al., 2008, 2010). Ces déséquilibres peuvent avoir pour origine i) l'activation préférentielle d'une voie de signalisation inadaptée, ii) des mécanismes de régulation déficients ou iii) des variants génétiques au sein de gènes modificateurs. L'objectif de ce travail était de mieux comprendre les mécanismes de régulation des réponses dépendantes de TLR2. Ce récepteur est impliqué dans la reconnaissance des bactéries, parasites ou champignons. Il recrute un complexe multimoléculaire au sein des radeaux lipidiques initiant et orientant la réponse inflammatoire. En utilisant des approches complémentaires de protéomique, nous avons identifié les protéines recrutées dans les radeaux lipidiques et/ou y subissant des modifications post-traductionnelles après engagement des hétérodimères TLR2/TLR1 ou TLR2/TLR6. Parmi elles, la Src kinase Lyn et la déshydrogénase IMPDHII ont retenu toute notre attention.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les fonctions de ces molécules dans la signalisation en aval de TLR2. Lyn est une Src kinase. Son implication dans les cascades de phosphorylation sur tyrosine est essentiellement connue dans l'immunité adaptative, où elle peut être un activateur ou un inhibiteur des voies de signalisation lymphocytaires. Nos travaux ont montré le rôle de régulateur positif qu'exerce la Src kinase sur la réponse pro-inflammatoire en aval de TLR2. Lyn favorise la phosphorylation sur résidus tyrosines de la sous-unité catalytique (p110) de la PI3-K. L'identification de Lyn comme une molécule indispensable dans l'activation de la voie PI3-K/Akt et du facteur de transcription NF- κ B, confirme l'importance des phosphorylations sur tyrosine dans la défense anti-infectieuse. Les inhibiteurs des tyrosines kinases, initialement développés pour les thérapies anti-cancéreuses, sont utilisés dans le traitement de nombreuses autres pathologies comme les infections sévères (Kontzias et al., 2012; Summy et al., 2005). Ces inhibiteurs ont fait leur preuve dans les atteintes pulmonaires en améliorant la survie dans des modèles expérimentaux de choc

Conclusions et perspectives

septique (Okutani et al., 2006). Ils ont aussi un grand potentiel dans le traitement du sepsis (David et al., 2013). La découverte de Lyn dans la réponse immunitaire innée à l'infection ouvre une nouvelle porte aux thérapies adjuvantes aux antibiotiques au cours du sepsis.

IMPDHII est une enzyme clé de la synthèse *de novo* de guanine. Elle est donc largement décrite pour son implication dans la prolifération des lymphocytes. Elle a également une activité modulatrice dans la défense anti-virale suite à l'engagement de TLR7 par le virus de l'hépatite C (Lee et al., 2006). Nos travaux ont souligné le rôle de régulateur négatif qu'exerce cette déshydrogénase sur la réponse pro-inflammatoire induite par TLR2. Elle inhibe l'activation de NF- κ B par la voie PI3-K/Akt. La tyrosine 236 de la région 230-330 de IMPDHII intervient dans l'activation de la tyrosine phosphatase SHP1, elle-même permettant de moduler l'activité de NF- κ B. Nous avons décrypté en partie le mécanisme par lequel IMPDHII active la phosphatase SHP1 à travers la libération d'une inhibition ; PKC α est un nouvel acteur de la régulation de NF- κ B au cours de l'engagement de TLR2. En revanche, il nous reste à mieux définir le rôle précis de IMPDHII, notamment à travers ses modifications conformationnelles.

Nous avons aussi mieux compris les mécanismes par lesquels le MPA régule la voie de signalisation de TLR2. Le MPA permet de maintenir les signaux pro-inflammatoires en réponse à l'engagement de TLR2. Bien que dans son usage clinique, le MPA puisse augmenter le risque d'infection en tant qu'immunosuppresseur, il semble avoir des effets favorables sur l'immunité innée ; en effet, il favorise *in vitro* la différenciation des cellules myéloïdes et monocytaires (Inai et al., 2000), et dans des modèles murins de sepsis, le MPA augmente la survie, la clairance bactérienne, l'expression de IFN γ et l'activité anti-microbienne des PNNs (Assfalg et al., 2010; Durez et al., 1999). Les inhibiteurs de IMPDHII pourraient donc favoriser la défense anti-infectieuse et être utilisés dans certaines conditions au cours du sepsis sévère. Nous envisageons au laboratoire d'étudier l'effet du MPA sur un modèle murin d'infection à staphylocoque, agoniste spécifique de TLR2, tant au niveau de la survie que de la réponse inflammatoire et cellulaire, ainsi que sur les mécanismes d'immuno-tolérance post-sepsis.

Par ailleurs, nous avons mené une étude d'association qui a permis de déterminer le rôle d'un SNP de *IMPDHII* dans la gravité du choc septique. Un certain nombre d'études de pharmacogénétique s'était intéressé aux variants de *IMPDHII* dans le but d'identifier une susceptibilité particulière au rejet de greffe (Sombogaard, 2010; Sombogaard et al., 2009). En revanche, notre étude est, à notre connaissance, la première étude à s'être intéressée à

Conclusions et perspectives

l'association d'un variant de *IMPDHII* avec la variabilité du phénotype infectieux. Un certain nombre de SNPs a été identifié au cours de ces dernières années. Ces facteurs peuvent influencer la susceptibilité ou la gravité des infections. Bien que l'effet des polymorphismes des récepteurs soit compensé par leur redondance, les SNPs localisés au niveau de gènes de molécules de la signalisation peuvent avoir des répercussions fonctionnelles majeures. A titre d'exemple, le SNP *IRAK1* est fortement associé à une augmentation de la gravité pulmonaire au cours du choc septique (Toubiana et al., 2010). Nos travaux menés sur le variant *IMPDHII-3757C* ont souligné qu'il est associé à un syndrome de détresse respiratoire aiguë accru chez les patients septiques. Ces données suggèrent que les molécules immuno-modulatrices comme *IMPDHII* peuvent jouer un rôle majeur dans les infections sévères observées en pratique clinique. Il nous reste à bien caractériser les effets fonctionnels de ce variant dans l'activité de *IMPDHII* et dans la modulation de la cascade inflammatoire.

En conclusion, nos travaux ont permis de mettre en lumière le rôle de Lyn et de *IMPDHII* dans la signalisation activatrice de NF- κ B en aval de TLR2. Ces rôles de régulateurs positifs et négatifs font de ces molécules des cibles thérapeutiques potentielles dans l'infection grave.

Bibliographie

Bibliographie

- Abram, C.L., and Lowell, C.A. (2007). The Expanding Role for ITAM-Based Signaling Pathways in Immune Cells. *Sci. STKE* 2007, re2–re2.
- Adamo, R., Sokol, S., Soong, G., Gomez, M.I., and Prince, A. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* Flagella Activate Airway Epithelial Cells through asialoGM1 and Toll-Like Receptor 2 as well as Toll-Like Receptor 5. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30, 627–634.
- Adib-Conquy, M., Adrie, C., Moine, P., Asehnoune, K., Fitting, C., Pinsky, M.R., Dhainaut, J.-F., and Cavaillon, J.-M. (2003). NF- κ B Expression in Mononuclear Cells of Patients with Sepsis Resembles That Observed in Lipopolysaccharide Tolerance. *Am. J. Respiratory Crit. Care Med.* 162, 1877–1883.
- Adli, M. (2006). IKK-i/IKK Controls Constitutive, Cancer Cell-associated NF- κ B Activity via Regulation of Ser-536 p65/RelA Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 281, 26976–26984.
- Ahlf, D.R., Compton, P.D., Tran, J.C., Early, B.P., Thomas, P.M., and Kelleher, N.L. (2012). Evaluation of the Compact High-Field Orbitrap for Top-Down Proteomics of Human Cells. *J. Proteome Res.* 11, 4308–4314.
- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499–511.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124, 783–801.
- Alberti, C., Brun-Buisson, C., Burchardi, H., Martin, C., Goodman, S., Artigas, A., Sicignano, A., Palazzo, M., Moreno, R., Boulim, R., Lepage, E., and Le Gall, J. (2002). Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med.* 28, 108–121.
- Albright, F.S., Orlando, P., Pavia, A.T., Jackson, G.G., and Cannon Albright, L.A. (2008). Evidence for a Heritable Predisposition to Death Due to Influenza. *J. Infect. Dis.* 197, 18–24.
- Alcamo, E., Mizgerd, J.P., Horwitz, B.H., Bronson, R., Beg, A.A., Scott, M., Doerschuk, C.M., Hynes, R.O., and Baltimore, D. (2001). Targeted mutation of TNF receptor I rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NF- κ B in leukocyte recruitment. *J. Immunol.* 167, 1592–1600.
- Alfsen, A., Iniguez, P., Bouguyon, E., and Bomsel, M. (2001). Secretory IgA specific for a conserved epitope on gp41 envelope glycoprotein inhibits epithelial transcytosis of HIV-1. *J. Immunol.* 166, 6257–6265.
- Alkan, C., Coe, B.P., and Eichler, E.E. (2011). Genome structural variation discovery and genotyping. *Nat. Rev. Genet.* 12, 363–376.
- Allison, A.C., and Eugui, E.M. (2000). Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 47, 85–118.
- Ameziane, N., Bogard, M., and Lamoril, J. (2005). *Principes de biologie moléculaire en biologie clinique - Nedjma Ameziane, Marc Bogard, Jérôme Lamoril* - Google Livres.
- An, H., Hou, J., Zhou, J., Zhao, W., Xu, H., Zheng, Y., Yu, Y., Liu, S., and Cao, X. (2008). Phosphatase SHP-1 promotes TLR- and RIG-I-activated production of type I interferon by inhibiting the kinase IRAK1. *Nat. Immunol.* 9, 542–550.
- Anderson, L., and Hunter, C.L. (2006). Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 573–588.

Bibliographie

- Angus, D.C., and van der Poll, T. (2013). Severe Sepsis and Septic Shock. *N. Engl. J. Med.* *369*, 840–851.
- Angus, D.C., Linde-Zwirble, W.T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., and Pinsky, M.R. (2001). Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit. Care Med.* *29*, 1303–1310.
- Annane, D., Bellissant, E., and Cavaillon, J.-M. (2005). Septic shock. *The Lancet* *365*, 63–78.
- Arbibe, L., Mira, J.-P., Teusch, N., Kline, L., Guha, M., Mackman, N., Godowski, P.J., Ulevitch, R.J., and Knaus, U.G. (2000). Toll-like receptor 2-mediated NF- κ B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat. Immunol.*
- Arcaroli, J., Silva, E., Maloney, J.P., He, Q., Svetkauskaite, D., Murphy, J.R., and Abraham, E. (2006). Variant IRAK-1 Haplotype Is Associated with Increased Nuclear Factor- κ B Activation and Worse Outcomes in Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *173*, 1335–1341.
- Arnalich, F., López, J., Codoceo, R., Jiménez, M., Madero, R., and Montiel, C. (1999). Relationship of plasma leptin to plasma cytokines and human survival in sepsis and septic shock. *J. Infect. Dis.* *180*, 908–911.
- Arnalich, F., Garcia-Palomero, E., Lopez, J., Jimenez, M., Madero, R., Renart, J., Vazquez, J.J., and Montiel, C. (2000). Predictive Value of Nuclear Factor kappa B Activity and Plasma Cytokine Levels in Patients with Sepsis. *Infect. Immun.* *68*, 1942–1945.
- Arndt, P.G., Suzuki, N., Avdi, N.J., Malcolm, K.C., and Worthen, G.S. (2004). Lipopolysaccharide-induced c-Jun NH2-terminal Kinase Activation in Human Neutrophils: ROLE OF PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE AND Syk-MEDIATED PATHWAYS. *J. Biol. Chem.* *279*, 10883–10891.
- Assfalg, V., Hüser, N., Reim, D., Kaiser-Moore, S., Rossmann-Block, T., Weighardt, H., Novotny, A.R., Stangl, M.J., Holzmann, B., and Emmanuel, K.L. (2010). COMBINED IMMUNOSUPPRESSIVE AND ANTIBIOTIC THERAPY IMPROVES BACTERIAL CLEARANCE AND SURVIVAL OF POLYMICROBIAL SEPTIC PERITONITIS: *Shock* *33*, 155–161.
- Auffray, C., Caulfield, T., Khoury, M.J., Lupski, J.R., Schwab, M., Veenstra, T., Schroeder, M.P., Gonzalez-Perez, A., Lopez-Bigas, N., and Bookman, E.B. (2013). 2012 highlights in translational omics. *Genome Biol.* *14*, R11.
- Bairagya, H.R., Mukhopadhyay, B.P., and Bera, A.K. (2011). Conserved water mediated recognition and the dynamics of active site Cys 331 and Tyr 411 in hydrated structure of human IMPDH-II. *J. Mol. Recognit.* *24*, 35–44.
- Baltimore, D., Boldin, M.P., O'Connell, R.M., Rao, D.S., and Taganov, K.D. (2008). MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat. Immunol.* *9*, 839–845.
- Barber, R.C., Chang, L.-Y.E., Arnoldo, B.D., Purdue, G.F., Hunt, J.L., Horton, J.W., and Aragaki, C.C. (2006). Innate immunity SNPs are associated with risk for severe sepsis after burn injury. *Clin. Med. Res.* *4*, 250–255.
- Barford, D., and Neel, B.G. (1998). Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Structure* *6*, 249–254.
- Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T., Ghosh, S., and Altshuler, D. (1995). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B. *Nature* *376*, 167–170.

Bibliographie

- Belkaid, Y., Blank, R.B., and Suffia, I. (2006). Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunol. Rev.* **212**, 287–300.
- Benjamim, C.F., Hogaboam, C., and Payen, D. (2003). The chronic consequences of severe sepsis. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 408–412.
- Bergmann, U., Ahrends, R., Neumann, B., Scheler, C., and Linscheid, M.W. (2012). Application of Metal-Coded Affinity Tags (MeCAT): Absolute Protein Quantification with Top-Down and Bottom-Up Workflows by Metal-Coded Tagging. *Anal. Chem.* **84**, 5268–5275.
- Beutler, B. (2002). Science review: Key inflammatory and stress pathways in critical illness—the central role of the Toll-like receptors. *Crit. Care* **7**, 39.
- Beutler, B., Du, X., and Hoebe, K. (2003). From phenomenon to phenotype and from phenotype to gene: forward genetics and the problem of sepsis. *J. Infect. Dis.* **187**, S321–S326.
- Beutler, B., Eidenschenk, C., Crozat, K., Imler, J.-L., Takeuchi, O., Hoffmann, J.A., and Akira, S. (2007). Genetic analysis of resistance to viral infection. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 753–766.
- Blander, J.M., and Medzhitov, R. (2006). Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* **440**, 808–812.
- Bock, J., and Gulbins, E. (2003). The transmembranous domain of CD40 determines CD40 partitioning into lipid rafts. *FEBS Lett.* **534**, 169–174.
- Bock, C., Tomazou, E.M., Brinkman, A.B., Müller, F., Simmer, F., Gu, H., Jäger, N., Gnirke, A., Stunnenberg, H.G., and Meissner, A. (2010). Quantitative comparison of genome-wide DNA methylation mapping technologies. *Nat. Biotechnol.* **28**, 1106–1114.
- Boehm, C.D. (1989). Use of polymerase chain reaction for diagnosis of inherited disorders. *Clin. Chem.* **35**, 1843–1848.
- Boggon, T.J., and Eck, M.J. (2004). Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* **23**, 7918–7927.
- Boldrick, J.C., Alizadeh, A.A., Diehn, M., Dudoit, S., Liu, C.L., Belcher, C.E., Botstein, D., Staudt, L.M., Brown, P.O., and Relman, D.A. (2002). Stereotyped and specific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 972–977.
- Bommhardt, U., Chang, K.C., Swanson, P.E., Wagner, T.H., Tinsley, K.W., Karl, I.E., and Hotchkiss, R.S. (2004). Akt decreases lymphocyte apoptosis and improves survival in sepsis. *J. Immunol.* **172**, 7583–7591.
- Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M., and Sibbald, W.J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *CHEST J.* **101**, 1644–1655.
- Bouchard, P., Zhao, Z., Banville, D., Dumas, F., Fischer, E.H., and Shen, S.-H. (1994). Phosphorylation and identification of a major tyrosine phosphorylation site in protein tyrosine phosphatase 1C. *J. Biol. Chem.* **269**, 19585–19589.
- Brdička, T., Pavlišťová, D., Leo, A., Bruyns, E., Kořínek, V., Angelisová, P., Scherer, J., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Hilgert, I. (2000). Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched

Bibliographie

microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation. *J. Exp. Med.* **191**, 1591–1604.

Breg, A.A., and Baltimore, D. (1996). An Essential Role for NF- κ B in Preventing TNF- α -Induced Cell Death. *Science* **274**, 782–784.

Bremer, S., Rootwelt, H., and Bergan, S. (2007). Real-Time PCR Determination of IMPDH1 and IMPDH2 Expression in Blood Cells. *Clin. Chem.* **53**, 1023–1029.

Brenmoehl, J., Herfarth, H., Glück, T., Audebert, F., Barlage, S., Schmitz, G., Froehlich, D., Schreiber, S., Hampe, J., Schölmerich, J., Holler, E., and Rogler, G. (2007). Genetic variants in the NOD2/CARD15 gene are associated with early mortality in sepsis patients. *Intensive Care Med.* **33**, 1541–1548.

Brint, E.K., Xu, D., Liu, H., Dunne, A., McKenzie, A.N.J., O'Neill, L.A.J., and Liew, F.Y. (2004). ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat. Immunol.* **5**, 373–379.

Brown, T.A. (2001). Southern Blotting and Related DNA Detection Techniques. *Encycl. Life Sci.*

Brown, D.A., and London, E. (1997). Structure of Detergent-Resistant Membrane Domains: Does Phase Separation Occur in Biological Membranes? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 1–7.

Brown, A.D., Claybon, A.B., and Bishop, A.J.R. (2011). A Conditional Mouse Model for Measuring the Frequency of Homologous Recombination Events In Vivo in the Absence of Essential Genes. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 3593–3602.

Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., Marshall, A.S.J., and Gordon, S. (2003). Dectin-1 Mediates the Biological Effects of β -Glucans. *J. Exp. Med.* **197**, 1119–1124.

Brumell, J.H., Chan, C.K., Butler, J., Borregaard, N., Siminovitch, K.A., Grinstein, S., and Downey, G.P. (1997). Regulation of Src Homology 2-containing Tyrosine Phosphatase 1 during Activation of Human Neutrophils. ROLE OF PROTEIN KINASE C. *J. Biol. Chem.* **272**, 875–882.

Bucher HC, Guyatt GH, Cook DJ, Holbrook A, McAlister FA, and for the Evidence-Based Medicine Working Group (1999). Users' guides to the medical literature: Xix. applying clinical trial results a. how to use an article measuring the effect of an intervention on surrogate end points. *JAMA* **282**, 771–778.

Buckley, J.M., Liu, J.H., Li, C.H., Blankson, S., Wu, Q.D., Jiang, Y., Redmond, H.P., and Wang, J.H. (2011). Increased Susceptibility of ST2-Deficient Mice to Polymicrobial Sepsis Is Associated with an Impaired Bactericidal Function. *J. Immunol.* **187**, 4293–4299.

Burton, P.R., Tobin, M.D., and Hopper, J.L. (2005). Key concepts in genetic epidemiology. *The Lancet* **366**, 941–951.

Bush, W.S., and Moore, J.H. (2012). Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. *PLoS Comput. Biol.* **8**, e1002822.

Bustamante, J., Boisson-Dupuis, S., Jouanguy, E., Picard, C., Puel, A., Abel, L., and Casanova, J.-L. (2008). Novel primary immunodeficiencies revealed by the investigation of paediatric infectious diseases. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 39–48.

Cantley, L.C. (2002). The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science* **296**, 1655–1657.

Bibliographie

- Cao, S., Zhang, X., Edwards, J., and Mosser, D.M. (2006). NF- κ B1 (p50) Homodimers Differentially Regulate Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Macrophages. *J. Biol. Chem.* **281**, 26041–26050.
- Capelluto, D.G.S. (2012). Tollip: a multitasking protein in innate immunity and protein trafficking. *Microbes Infect.* **14**, 140–147.
- Carmody, R.J., Ruan, Q., Palmer, S., Hilliard, B., and Chen, Y.H. (2007). Negative Regulation of Toll-Like Receptor Signaling by NF- κ B p50 Ubiquitination Blockade. *Science* **317**, 675–678.
- Carpenter, S., and O'Neill, L.A.J. (2009). Recent insights into the structure of Toll-like receptors and post-translational modifications of their associated signalling proteins. *Biochem. J.* **422**, 1–10.
- Carr, S.F., Papp, E., Wu, J.C., and Natsumeda, Y. (1993). Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **268**, 27286–27290.
- Carty, M., Goodbody, R., Schröder, M., Stack, J., Moynagh, P.N., and Bowie, A.G. (2006). The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat. Immunol.* **7**, 1074–1081.
- Casadei, S., Cortesi, L., Pensotti, V., Radice, P., Pierotti, M., Amadori, D., and Calistri, D. (2001). Detection of germline BRCA1 mutations by Multiple-Dye Cleavase Fragment Length Polymorphism (MD-CFLP) method. *Br. J. Cancer* **85**, 845.
- Casadevall, A., and Pirofski, L. (2003). The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 17–24.
- Casselbrant ML, Mandel EM, Fall PA, and et al (1999). The heritability of otitis media: A twin and triplet study. *JAMA* **282**, 2125–2130.
- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., and Kusumoto, S. (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* **4**, 702–707.
- Chang, J., Naif, H.M., Li, S., Sullivan, J.S., Randle, C.M., and Cunningham, A.L. (1996). Twin studies demonstrate a host cell genetic effect on productive human immunodeficiency virus infection of human monocytes and macrophages in vitro. *J. Virol.* **70**, 7792–7803.
- Chapman, S.J., Khor, C.C., Vannberg, F.O., Frodsham, A., Walley, A., Maskell, N.A., Davies, C.W.H., Segal, S., Moore, C.E., Gillespie, S.H., Denny, P., Day, N.P., Crook, D.W., Davies, R.J.O., and Hill, A.V.S. (2007). κ B Genetic Polymorphisms and Invasive Pneumococcal Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **176**, 181–187.
- Chaudhary, A., Fresquez, T.M., and Naranjo, M.J. (2007). Tyrosine kinase Syk associates with toll-like receptor 4 and regulates signaling in human monocytic cells. *Immunol. Cell Biol.* **85**, 249–256.
- Chen, L.-F., and Greene, W.C. (2004). Shaping the nuclear action of NF- κ B. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 392–401.
- Cheng, C.-H., Lee, Y.-S., Chang, C.-J., and Lin, T.-Y. (2013). Genetic Polymorphisms in Toll-Like Receptors among Pediatric Patients with Renal Parenchymal Infections of Different Clinical Severities. *PLoS ONE* **8**, e58687.
- Chien, Y., and Konigshofer, Y. (2007). Antigen recognition by gd T cells. *Immunol. Rev.* **215**, 46–58.

Bibliographie

- Christensen, K.D., Jayaratne, T.E., Roberts, J.S., Kardia, S.L.R., and Petty, E.M. (2010). Understandings of Basic Genetics in the United States: Results from a National Survey of Black and White Men and Women. *Public Heal. Genomics* 13, 467–476.
- Chu, C.-L., and Lowel, C.A. (2005). The Lyn Tyrosine Kinase Differentially Regulates Dendritic Cell Generation and Maturation. *J. Immunol.* 175, 2880–2889.
- Chu, C.-L., Yu, Y.-L., Shen, K.-Y., Lowell, C.A., Lanier, L.L., and Hamerman, J.A. (2008). Increased TLR responses in dendritic cells lacking the ITAM-containing adapters DAP12 and FcR γ . *Eur. J. Immunol.* 38, 166–173.
- Chung, D.R., Kasper, D.L., Panzo, R.J., Chtinis, T., Grusby, M.J., Sayegh, M.H., and Tzianabos, A.O. (2003). CD4+ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. *J. Immunol.* 170, 1958–1963.
- Ciarlo, E., Savva, A., and Roger, T. (2013). Epigenetics in sepsis: targeting histone deacetylases. *Int. J. Antimicrob. Agents* 42, S8–S12.
- Clark, S.J., Statham, A., Stirzaker, C., Molloy, P.L., and Frommer, M. (2006). DNA methylation: Bisulphite modification and analysis. *Nat. Protoc.* 1, 2353–2364.
- Cobb, J.P., Laramie, J.M., Stormo, G.D., Morrissey, J.J., Shannon, W.D., Qiu, Y., Karl, I.E., Buchman, T.G., and Hotchkiss, R.S. (2002). Sepsis gene expression profiling: murine splenic compared with hepatic responses determined by using complementary DNA microarrays. *Crit. Care Med.* 30, 2711–2721.
- Cohen, J. (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420, 885–891.
- Colby, T.D., Vanderveen, K., Strickler, M.D., Markham, G.D., and Goldstein, B.M. (1999). Crystal structure of human type II inosine monophosphate dehydrogenase: implications for ligand binding and drug design. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 3531–3536.
- Collins, L.V. (2004). Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. *J. Leukoc. Biol.* 75, 995–1000.
- Compton, P.D., and Kelleher, N.L. (2012). Spinning up mass spectrometry for whole protein complexes. *Nat. Methods* 9, 1065–1066.
- Comstock, G. (1978). Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Proffit survey. *Am. Rev. Respir. Dis.* 117, 621–624.
- Courtine, E. (2010). Importance de la sous-unité cRel de NF- κ B dans la réponse anti-infectieuse: Approche translationnelle. Sciences. Paris descartes.
- Craggs, G., and Kellie, S. (2001). A Functional Nuclear Localization Sequence in the C-terminal Domain of SHP-1. *J. Biol. Chem.* 276, 23719–23725.
- Criqui, A., and Baulande, S. (2010). Le séquençage de l'exome au secours des maladies génétiques. *Med Sci Paris* 26, 452–454.
- Cristofanon, S., Morceau, F., Scovassi, A.I., Dicato, M., Ghibelli, L., and Diederich, M. (2008). Oxidative, multistep activation of the noncanonical NF- κ B pathway via disulfide Bcl-3/p50 complex. *FASEB J.* 23, 45–57.

Bibliographie

- Crocker, B.A., Lawson, B.R., Rutschmann, S., Berger, M., Eidenschenk, C., Blasius, A.L., Moresco, E.M.Y., Sovath, S., Cengia, L., and Shultz, L.D. (2008). Inflammation and autoimmunity caused by a SHP1 mutation depend on IL-1, MyD88, and a microbial trigger. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 15028–15033.
- Crombruggen, K., Jacob, F., Zhang, N., and Bachert, C. (2013). Damage-associated molecular patterns and their receptors in upper airway pathologies. *Cell. Mol. Life Sci.*
- Cuevas, B.D., Lu, Y., Mao, M., Zhang, J., LaPushin, R., Siminovitch, K., and Mills, G.B. (2001). Tyrosine Phosphorylation of p85 Relieves Its Inhibitory Activity on Phosphatidylinositol 3-Kinase. *J. Biol. Chem.* *276*, 27455–27461.
- Cui, S., Eisenächer, K., Kirchhofer, A., Brzózka, K., Lammens, A., Lammens, K., Fujita, T., Conzelmann, K.-K., Krug, A., and Hopfner, K.-P. (2008). The C-Terminal Regulatory Domain Is the RNA 5'-Triphosphate Sensor of RIG-I. *Mol. Cell* *29*, 169–179.
- D'Ambrosio, D., Hippen, K.L., Minskoff, S.A., Mellman, I., Pani, G., Siminovitch, K.A., and Cambier, J.C. (1995). Recruitment and activation of PTP1C in negative regulation of antigen receptor signaling by Fc gamma RIIB1. *Science* *268*, 293–297.
- Daëron, M., Jaeger, S., Du Pasquier, L., and Viver, E. (2008). Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunol. Rev.* *224*, 11–43.
- Daha, M. (2010). Role of Complement in Innate Immunity and Infections. *Crit. Rev. Immunol.* *30*, 47–52.
- Dahmer, M.K., Randolph, A., Vitali, S., and Quasney, M.W. (2005). Genetic polymorphisms in sepsis. *Pediatr. Crit. Care Med.* *6*, S61–S73.
- Dalod, M., Salazar-Mather, T., Malmgaard, L., Lewis, C., Aseelin-Paturel, C., Biere, F., Trinchieri, G., and Biron, C.A. (2002). Interferon alpha/beta and Interleukin 12 Responses to Viral Infections: Pathways Regulating Dendritic Cell Cytokine Expression In Vivo. *J. Exp. Med.* *195*, 517–528.
- Damania, B., DeMaria, M., Jung, J.U., and Desrosiers, R.C. (2000). Activation of Lymphocyte Signaling by the R1 Protein of Rhesus Monkey Rhadinovirus. *J. Virol.* *74*, 2721–2730.
- Dang, P.M.-C., Cross, A.R., and Babior, B.M. (2001). Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 3001–3005.
- Darst, R.P., Pardo, C.E., Ai, L., Brown, K.D., and Klädde, M.P. (2010). Bisulfite Sequencing of DNA. In *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl, eds. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.),.
- Das, J., Chen, C.-H., Yang, L., Cohn, L., Ray, P., and Ray, A. (2001). A critical role for NF- κ B in GATA3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation. *Nat. Immunol.* *2*, 45–50.
- Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W., and Richmond, T.J. (2002). Solvent Mediated Interactions in the Structure of the Nucleosome Core Particle at 1.9Å Resolution. *J. Mol. Biol.* *319*, 1097–1113.
- David, S., Kumpers, P., van Slyke, P., and Parikh, S.M. (2013). Mending Leaky Blood Vessels: The Angiopoietin-Tie2 Pathway in Sepsis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *345*, 2–6.
- Davidson, G.H., Hamlat, C.A., Rivara, F.P., Koepsell, T.D., Jurkovich, G.J., and Arbabi, S. (2011). Long-term survival of adult trauma patients. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* *305*, 1001–1007.

Bibliographie

- Davila, S., Wright, V.J., Khor, C.C., Sim, K.S., Binder, A., Breunis, W.B., Inwald, D., Nadel, S., Betts, H., Carrol, E.D., de Groot, R., Hermans, P.W.M., Hazelzet, J., Emonts, M., Lim, C.C., Kuijpers, T.W., Martinon-Torres, F., Salas, A., Zenz, W., Levin, M., and Hibberd, M.L. (2010). Genome-wide association study identifies variants in the CFH region associated with host susceptibility to meningococcal disease. *Nat. Genet.* **42**, 772–776.
- Abu-Dayyeh, I., Shio, M.T., Sato, S., Akira, S., Cousineau, B., and Olivier, M. (2008). Leishmania-Induced IRAK-1 Inactivation Is Mediated by SHP-1 Interacting with an Evolutionarily Conserved KTIM Motif. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2**, e305.
- Dellinger, R.P., Carlet, J.M., Masur, H., Gerlach, H., Calandra, T., Cohen, J., Gea-Banacloche, J., Keh, D., Marshall, J.C., Parker, M.M., Ramsay, G., Zimmerman, J.L., Vincent, J.-L., and Levy, M.M. (2004). Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit. Care Med.* **32**, 858–873.
- Dendrou, C.A., Bell, J.I., and Fugger, L. (2013). Weighing in on autoimmune disease: Big data tip the scale. *Nat. Med.* **19**, 138–139.
- Denk, S., Perl, M., and Huber-Lang, M. (2012). Damage- and Pathogen-Associated Molecular Patterns and Alarmins: Keys to Sepsis. *Eur. Surg. Res.* **48**, 171–179.
- Diehl, G.E., Yue, H.H., Hsieh, K., Kuang, A.A., Ho, M., Morici, L.A., Lenz, L.L., Cado, D., Riley, L.W., and Winoto, A. (2004). TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. *Immunity* **21**, 877–889.
- Dillin, A. (2003). The specifics of small interfering RNA specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 6289–6291.
- Dinarello, C.A. (2004). Unraveling the NALP-3/IL-1 β inflammasome: a big lesson from a small mutation. *Immunity* **20**, 243–244.
- Doi, T.S., Marino, M.W., Takahashi, T., Yoshida, T., Sakukara, T., Old, L.J., and Obata, Y. (1999). Absence of tumor necrosis factor rescues RelA-deficient mice from embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 2994–2999.
- Doisne, J.-M., Becourt, C., Amniai, L., Duarte, N., Le Luduec, J.-B., Eberl, G., and Benlagha, K. (2009). Skin and Peripheral Lymph Node Invariant NKT Cells Are Mainly Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor t+ and Respond Preferentially under Inflammatory Conditions. *J. Immunol.* **183**, 2142–2149.
- Doyle, S.L., Jefferies, C.A., Feighery, C., and O'Neill, L.A.J. (2007). Signaling by Toll-like Receptors 8 and 9 Requires Bruton's Tyrosine Kinase. *J. Biol. Chem.* **282**, 36953–36960.
- Dubinsky, M.C., Mei, L., Friedman, M., Dhere, T., Haritunians, T., Hakonarson, H., Kim, C., Glessner, J., Targan, S.R., McGovern, D.P., Taylor, K.D., and Rotter, J.I. (2010). Genome wide association (GWA) predictors of anti-TNF α therapeutic responsiveness in pediatric inflammatory bowel disease: *Inflamm. Bowel Dis.* **16**, 1357–1366.
- Dupont, J.-M., Tost, J., Jammes, H., and Gut, I.G. (2004). De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology. *Anal. Biochem.* **333**, 119–127.
- Durez, P., Appelboom, T., Pira, C., Stordeur, P., Vray, B., and Goldman, M. (1999). Antiinflammatory properties of mycophenolate mofetil in murine endotoxemia: inhibition of TNF- α and upregulation of IL-10 release. *Int. J. Immunopharmacol.* **21**, 581 – 587.

Bibliographie

- Dykstra, M., Cherukuri, A., Sohn, H.W., Tzeng, S.-J., and Pierce, S.K. (2003). LOCATION IS EVERYTHING : Lipid Rafts and Immune Cell Signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 457–481.
- Dyson, H.J., and Komives, E.A. (2012). Role of disorder in I κ B-NF κ B interaction. *IUBMB Life* **64**, 499–505.
- Echchannaoui, H., Frei, K., Schnell, C., Leib, S.L., Zimmerli, W., and Landmann, R. (2002). Toll-like receptor 2–deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J. Infect. Dis.* **186**, 798–806.
- Eckmann, L. (2004). Innate immunity and mucosal bacterial interactions in the intestine. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **20**, 82–88.
- Eidid, M. (2003). The state of lipid rafts : from model membranes to cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 257–283.
- El-Sagheer, A.H., and Brown, T. (2012). Click Nucleic Acid Ligation: Applications in Biology and Nanotechnology. *Accounts Chem. Res.* **45**, 1258–1267.
- EMC Medicine (2012). Cellcept $\text{\textcircled{R}}$: Complete product information.
- Emond, M.J., Louie, T., Emerson, J., Zhao, W., Mathias, R.A., Knowles, M.R., Wright, F.A., Rieder, M.J., Tabor, H.K., Nickerson, D.A., Barnes, K.C., Gibson, R.L., and Bamshad, M.J. (2012). Exome sequencing of extreme phenotypes identifies DCTN4 as a modifier of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Nat. Genet.* **44**, 886–889.
- English, B., Orlicek, S., Mei, Z., and Meals, E. (1997). Bacterial LPS and IFN-gamma trigger the tyrosine phosphorylation of vav in macrophages: evidence for involvement of the hck tyrosine kinase. *J. Leukoc. Biol.* **62**, 859–864.
- Epelman, S., Berenger, B., Stack, D., Neely, G.G., Ma, L.L., and Mody, C.H. (2008). Microbial Products Activate Monocytic Cells through Detergent-Resistant Membrane Microdomains. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **39**, 657–665.
- Ermolaeva, M.A., Michallet, M.-C., Papadopoulou, N., Utermöhlen, O., Kranidioti, K., Kollias, G., Tschopp, J., and Pasparakis, M. (2008). Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. *Nat. Immunol.* **9**, 1037–1046.
- Erridge, C. (2010). Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J. Leukoc. Biol.* **87**, 989–999.
- Eshaque, B., and Dixon, B. (2006). Technology platforms for molecular diagnosis of cystic fibrosis. *Biotechnol. Adv.* **24**, 86–93.
- Evans, C., Noirel, J., Ow, S.Y., Salim, M., Pereira-Medrano, A.G., Couto, N., Pandhal, J., Smith, D., Pham, T.K., Karunakaran, E., Zou, X., Biggs, C.A., and Wright, P.C. (2012). An insight into iTRAQ: where do we stand now? *Anal. Bioanal. Chem.* **404**, 1011–1027.
- Fan, H., and Cook, J.A. (2004). Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J. Endotoxin Res.* **10**, 71–84.
- Fawcett, V.C., and Lorenz, U. (2005). Localization of Src homology 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) to lipid rafts in T lymphocytes: functional implications and a role for the SHP-1 carboxyl terminus. *J. Immunol.* **174**, 2849–2859.

Bibliographie

- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., and Whitehouse, C.M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64–71.
- Fessler, M.B., and Parks, J.S. (2011). Intracellular Lipid Flux and Membrane Microdomains as Organizing Principles in Inflammatory Cell Signaling. *J. Immunol.* **187**, 1529–1535.
- Fivaz, M., Abrami, L., and van der Goot, F.G. (1999). Landing on lipid rafts. *Trends Cell Biol.* **9**, 212–213.
- Flierl, M.A., Rittirsch, D., Nadeau, B.A., Day, D.E., Zetoune, F.S., Sarma, J.V., Huber-Lang, M.S., and Ward, P.A. (2008). Functions of the complement components C3 and C5 during sepsis. *FASEB J.* **22**, 3483–3490.
- Foster, S.L., Hargreaves, D.C., and Medzhitov, R. (2007). Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*.
- Frazer, K.A., Murray, S.S., Schork, N.J., and Topol, E.J. (2009). Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 241–251.
- Frey, E.A., Miller, D.S., Jahr, T.G., Sundan, A., Bazil, V., Espevik, T., Finlay, B.B., and Wright, S.D. (1992). Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **176**, 1665–1671.
- Fritz, J.H., Ferrero, R.L., Philpott, D.J., and Girardin, S.E. (2006). Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat. Immunol.* **7**, 1250–1257.
- Frodsham, A.J. (2004). Genetics of infectious diseases. *Hum. Mol. Genet.* **13**, R187–R194.
- Fruman, D.A., and Cantley, L.C. (2002). Phosphoinositide 3-kinase in immunological systems. *Semin. Immunol.* **14**, 7–18.
- Futami, M., Zhu, Q. -s., Whichard, Z.L., Xia, L., Ke, Y., Neel, B.G., Feng, G.-S., and Corey, S.J. (2011). G-CSF receptor activation of the Src kinase Lyn is mediated by Gab2 recruitment of the Shp2 phosphatase. *Blood* **118**, 1077–1086.
- Futer, O., Sintchak, M.D., Caron, P.R., Nimmegern, E., DeCenzo, M.T., Livingston, D.J., and Raybuck, S.A. (2002). A mutational analysis of the active site of human type II inosine 5'-monophosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Protein Struct. Mol. Enzym.* **1594**, 27–39.
- Galli, S.J., Grimaldeston, M., and Tsai, M. (2008). Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat. Immunol.* **8**, 478–486.
- Garat, A., Cardenas, C.L.L., Lionet, A., Devos, A., Glowacki, F., Kenani, A., Migot-Nabias, F., Allorge, D., Lo-Guidice, J.-M., Broly, F., and Cauffiez, C. (2010). Inter-ethnic variability of three functional polymorphisms affecting the IMPDH2 gene. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 5185–5188.
- Gatfield, J., and Pieters, J. (2000). Essential Role for Cholesterol in Entry of Mycobacteria into Macrophages. *Science* **288**, 1647–1651.
- Gensburger, O., Van Schaik, R.H.N., Picard, N., Le Meur, Y., Rousseau, A., Woillard, J.-B., Van Gelder, T., and Marquet, P. (2010). Polymorphisms in type I and II inosine monophosphate dehydrogenase genes and association with clinical outcome in patients on mycophenolate mofetil. *Pharmacogenet. Genomics* **20**, 537–543.
- Gerold, G., Ajaj, K.A., Bienert, M., Laws, H.-J., Zychlinsky, A., and de Diego, J.L. (2008). A Toll-like receptor 2–integrin $\beta 3$ complex senses bacterial lipopeptides via vitronectin. *Nat. Immunol.* **9**, 761–768.

Bibliographie

- Gerondakis, S., Grumont, R., Gugasyan, R., Wong, L., Isomura, I., Ho, W., and Banerjee, A. (2006). Unravelling the complexities of the NF- κ B signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene* 25, 6781–6799.
- Gholami, Z., Brunsveld, L., and Hanley, Q. (2013). PNA-Induced assembly of fluorescent proteins using DNA as a framework. *Bioconjug. Chem.* 130714103704003.
- Ghosh, S., and Hayden, M.S. (2008). New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 837–848.
- Ghosh, S., May, M.J., and Kopp, E.B. (1998). NF- κ B AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 225–260.
- Giamarellos-Bourboulis, E.J., Mouktaroudi, M., Bodar, E., van der Ven, J., Kullberg, B.-J., Netea, M.G., and van der Meer, J.W.M. (2009). Crystals of monosodium urate monohydrate enhance lipopolysaccharide-induced release of interleukin 1 by mononuclear cells through a caspase 1-mediated process. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 273–278.
- Gilk, S.D., Cockrell, D.C., Luterbach, C., Hansen, B., Knodler, L.A., Ibarra, J.A., Steele-Mortimer, O., and Heinzen, R.A. (2013). Bacterial Colonization of Host Cells in the Absence of Cholesterol. *PLoS Pathog.* 9, e1003107.
- Godfrey, D.I., Stankovic, S., and Baxter, A.G. (2010). Raising the NKT cell family. *Nat. Immunol.* 11, 197–206.
- Gong, J., Wei, T., Stark, R.W., Jamitzky, F., Heckl, W.M., Anders, H.J., Lech, M., and Rössle, S.C. (2010). Inhibition of Toll-like receptors TLR4 and 7 signaling pathways by SIGIRR: A computational approach. *J. Struct. Biol.* 169, 323–330.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 953–964.
- Graff, J.W., Dickson, A.M., Clay, G., McCaffrey, A.P., and Wilson, M.E. (2012). Identifying Functional MicroRNAs in Macrophages with Polarized Phenotypes. *J. Biol. Chem.* 287, 21816–21825.
- Grassme, H. (2000). CD95/CD95 Ligand Interactions on Epithelial Cells in Host Defense to *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 290, 527–530.
- Grassmé, H., Jendrossek, V., Riehle, A., Von Kürthy, G., Berger, J., Schwarz, H., Weller, M., Kolesnick, R., and Gulbins, E. (2003). Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat. Med.* 9, 322–330.
- Gray, M.W. (1999). Mitochondrial Evolution. *Science* 283, 1476–1481.
- Gray, P., Dagvadorj, J., Michelsen, K.S., Brikos, C., Rentsendorj, A., Town, T., Crother, T.R., and Arditi, M. (2011). Myeloid Differentiation Factor-2 Interacts with Lyn Kinase and Is Tyrosine Phosphorylated Following Lipopolysaccharide-Induced Activation of the TLR4 Signaling Pathway. *J. Immunol.* 187, 4331–4337.
- Grimaldi, D., Louis, S., Pène, F., Sirgo, G., Rousseau, C., Claessens, Y.E., Vimeux, L., Cariou, A., Mira, J.P., Hosmalin, A., and Chiche, J.D. (2011). Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive Care Med.* 37, 1438–1446.

Bibliographie

Grinyo, J.M., and Cruzado, J.M. (2006). Mycophenolate Mofetil and Sirolimus Combination in Renal Transplantation. *Am. J. Transplant.* *6*, 1991–1999.

Grün, J.R., Kossmann, B., and Reinhardt, R. (1988). Discontinuous reversed-phase high performance liquid chromatography increases load capacity of analytical columns. Separation of ribosomal proteins from the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Chromatographia* *25*, 189–198.

Gu, J.J., Stegmann, S., Gathy, K., Murray, R., Laliberte, J., Ayscue, L., and Mitchell, B.S. (2000). Inhibition of T lymphocyte activation in mice heterozygous for loss of the IMPDH II gene. *J. Clin. Invest.* *106*, 599–606.

Guha, M., and Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* *13*, 85–94.

Gutmacher, A.E., and Collins, F.S. (2005). Realizing the promise of genomics in biomedical research. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* *294*, 1399–1402.

Hajishengallis, G., and Lambris, J.D. (2011). Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 187–200.

Hajishengallis, G., Wang, M., Bagby, G.J., and Nelson, S. (2008). Importance of TLR2 in Early Innate Immune Response to Acute Pulmonary Infection with *Porphyromonas gingivalis* in Mice. *J. Immunol.* *181*, 4141–4149.

Hamerman, J.A., Tchao, N.K., Lowell, C.A., and Lanier, L.L. (2005). Enhanced Toll-like receptor responses in the absence of signaling adaptor DAP12. *Nat. Immunol.* *6*, 579–586.

Hamerman, J.A., Ni, M., Killebrew, J.R., Chu, C.-L., and Lowell, C.A. (2009). The expanding roles of ITAM adapters FcR γ and DAP12 in myeloid cells. *Immunol. Rev.* *232*, 42–58.

Happel, K.I. (2005). Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J. Exp. Med.* *202*, 761–769.

Harder, K.W., Parsons, L.M., Armes, J., Evans, N., Kountouri, N., Clark, R., Quilici, C., Grail, D., Hodgson, G.S., and Dunn, A.R. (2001). Gain-and loss-of-function Lyn mutant mice define a critical inhibitory role for Lyn in the myeloid lineage. *Immunity* *15*, 603–615.

Harokopakis, E., and Hajishengallis, G. (2005). Integrin activation by bacterial fimbriae through a pathway involving CD14, Toll-like receptor 2, and phosphatidylinositol-3-kinase. *Eur. J. Immunol.* *35*, 1201–1210.

Hartlova, A., Cerveny, L., Hubalek, M., Krocova, Z., and Stulik, J. (2010). Membrane rafts: a potential gateway for bacterial entry into host cells. *Microbiol. Immunol.* *54*, 237–245.

Hattersley, A.T., and McCarthy, M.I. (2005). What makes a good genetic association study? *The Lancet* *366*, 1315–1323.

Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J.V., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* *194*, 769–780.

Hawkins, G.A., and Hoffman, L.M. (1999). Rapid DNA mutation identification and fingerprinting using base excision sequence scanning. *Electrophoresis* *20*, 1171–1176.

Bibliographie

Hawkins, P.T., Anderson, K.E., Davidson, K., and Stephens, L.R. (2006). Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 647–662.

Hayashi, F., Smith, K., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial Flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410.

Haybaeck, J., Zeller, N., Wolf, M.J., Weber, A., Wagner, U., Kurrer, M.O., Bremer, J., Iezzi, G., Graf, R., Clavien, P.-A., Thimme, R., Blum, H., Nedospasov, S.A., Zatloukal, K., Ramzan, M., Ciesek, S., Pietschmann, T., Marche, P.N., Karin, M., Kopf, M., Browning, J.L., Aguzzi, A., and Heikenwalder, M. (2009). A Lymphotoxin-Driven Pathway to Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell* 16, 295–308.

Hedstrom, L. (2009). IMP Dehydrogenase: Structure, Mechanism, and Inhibition. *Chem. Rev.* 109, 2903–2928.

Hefeneider, S., Cornell, K., Brown, L., Bakke, A., McCoy, S., and Bennett, R. (1992). Nucleosomes and DNA bind to specific cell-surface molecules on murine cells and induce cytokine production. *Clin Immunol Immunopathol* 63, 245–251.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., and Takeda, K. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740–745.

Henckaerts, L., Nielsen, K.R., Steffensen, R., Van Steen, K., Mathieu, C., Giulietti, A., Wouters, P.J., Milants, I., Vanhorebeek, I., Langouche, L., Vermeire, S., Rutgeerts, P., Thiel, S., Wilmer, A., Hansen, T.K., and Van den Berghe, G. (2009). Polymorphisms in innate immunity genes predispose to bacteremia and death in the medical intensive care unit*. *Crit. Care Med.* 37, 192–e3.

Henderson, R.M. (2004). Lipid Rafts: Feeling is Believing. *News Physiol. Sci.* 19, 39–43.

Hendriks, W.J.A.J., Elson, A., Harroch, S., Pulido, R., Stoker, A., and den Hertog, J. (2013). Protein tyrosine phosphatases in health and disease. *FEBS J.* 280, 708–730.

Herman, J.G., Graff, J.R., Myöhänen, S., Nelkin, B.D., and Baylin, S.B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 9821–9826.

Hestekin, C.N., and Barron, A.E. (2006). The potential of electrophoretic mobility shift assays for clinical mutation detection. *ELECTROPHORESIS* 27, 3805–3815.

Hibbs, M.L., Stanley, E., Maglito, R., and Dunn, A.R. (1995a). Identification of a duplication of the mouse *Lyn* gene. *Gene* 156, 175–181.

Hibbs, M.L., Tarlinton, D.M., Armes, J., Grail, D., Hodgson, G., Maglito, R., Stacker, S.A., and Dunn, A.R. (1995b). Multiple defects in the immune system of *Lyn*-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell* 83, 301–311.

Hibbs, M.L., Harder, K.W., Armes, J., Kountouri, N., Quilici, C., Casagrande, F., Dunn, A.R., and Tarlinton, D.M. (2002). Sustained Activation of Lyn Tyrosine Kinase In Vivo Leads to Autoimmunity. *J. Exp. Med.* 196, 1593–1604.

Hickman-Davis, J.M., and Davis, I.C. (2006). Transgenic mice. *Paediatr. Respir. Rev.* 7, 49–53.

Hill, A.V. (1998). Host genetics of infectious diseases: old and new approaches converge. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 695.

Bibliographie

- Hiraga, K., and Arnold, F.H. (2003). General Method for Sequence-independent Site-directed Chimeragenesis. *J. Mol. Biol.* *330*, 287–296.
- Hirotsani, T., Lee, P.Y., Kuwata, H., Yamamoto, M., Matsumoto, M., Kawase, I., Akira, S., and Takeda, K. (2005). The nuclear I κ B protein I κ BNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J. Immunol.* *174*, 3650–3657.
- Hoebe, K., and Beutler, B. (2008). Forward genetic analysis of TLR-signaling pathways: An evaluation☆. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *60*, 824–829.
- Hoebe, K., Xin Du, Goode, J., Mann, N., and Beutler, B. (2003). Lps2: a new locus required for responses to lipopolysaccharide, revealed by germline mutagenesis and phenotypic screening. *J. Endotoxin Res.* *9*, 250–255.
- Hoebe, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Du, X., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Shamel, L., Hartung, T., and Zähringer, U. (2005). CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* *433*, 523–527.
- Hoeller, B.M., Reiter, B., Abad, S., Graze, I., and Glieder, A. (2008). Random tag insertions by Transposon Integration mediated Mutagenesis (TIM). *J. Microbiol. Methods* *75*, 251–257.
- Hoffmann, J., and Akira, S. (2013). Innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* *25*, 1–3.
- Holland, S.M. (2009). Chronic Granulomatous Disease. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* *38*, 3–10.
- Holmes, C.L., Russell, J.A., and Walley, K.R. (2003). Genetic polymorphisms in sepsis and septic shockRole in prognosis and potential for therapy. *CHEST J.* *124*, 1103–1115.
- Holmskov, U., Thiel, S., and Jensenius, J.C. (2003). C OLLECTINS AND F ICOLINS : Humoral Lectins of the Innate Immune Defense. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 547–578.
- Horejsí, V., Drbal, K., Cebecauer, M., Cerný, J., Brdicka, T., Angelisová, P., and Stockinger, H. (1999). GPI-microdomains: a role in signalling via immunoreceptors. *Immunol. Today* *20*, 356–361.
- Hornef, M.W., Wick, M.J., Rhen, M., and Normark, S. (2002). Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* *3*, 1033–1040.
- Horwood, N.J., Mahon, T., McDaid, J.P., Campbell, J., Mano, H., Brennan, F.M., Webster, D., and Foxwell, B.M.J. (2003). Bruton's Tyrosine Kinase Is Required For Lipopolysaccharide-induced Tumor Necrosis Factor Production. *J. Exp. Med.* *197*, 1603–1611.
- Hoshino, A.A., Bravo, J.P., Nobile, P.M., and Morelli, K.A. (2012). Microsatellites as tools for genetic diversity analysis. *Genet. Divers. Microorg. InTech* 149–170.
- Hotchkiss, R.S., and Karl, I.E. (2003). The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med.* *348*, 138–150.
- Hotchkiss, R.S., Monneret, G., and Payen, D. (2013). Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect. Dis.* *13*, 260–268.
- Hotta, N., Ichiyama, T., Shiraishi, M., Takekawa, T., Matsubara, T., and Furukawa, S. (2007). Nuclear factor- κ B activation in peripheral blood mononuclear cells in children with sepsis. *Crit. Care Med.* *35*, 2395–2401.

Bibliographie

- Huang, J., Zheng, Z., Andersson, A.F., Engstrand, L., and Ye, W. (2011). Rapid Screening of Complex DNA Samples by Single-Molecule Amplification and Sequencing. *PLoS ONE* *6*, e19723.
- Huang, W., Na, L., Fidel, P.L., and Schwarzenberger, P. (2004). Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J. Infect. Dis.* *190*, 624–631.
- Hugot, J.-P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.-P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O’Morain, C.A., and Gassull, M. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature* *411*, 599–603.
- Huillet, C., Adrait, A., Lebert, D., Picard, G., Trauchessec, M., Louwagie, M., Dupuis, A., Hittinger, L., Ghaleh, B., Le Corvoisier, P., Jaquinod, M., Garin, J., Bruley, C., and Brun, V. (2011). Accurate Quantification of Cardiovascular Biomarkers in Serum Using Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) and Selected Reaction Monitoring. *Mol. Cell. Proteomics* *11*, M111.008235–M111.008235.
- Husebye, H., Halaas, Ø., Stenmark, H., Tunheim, G., Sandanger, Ø., Bogen, B., Brech, A., Latz, E., and Espevik, T. (2006). Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J.* *25*, 683–692.
- Ifrim, D.C., Joosten, L.A.B., Kullberg, B.-J., Jacobs, L., Jansen, T., Williams, D.L., Gow, N.A.R., van der Meer, J.W.M., Netea, M.G., and Quintin, J. (2013). *Candida albicans* Primes TLR Cytokine Responses through a Dectin-1/Raf-1-Mediated Pathway. *J. Immunol.* *190*, 4129–4135.
- Ignoul, S., and Eggermont, J. (2005). CBS domains: structure, function, and pathology in human proteins. *AJP Cell Physiol.* *289*, C1369–C1378.
- Inai, K., Tsutani, H., Yamauchi, T., Fukushima, T., Iwasaki, H., Imamura, S., Wano, Y., Nemoto, Y., Naiki, H., and Ueda, T. (2000). Differentiation induction in non-lymphocytic leukemia cells upon treatment with mycophenolate mofetil. *Leuk. Res.* *24*, 761–768.
- Ingle, E. (2008). Src family kinases: Regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* *1784*, 56–65.
- Ingle, E. (2009). Csk-binding protein can regulate Lyn signals controlling cell morphology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 1332–1343.
- Ingle, E. (2012). Functions of the Lyn tyrosine kinase in health and disease. *Cell Commun Signal* *10*, 21.
- Ingle, E., Schneider, J.R., Payne, C.J., McCarthy, D.J., Harder, K.W., Hibbs, M.L., and Klinken, S.P. (2006). Csk-binding Protein Mediates Sequential Enzymatic Down-regulation and Degradation of Lyn in Erythropoietin-stimulated Cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 31920–31929.
- Inohara, N., Chamaillard, M., McDonald, C., and Nuñez, G. (2005). NOD-LRR PROTEINS: Role in Host-Microbial Interactions and Inflammatory Disease. *Annu. Rev. Biochem.* *74*, 355–383.
- Ivashkiv, L.B. (2009). Cross-regulation of signaling by ITAM-associated receptors. *Nat. Immunol.* *10*, 340–347.
- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* *5*, 987–995.
- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2010). Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. *Science* *327*, 291–295.

Bibliographie

- Jackson, R., Weber, G., and Morris, H. (1975). IMP dehydrogenase, an enzyme linked with proliferation and malignancy. *Nature*.
- Jain, J., Almquist, S.J., Ford, P.J., Shlyakhter, D., Wang, Y., Nimmesgern, E., and Germann, U.A. (2004). Regulation of inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II isoforms in human lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* *67*, 767–776.
- Jamaluddin, M., Wang, S., Boldogh, I., Tian, B., and Brasier, A.R. (2007). TNF- α -induced NF- κ B/RelA Ser276 phosphorylation and enhanceosome formation is mediated by an ROS-dependent PKAc pathway. *Cell. Signal.* *19*, 1419–1433.
- Janot, L., Secher, T., Torres, D., Maillet, I., Pfeilschifter, J., Quesniaux, V.F.J., Landmann, R., Ryffel, B., and Erard, F. (2008). CD14 Works with Toll-Like Receptor 2 to Contribute to Recognition and Control of *Listeria monocytogenes* Infection. *J. Infect. Dis.* *198*, 115–124.
- Jeannin, P., Jaillon, S., and Delneste, Y. (2008). Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Curr. Opin. Immunol.* *20*, 530–537.
- Jefferies, C.A., and O’Neill, L.A.J. (2004). Bruton’s tyrosine kinase (Btk)—the critical tyrosine kinase in LPS signalling? *Immunol. Lett.* *92*, 15–22.
- Jeong, E., and Lee, J.Y. (2011). Intrinsic and Extrinsic Regulation of Innate Immune Receptors. *Yonsei Med. J.* *52*, 379.
- Ji, Y., Gu, J.J., Makhov, A.M., Griffith, J.D., and Mitchell, B.S. (2005). Regulation of the Interaction of Inosine Monophosphate Dehydrogenase with Mycophenolic Acid by GTP. *J. Biol. Chem.* *281*, 206–212.
- Jones, D.D. (2005). Triplet nucleotide removal at random positions in a target gene: the tolerance of TEM-1 -lactamase to an amino acid deletion. *Nucleic Acids Res.* *33*, e80–e80.
- Jones, M.L., Craik, J.D., Gibbins, J.M., and Poole, A.W. (2004). Regulation of SHP-1 Tyrosine Phosphatase in Human Platelets by Serine Phosphorylation at Its C Terminus. *J. Biol. Chem.* *279*, 40475–40483.
- Jonsson, C.A., and Carlsten, H. (2002). Mycophenolic acid inhibits inosine 5’-monophosphate dehydrogenase and suppresses production of pro-inflammatory cytokines, nitric oxide, and LDH in macrophages. *Cell. Immunol.* *216*, 93–101.
- Kagan, J.C., and Medzhitov, R. (2006). Phosphoinositide-Mediated Adaptor Recruitment Controls Toll-like Receptor Signaling. *Cell* *125*, 943–955.
- Kagan, J.C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., and Medzhitov, R. (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon- β . *Nat. Immunol.* *9*, 361–368.
- Kannan, S., Audet, A., Knittel, J., Mullegama, S., Gao, G.F., and Wu, M. (2006). Src kinase Lyn is crucial for *Pseudomonas aeruginosa* internalization into lung cells. *Eur. J. Immunol.* *36*, 1739–1752.
- Kannan, S., Audet, A., Huang, H., Chen, L., and Wu, M. (2008). Cholesterol-rich membrane rafts and Lyn are involved in phagocytosis during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J. Immunol.* *180*, 2396–2408.
- Kanneganti, T.-D., Özören, N., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J.-H., Franchi, L., Whitfield, J., Barchet, W., Colonna, M., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E.P., Akira, S., and Núñez, G. (2006a). Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* *440*, 233–236.

Bibliographie

- Kanneganti, T.-D., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J.-H., Whitfield, J., Franchi, L., Taraporewala, Z.F., Miller, D., Patton, J.T., Inohara, N., and Nunez, G. (2006b). Critical Role for Cryopyrin/Nalp3 in Activation of Caspase-1 in Response to Viral Infection and Double-stranded RNA. *J. Biol. Chem.* **281**, 36560–36568.
- Kanneganti, T.-D., Lamkanfi, M., and Núñez, G. (2007). Intracellular NOD-like Receptors in Host Defense and Disease. *Immunity* **27**, 549–559.
- Kass, E.M., Helgadottir, H.R., Chen, C.-C., Barbera, M., Wang, R., Westermark, U.K., Ludwig, T., Moynahan, M.E., and Jasin, M. (2013). Double-strand break repair by homologous recombination in primary mouse somatic cells requires BRCA1 but not the ATM kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 5564–5569.
- Kato, H., Takahasi, K., and Fujita, T. (2011). RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. *Immunol. Rev.* **243**, 91–98.
- Kaufman, D.B., Shapiro, R., Lucey, M.R., Cherikh, W.S., T Bustami, R., and Dyke, D.B. (2004). Immunosuppression: practice and trends. *Am. J. Transplant.* **4**, 38–53.
- Kawabuchi, M., Satomi, Y., Takao, T., Shimonishi, Y., Nada, S., Nagai, K., Tarakovsky, A., and Okada, M. (2000). Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases. *Nature* **404**, 999–1003.
- Kawagoe, T., Sato, S., Matsushita, K., Kato, H., Matsui, K., Kumagai, Y., Saitoh, T., Kawai, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2008). Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat. Immunol.* **9**, 684–691.
- Kawai, T., and Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ.* **13**, 816–825.
- Kawai, T., and Akira, S. (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* **21**, 317–337.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–384.
- Kawai, T., and Akira, S. (2011). Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* **34**, 637–650.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**, 115–122.
- Keck, S., Freudenberg, M., and Huber, M. (2010). Activation of Murine Macrophages via TLR2 and TLR4 Is Negatively Regulated by a Lyn/PI3K Module and Promoted by SHIP1. *J. Immunol.* **184**, 5809–5818.
- Kelley, S.L., Lukk, T., Nair, S.K., and Tapping, R.I. (2012). The Crystal Structure of Human Soluble CD14 Reveals a Bent Solenoid with a Hydrophobic Amino-Terminal Pocket. *J. Immunol.* **190**, 1304–1311.
- Kellum, J.A., Kong, L., Fink, M.P., Weissfeld, L.A., Yealy, D.M., Pinsky, M.R., Fine, J., Krichevsky, A., Delude, R.L., and Angus, D.C. (2007). Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study. *Arch. Intern. Med.* **167**, 1655.
- Keshishian, H., Addona, T., Burgess, M., Kuhn, E., and Carr, S.A. (2007). Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 2212–2229.

Bibliographie

- Khor, C.C., Chapman, S.J., Vannberg, F.O., Dunne, A., Murphy, C., Ling, E.Y., Frodsham, A.J., Walley, A.J., Kyrieleis, O., Khan, A., Aucan, C., Segal, S., Moore, C.E., Knox, K., Campbell, S.J., Lienhardt, C., Scott, A., Aaby, P., Sow, O.Y., Grignani, R.T., Sillah, J., Sirugo, G., Peshu, N., Williams, T.N., Maitland, K., Davies, R.J.O., Kwiatkowski, D.P., Day, N.P., Yala, D., Crook, D.W., Marsh, K., Berkley, J.A., O'Neill, L.A.J., and Hill, A.V.S. (2007). A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nat. Genet.* *39*, 523–528.
- Kibe, S., Adams, K., and Barlow, G. (2011). Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care. *J. Antimicrob. Chemother.* *66*, ii33–ii40.
- Kim, K.D., Zhao, J., Auh, S., Yang, X., Du, P., Tang, H., and Fu, Y.-X. (2007). Adaptive immune cells temper initial innate responses. *Nat. Med.* *13*, 1248–1252.
- Kleinnijenhuis, J., Joosten, L.A.B., van de Veerdonk, F.L., Savage, N., van Crevel, R., Kullberg, B.J., van der Ven, A., Ottenhoff, T.H.M., Dinarello, C.A., van der Meer, J.W.M., and Netea, M.G. (2009). Transcriptional and inflammasome-mediated pathways for the induction of IL-1 β production by *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Immunol.* *39*, 1914–1922.
- Knapp, S., Leemans, J.C., Florquin, S., Branger, J., Maris, N.A., Pater, J., van Rooijen, N., and van der Poll, T. (2003). Alveolar Macrophages Have a Protective Antiinflammatory Role during Murine Pneumococcal Pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *167*, 171–179.
- Kobayashi, K., Hernandez, L.D., Galán, J.E., Janeway Jr, C.A., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2002). IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* *110*, 191–202.
- Koegl, M., Zlatkine, P., Ley, S.C., Courtneidge, S.A., and Magee, A.I. (1994). Palmitoylation of multiple Src-family kinases at a homologous N-terminal motif. *Biochem J* *303*, 749–753.
- Köhler, C., and RajBhandary, U.L. (2008). The many applications of acid urea polyacrylamide gel electrophoresis to studies of tRNAs. *Methods* 129–138.
- Kondo, T., Kawai, T., and Akira, S. (2012). Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends Immunol.* *33*, 449–458.
- Kontzias, A., Kotlyar, A., Laurence, A., Changelian, P., and O'Shea, J.J. (2012). Jakinibs: a new class of kinase inhibitors in cancer and autoimmune disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* *12*, 464–470.
- Korshunova, Y., Maloney, R.K., Lakey, N., Citek, R.W., Bacher, B., Budiman, A., Ordway, J.M., McCombie, W.R., Leon, J., Jeddeloh, J.A., and McPherson, J.D. (2007). Massively parallel bisulphite pyrosequencing reveals the molecular complexity of breast cancer-associated cytosine-methylation patterns obtained from tissue and serum DNA. *Genome Res.* *18*, 19–29.
- Kosugi, A., Sakakura, J., Yasuda, K., Ogata, M., and Hamaoka, T. (2001). Involvement of SHP-1 tyrosine phosphatase in TCR-mediated signaling pathways in lipid rafts. *Immunity* *14*, 669–680.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* *128*, 693–705.
- Krebs, D.L., Chehal, M.K., Sio, A., Huntington, N.D., Da, M.L., Ziltener, P., Inglese, M., Kountouri, N., Priatel, J.J., Jones, J., Tarlinton, D.M., Anderson, G.P., Hibbs, M.L., and Harder, K.W. (2012). Lyn-Dependent Signaling Regulates the Innate Immune Response by Controlling Dendritic Cell Activation of NK Cells. *J. Immunol.* *188*, 5094–5105.

Bibliographie

- Krysko, D.V., Agostinis, P., Krysko, O., Garg, A.D., Bachert, C., Lambrecht, B.N., and Vandenabeele, P. (2011). Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol.* **32**, 157–164.
- Kurosaki, T. (1999). Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 555–592.
- Kuttenkeuler, D., and Boutros, M. (2004). Genome-wide RNAi as a route to gene function in *Drosophila*. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* **3**, 168–176.
- Laird, M.H.W., Rhee, S.H., Perkins, D.J., Medvedev, A.E., Piao, W., Fenton, M.J., and Vogel, S.N. (2009). TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling. *J. Leukoc. Biol.* **85**, 966–977.
- Lajoie, P., and Nabi, I.R. (2007). Regulation of raft-dependent endocytosis. *J. Cell. Mol. Med.* **11**, 644–653.
- Landelle, C., Lepape, A., Français, A., Tognet, E., Thizy, H., Voirin, N., Timsit, J.F., Monneret, G., and Vanhems, P. (2008). Nosocomial Infection After Septic Shock Among Intensive Care Unit Patients •. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **29**, 1054–1065.
- Landelle, C., Lepape, A., Voirin, N., Tognet, E., Venet, F., Bohé, J., Vanhems, P., and Monneret, G. (2010). Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med.* **36**, 1859–1866.
- Langman, L.J., LeGatt, D.F., Halloran, P.F., and Yatscoff, R.W. (1996). Pharmacodynamic Assessment of Mycophenolic Acid-induced Immunosuppression in Renal Transplant Recipients. *Transplantation* **62**.
- Lasserre, R., Guo, X.-J., Conchonaud, F., Hamon, Y., Hawchar, O., Bernard, A.-M., Soudja, S.M., Lenne, P.-F., Rigneault, H., Olive, D., Bismuth, G., Nunès, J.A., Payrastra, B., Marguet, D., and He, H.-T. (2008). Raft nanodomains contribute to Akt/PKB plasma membrane recruitment and activation. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 538–547.
- Lawrence, T., Bebien, M., Liu, G.Y., Nizet, V., and Karin, M. (2005). IKK α limits macrophage NF- κ B activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature* **434**, 1138–1143.
- Lee, J., Wu, C.C., Lee, K.J., Chuang, T.-H., Katakura, K., Liu, Y.-T., Chan, M., Tawatao, R., Chung, M., and Shen, C. (2006). Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 1828–1833.
- Lee, Y.G., Chain, B.M., and Cho, J.Y. (2009). Distinct role of spleen tyrosine kinase in the early phosphorylation of inhibitor of κ B α via activation of the phosphoinositide-3-kinase and Akt pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 811–821.
- Leung, T.H., Hoffmann, A., and Baltimore, D. (2004). One Nucleotide in a B Site Can Determine Cofactor Specificity for NF- κ B Dimers. *Cell* **118**, 453–464.
- Levitan, I., and Barrantes, F. (2012). Cholesterol Regulation of Ion Channels and Receptors.
- Liew, F.Y., Xu, D., Brint, E.K., and O'Neill, L.A.J. (2005). Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 446–458.
- Liljeroos, M., Vuolteenaho, R., Morath, S., Hartung, T., Hallman, M., and Ojaniemi, M. (2007). Bruton's tyrosine kinase together with PI 3-kinase are part of Toll-like receptor 2 multiprotein complex and mediate LTA induced Toll-like receptor 2 responses in macrophages. *Cell. Signal.* **19**, 625–633.

Bibliographie

- Lingwood, D., and Simons, K. (2009). Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science* 327, 46–50.
- Liu, Q., and Sommer, S.S. (1994). Parameters affecting the sensitivities of dideoxy fingerprinting and SSCP. *Genome Res.* 4, 97–108.
- Liu, F., Bardhan, K., Yang, D., Thangaraju, M., Ganapathy, V., Waller, J.L., Liles, G.B., Lee, J.R., and Liu, K. (2012). NF- B Directly Regulates Fas Transcription to Modulate Fas-mediated Apoptosis and Tumor Suppression. *J. Biol. Chem.* 287, 25530–25540.
- Lorenz, E., Chemotti, D.C., Vandal, K., and Tessier, P.A. (2004). Toll-Like Receptor 2 Represses Nonpilus Adhesin-Induced Signaling in Acute Infections with the *Pseudomonas aeruginosa* pilA Mutant. *Infect. Immun.* 72, 4561–4569.
- Lorenz, U., Ravichandran, K.S., Pei, D., Walsh, C.T., Burakoff, S.J., and Neel, B.G. (1994). Lck-dependent tyrosyl phosphorylation of the phosphotyrosine phosphatase SH-PTP1 in murine T cells. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1824–1834.
- Lowell, C.A. (2010). Src-family and Syk Kinases in Activating and Inhibitory Pathways in Innate Immune Cells: Signaling Cross Talk. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a002352–a002352.
- Luce, M.C., Marra, G., Chauhan, D.P., Laghi, L., Carethers, J.M., Cherian, S.P., Hawn, M., Binnie, C.G., Kam-Morgan, L.N., and Cayouette, M.C. (1995). In vitro transcription/translation assay for the screening of hMLH1 and hMSH2 mutations in familial colon cancer. *Gastroenterology* 109, 1368–1374.
- Lühken, G. (2012). Genetic testing for phenotype-causing variants in sheep and goats. *Mol. Cell. Probes* 26, 231–237.
- Ma, H., Shi, W., Dong, S., Wang, K., Jia, J., and Chen, S. (2008). N-Terminal Specific Fluorescence Labeling and its Use in Local Structure Analysis of Proteins (Invited Review). *Curr. Chem. Biol.* 2, 249–255.
- Ma, P., Cierniewska, A., Signarvic, R., Cieslak, M., Kong, H., Sinnamon, A.J., Neubig, R.R., Newman, D.K., Stalker, T.J., and Brass, L.F. (2011). A newly identified complex of spinophilin and the tyrosine phosphatase, SHP-1, modulates platelet activation by regulating G protein-dependent signaling. *Blood* 119, 1935–1945.
- De Maio, A., Torres, M.B., and Reeves, R.H. (2005). GENETIC DETERMINANTS INFLUENCING THE RESPONSE TO INJURY, INFLAMMATION, AND SEPSIS. *Shock* 23, 11–17.
- Manes, S., del Real, G., and Martinez A, C. (2003). Pathogens: Raft hijackers. *Nat. Rev.* 3, 557–568.
- Manis, J.P. (2007). Knock Out, Knock In, Knock Down — Genetically Manipulated Mice and the Nobel Prize. *N. Engl. J. Med.* 2426–2429.
- Manning, G., Whyte, D., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* 298, 1912–1934.
- Manolio, T.A., Collins, F.S., Cox, N.J., Goldstein, D.B., Hindorff, L.A., Hunter, D.J., McCarthy, M.I., Ramos, E.M., Cardon, L.R., Chakravarti, A., Cho, J.H., Guttmacher, A.E., Kong, A., Kruglyak, L., Mardis, E., Rotimi, C.N., Slatkin, M., Valle, D., Whittemore, A.S., Boehnke, M., Clark, A.G., Eichler, E.E., Gibson, G., Haines, J.L., Mackay, T.F.C., McCarroll, S.A., and Visscher, P.M. (2009). Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461, 747–753.
- Marshall, J.C., and Reinhart, K. (2009). Biomarkers of sepsis: *Crit. Care Med.* 37, 2290–2298.

Bibliographie

- Martin, G.S., Mannino, D.M., Eaton, S., and Moss, M. (2003). The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1546–1554.
- Martinon, F. (2007). Detection of immune danger signals by NALP3. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 507–511.
- Martinon, F., and Tschopp, J. (2005). NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol.* **26**, 447–454.
- Martinon, F., Mayor, A., and Tschopp, J. (2009). The Inflammasomes: Guardians of the Body. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 229–265.
- Mattioli, I., Sebald, A., Bucher, C., Charles, R.-P., Nakano, H., Doi, T., Kracht, M., and Schmitz, M.L. (2004). Transient and Selective NF- κ B p65 Serine 536 Phosphorylation Induced by T Cell Costimulation Is Mediated by IB Kinase and Controls the Kinetics of p65 Nuclear Import. *J. Immunol.* **172**, 6336–6344.
- Mattsson, E., Rollof, J., Verhoef, J., Van Dijk, H., and Fleer, A. (1994). Serum-Induced Potentiation of Tumor Necrosis Factor Alpha Production by Human Monocytes in Response to Staphylococcal Peptidoglycan: Involvement of Different Serum Factors. *Infect. Immun.* **62**, 3837–3843.
- Matzinger, P. (2002). An Innate Sense of Danger. *Ann N Acad Sci* **961**, 341–342.
- Mazerolles, F., and Fischer, A. (1998). Binding of CD4 ligands induces tyrosine phosphorylation of phosphatidylinositol-3 kinase p110 subunit. *Int. Immunol.* **10**, 1897–1905.
- McGettrick, A.F., and O'Neill, L.A. (2010). Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 20–27.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**, 819–826.
- Medzhitov, R., and Horng, T. (2009). Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 692–703.
- Melcher, M., Raberger, J., Schmidt, U., Unger, B., and Ellmeier, W. (2007). The Role of Tec Family Kinases in Inflammatory Processes. *Anti-Inflamm. Anti-Allergy Agents Med. Chem. Former. Curr. Med. Chem.-Anti-Inflamm. Anti-Allergy Agents* **6**, 61–69.
- Meng, F., and Lowell, C.A. (1997). Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J. Exp. Med.* **185**, 1661–1670.
- Meng, Z., Simmons-Willis, T.A., and Limbach, P.A. (2004). The use of mass spectrometry in genomics. *Biomol. Eng.* **21**, 1–13.
- Meylan, E., Tschopp, J., and Karin, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* **442**, 39–44.
- Mogensen, T.H. (2009). Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 240–273.
- Mogensen, T.H., and Paludan, S.R. (2005). Reading the viral signature by Toll-like receptors and other pattern recognition receptors. *J. Mol. Med.* **83**, 180–192.

Bibliographie

- Mommen, G.P.M., Meiring, H.D., Heck, A.J.R., and de Jong, A.P.J.M. (2013). Mixed-Bed Ion Exchange Chromatography Employing a Salt-Free pH Gradient for Improved Sensitivity and Compatibility in MudPIT. *Anal. Chem.* **85**, 6608–6616.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**, 2348–2357.
- Motoyama, M., Yamazaki, S., Eto-Kimura, A., Takeshige, K., and Muta, T. (2004). Positive and Negative Regulation of Nuclear Factor- κ B-mediated Transcription by I κ B β , an Inducible Nuclear Protein. *J. Biol. Chem.* **280**, 7444–7451.
- Murakami, H., Hohsaka, T., and Sisido, M. (2002). Random insertion and deletion of arbitrary number of bases for codon-based random mutation of DNAs. *Nat. Biotechnol.* **20**, 76–81.
- Murphy, K.P., Janeway, C.A., Travers, P., Mowat, A., and Weaver, C.T. (2012). *Janeway's Immunobiology* (London: Garland Science).
- Musselman, C.A., Lalonde, M.-E., Côté, J., and Kutateladze, T.G. (2012). Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 1218–1227.
- Mustelin, T., Vang, T., and Bottini, N. (2005). Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 43–57.
- Nachman, M.W., and Crowell, S.L. (2000). Estimate of the Mutation Rate per Nucleotide in Humans. *Genet. Soc. Am.* **156**, 297–304.
- Nag, K., and Chaudhary, A. (2009). Mediators of tyrosine phosphorylation in innate immunity: From host defense to inflammation onto oncogenesis. *Curr. Signal Transduct. Ther.* **4**, 76.
- Nagaika, I., Hirota, S., Niyonsaba, F., Hirata, M., Adachi, Y., Tamura, H., and Heumann, D. (2001). Cathelicidin Family of Antibacterial Peptides CAP18 and CAP11 Inhibit the Expression of TNF- α by Blocking the Binding of LPS to CD14⁺ Cells. *J. Immunol.* **167**, 3329–3338.
- Nagaishi, T., Pao, L., Lin, S.-H., Iijima, H., Kaser, A., Qiao, S.-W., Chen, Z., Glickman, J., Najjar, S.M., Nakajima, A., Neel, B.G., and Blumberg, R.S. (2006). SHP1 Phosphatase-Dependent T Cell Inhibition by CEACAM1 Adhesion Molecule Isoforms. *Immunity* **25**, 769–781.
- Namath, A., and Patterson, A.J. (2009). Genetic Polymorphisms in Sepsis. *Crit. Care Clin.* **25**, 835–856.
- Napetschnig, J., and Wu, H. (2013). Molecular Basis of NF- κ B Signaling. *Annu. Rev. Biophys.* **42**, 443–468.
- Narjoz, C., Beaune, P., and de Waziers, I. (2010). Idiosyncratiques et « omiques » peuvent-ils rimer ? *Med Sci Paris* **26**, 641–646.
- Nathan, C., and Ding, A. (2010). Nonresolving Inflammation. *Cell* **140**, 871–882.
- Natsumeda, Y., Ohno, S., Kawasaki, H., Konno, Y., Weber, G., and Suzuki, K. (1990). Two distinct cDNAs for human IMP dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **265**, 5292–5295.
- Neel, B.G., Gu, H., and Pao, L. (2003). The “Shp”ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 284–293.

Bibliographie

- Nielsen, P.E., and Egholm, M. (1999). An introduction to peptide nucleic acid. *Curr Issues Mol Biol* *1*, 89–104.
- Nimmegern, E., Fox, T., Fleming, M.A., and Thomson, J.A. (1996). Conformational Changes and Stabilization of Inosine 5*- Monophosphate Dehydrogenase Associated with Ligand Binding and Inhibition by Mycophenolic Acid. *J. Biol. Chem.* *271*, 19421–19427.
- Novak, I. (2003). ATP as a signaling molecule: the exocrine focus. *Physiology* *18*, 12–17.
- Novartis Pharmaceuticals Corporation (2013). Myfortic ® prescribing information.
- O'Neill, L.A.J., and Bowie, A.G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 353–364.
- Oetting, W.S., Schladt, D.P., Leduc, R.E., Jacobson, P.A., Guan, W., Matas, A.J., Israni, A., and DeKAF Investigators (2011). Validation of single nucleotide polymorphisms associated with acute rejection in kidney transplant recipients using a large multi-center cohort. *Transpl. Int.* *24*, 1231–1238.
- Ogino, S., Kawasaki, T., Brahmandam, M., Cantor, M., Kirkner, G.J., Spiegelman, D., Makrigiorgos, G.M., Weisenberger, D.J., Laird, P.W., Loda, M., and Fuchs, C.S. (2006). Precision and Performance Characteristics of Bisulfite Conversion and Real-Time PCR (MethyLight) for Quantitative DNA Methylation Analysis. *J. Mol. Diagn.* *8*, 209–217.
- Ogris, M., and Wagner, E. (2011). To Be Targeted: Is the Magic Bullet Concept a Viable Option for Synthetic Nucleic Acid Therapeutics? *Hum. Gene Ther.* *22*, 799–807.
- Okutani, D., Lodyga, M., Han, B., and Liu, M. (2006). Src protein tyrosine kinase family and acute inflammatory responses. *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.* *291*, L129–L141.
- Olivier, M. (2005). The Invader® assay for SNP genotyping. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* *573*, 103–110.
- Ozcelik, H., Shi, X., Chang, M.C., Tram, E., Vlasschaert, M., Di Nicola, N., Kiselova, A., Yee, D., Goldman, A., Dowar, M., Sukhu, B., Kandel, R., and Siminovitch, K. (2012). Long-Range PCR and Next-Generation Sequencing of BRCA1 and BRCA2 in Breast Cancer. *J. Mol. Diagn.* *14*, 467–475.
- Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., and Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 13766–13771.
- Parsons, S.J., and Parsons, J.T. (2004). Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* *23*, 7906–7909.
- Pazik, J., Oldak, M., Podgórska, M., Lewandowski, Z., Sitarek, E., Płoski, R., Szmids, J., Chmura, A., Durlík, M., and Malejczyk, J. (2011). Lymphocyte Counts in Kidney Allograft Recipients Are Associated With IMPDH2 3757T>C Gene Polymorphism. *Transplant. Proc.* *43*, 2943–2945.
- Peck-Palmer, O.M., Unsinger, J., Chang, K.C., Davis, C.G., McDunn, J.E., and Hotchkiss, R.S. (2008). Deletion of MyD88 markedly attenuates sepsis-induced T and B lymphocyte apoptosis but worsens survival. *J. Leukoc. Biol.* *83*, 1009–1018.
- Pedra, J.H., Cassel, S.L., and Sutterwala, F.S. (2009). Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome. *Curr. Opin. Immunol.* *21*, 10–16.

Bibliographie

- Pene, F., Grimaldi, D., Zuber, B., Sauneuf, B., Rousseau, C., El Hachem, C., Martin, C., Belaidouni, N., Balloy, V., Mira, J.-P., and Chiche, J.-D. (2012). Toll-Like Receptor 2 Deficiency Increases Resistance to *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia in the Setting of Sepsis-Induced Immune Dysfunction. *J. Infect. Dis.* **206**, 932–942.
- Perkins, N.D. (2004). NF- κ B: tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol.* **14**, 64–69.
- Peterson, P., Org, T., and Rebane, A. (2008). Transcriptional regulation by AIRE: molecular mechanisms of central tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 948–957.
- Piccinini, A.M., and Midwood, K.S. (2010). DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling. *Mediators Inflamm.* **2010**, 1–21.
- Pike, L. (2004). Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J* **378**, 281–292.
- Pike, L.J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *J. Lipid Res.* **47**, 1597–1598.
- Pike, L.J. (2008). The challenge of lipid rafts. *J. Lipid Res.* **50**, S323–S328.
- Pimkin, M., and Markham, G.D. (2008). The CBS subdomain of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase regulates purine nucleotide turnover. *Mol. Microbiol.* **68**, 342–359.
- Pimkin, M., Pimkina, J., and Markham, G.D. (2009). A Regulatory Role of the Bateman Domain of IMP Dehydrogenase in Adenylate Nucleotide Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **284**, 7960–7969.
- Pisetsky, D.S. (2012). The origin and properties of extracellular DNA: From PAMP to DAMP. *Clin. Immunol.* **144**, 32–40.
- Pleiman, C.M., Hertz, W.M., and Cambier, A. (1994). Activation of Phosphatidylinositol-3' Kinase by Src-Family Kinase SH3 Binding to the p85 Subunit. *Sci.-AAAS-Wkly. Pap. Ed.- Guide Sci. Inf.* **263**, 1609–1612.
- Pobezinskaya, Y.L., Kim, Y.-S., Choksi, S., Morgan, M.J., Li, T., Liu, C., and Liu, Z. (2008). The function of TRADD in signaling through tumor necrosis factor receptor 1 and TRIF-dependent Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **9**, 1047–1054.
- Van der Poll, T., and Opal, S.M. (2009). Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *The Lancet* **374**, 1543–1556.
- Poltorak, A., Smirnova, I., He, X., Liu, M.-Y., Van Huffel, C., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Du, X., and Thompson, P. (1998). Genetic and Physical Mapping of the Lps Locus: Identification of the Toll-4 Receptor as a Candidate Gene in the Critical Region. *Blood Cells. Mol. Dis.* **24**, 340–355.
- Poltorak, A., Smirnova, I., Clisch, R., and Beutler, B. (2000). Limits of a deletion spanning Tlr4 in C57BL/10ScCr mice. *J. Endotoxin Res.* **6**, 51–56.
- Pomerantz, R.J., Feinberg, M.B., Trono, D., and Baltimore, D. (1990). Lipopolysaccharide is a potent monocyte/macrophage-specific stimulator of human immunodeficiency virus type 1 expression. *J. Exp. Med.* **172**, 253–261.
- Poole, A.W., and Jones, M.L. (2005). A SHPing tale: Perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail. *Cell. Signal.* **17**, 1323–1332.

Bibliographie

Pradere, J.-P., Dapito, D.H., and Schwabe, R.F. (2013). The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. *Oncogene*.

Prendes, M., Zheng, Y., and Beg, A.A. (2003). Regulation of developing B cell survival by RelA-containing NF- κ B complexes. *J. Immunol.* *171*, 3963–3969.

Prior, I.A., Harding, A., Yan, J., Sluimer, J., Parton, R.G., and Hancock, J.F. (2001). GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat. Cell Biol.* *3*, 368–375.

Proudfoot, A.G., McAuley, D.F., Hind, M., and Griffiths, M.J.D. (2011). Translational research: what does it mean, what has it delivered and what might it deliver? *Curr. Opin. Crit. Care* *17*, 495–503.

Qian, C., and Cao, X. (2013). Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses: Qian & Cao. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1283*, 67–74.

Raby, A.-C., Le Bouder, E., Colmont, C., Davies, J., Richards, P., Coles, B., George, C.H., Jones, S.A., Brennan, P., Topley, N., and Labeta, M.O. (2009). Soluble TLR2 Reduces Inflammation without Compromising Bacterial Clearance by Disrupting TLR2 Triggering. *J. Immunol.* *183*, 506–517.

Rajendran, L., and Simons, K. (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. *J. Cell Sci.* *118*, 1099–1102.

Ramphal, R., Balloy, V., Jyot, J., Verma, A., Si-Tahar, M., and Chignard, M. (2008). Control of *Pseudomonas aeruginosa* in the lung requires the recognition of either lipopolysaccharide or flagellin. *J. Immunol.* *181*, 586–592.

Rando, O.J. (2012). Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *22*, 148–155.

Ranoa, D.R.E., Kelley, S.L., and Tapping, R.I. (2013). Human Lipopolysaccharide-binding Protein (LBP) and CD14 Independently Deliver Triacylated Lipoproteins to Toll-like Receptor 1 (TLR1) and TLR2 and Enhance Formation of the Ternary Signaling Complex. *J. Biol. Chem.* *288*, 9729–9741.

Raouf, M., Zhang, Q., Itagaki, K., and Hauser, C.J. (2010). Mitochondrial Peptides Are Potent Immune Activators That Activate Human Neutrophils Via FPR-1. *J. Trauma- Inj. Infect. Crit. Care* *68*.

Reim, D., Westenfelder, K., Kaiser-Moore, S., Schlautkötter, S., Holzmann, B., and Weighardt, H. (2009). Role of T cells for cytokine production and outcome in a model of acute septic peritonitis. *Shock* *31*, 245–250.

Resh, M.D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* *1451*, 1–16.

Rhee, S.H., Kim, H., Moyer, M.P., and Pothoulakis, C. (2006). Role of MyD88 in Phosphatidylinositol 3-Kinase Activation by Flagellin/Toll-like Receptor 5 Engagement in Colonic Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 18560–18568.

Riethmuller, J., Riehle, A., Grassme, H., and Gulbins, E. (2006). Membrane rafts in host–pathogen interactions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1758*, 2139–2147.

Ringelhan, M., Schmid, R.M., and Geisler, F. (2012). The NF- κ B Subunit RelA/p65 Is Dispensable for Successful Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Mice. *PLoS ONE* *7*, e46469.

Ritis, K. (2004). Non-isotopic RNase cleavage assay for mutation detection in MEFV, the gene responsible for familial Mediterranean fever, in a cohort of Greek patients. *Ann. Rheum. Dis.* *63*, 438–443.

Bibliographie

- Rittirsch, D., Flierl, M.A., Nadeau, B.A., Day, D.E., Huber-Lang, M., Mackay, C.R., Zetoune, F.S., Gerard, N.P., Cianflone, K., Köhl, J., Gerard, C., Sarma, J.V., and Ward, P.A. (2008). Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nat. Med.* *14*, 551–557.
- Rogakou, E.P. (1998). DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *J. Biol. Chem.* *273*, 5858–5868.
- Romani, L. (2004). Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 11–24.
- Romppanen, E.-L. (2005). Oligonucleotide Ligation Assays for the Diagnosis of Inherited Diseases.
- Rossetti, S., Englisch, S., Bresin, E., Pignatti, P.F., and Turco, A.E. (1997). Detection of mutations in human genes by a new rapid method: cleavage fragment length polymorphism analysis (CFLPA). *Mol. Cell. Probes* *11*, 155–160.
- Rutz, S., and Scheffold, A. (2004). Towards in vivo application of RNA interference-new toys, old problems. *Arthritis Res. Ther.* *6*, 78–78.
- Saccani, S., Pantano, S., and Natoli, G. (2000). Two Waves of Nuclear Factor kappa B Recruitment to Target Promoters. *J. Exp. Med.* *193*, 1351–1359.
- Saito, T., and Yokosuka, T. (2006). Immunological synapse and microclusters: the site for recognition and activation of T cells. *Curr. Opin. Immunol.* *18*, 305–313.
- Sakurai, H. (1999). Ikappa B Kinases Phosphorylate NF-kappa B p65 Subunit on Serine 536 in the Transactivation Domain. *J. Biol. Chem.* *274*, 30353–30356.
- Salomao, R., Brunialti, M.K.C., Rapozo, M.M., Baggio-Zappia, G.L., Galanos, C., and Freudenberg, M. (2012). Bacterial Sensing, Cell Signaling, and Modulation of the Immune Response During Sepsis: *Shock* *38*, 227–242.
- Salomão, R., Martins, P.S., Brunialti, M.K.C., Fernandes, M. da L., Martos, L.S.W., Mendes, M.E., Gomes, N.E., and Rigato, O. (2008). TLR SIGNALING PATHWAY IN PATIENTS WITH SEPSIS: *Shock* *30*, 73–77.
- Sánchez-Mejorada, G., and Rosales, C. (1998). Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J. Leukoc. Biol.* *63*, 521–533.
- Sanjuan, M.A. (2006). CpG-induced tyrosine phosphorylation occurs via a TLR9-independent mechanism and is required for cytokine secretion. *J. Cell Biol.* *172*, 1057–1068.
- Sankarshanan, M., Ma, Z., Iype, T., and Lorenz, U. (2007). Identification of a novel lipid raft-targeting motif in Src homology 2-containing phosphatase 1. *J. Immunol.* *179*, 483–490.
- Santarlasci, V., Cosmi, L., Maggi, L., Liotta, F., and Annunziato, F. (2013). IL-1 and T Helper Immune Responses. *Front. Immunol.* *4*.
- Santos Sierra, S., Deshmuck, S.D., Kalnitski, J., Küenzi, P., Wymann, M.P., Golenboeck, D.T., and Henneke, P. (2009). Mal connects TLR2 to PI3Kinase activation and phagocyte polarization. *EMBO J.* *28*, 2018–2027.
- Sasaki, C.Y. (2005). Phosphorylation of RelA/p65 on Serine 536 Defines an I B -independent NF- B Pathway. *J. Biol. Chem.* *280*, 34538–34547.

Bibliographie

- Sato, K., Yang, X. -I., Yudate, T., Chung, J.-S., Wu, J., Luby-Phelps, K., Kimberly, R.P., Underhill, D., Cruz, P.D., and Ariizumi, K. (2006). Dectin-2 Is a Pattern Recognition Receptor for Fungi That Couples with the Fc Receptor Chain to Induce Innate Immune Responses. *J. Biol. Chem.* **281**, 38854–38866.
- Saukkonen, K., Lakkisto, P., Pettila, V., Varpula, M., Karlsson, S., Ruokonen, E., Pulkki, K., and for the Finnsepsis Study Group (2008). Cell-Free Plasma DNA as a Predictor of Outcome in Severe Sepsis and Septic Shock. *Clin. Chem.* **54**, 1000–1007.
- Savaryn, J.P., Catherman, A.D., Thomas, P.M., Abecassis, M.M., and Kelleher, N.L. (2013). The emergence of top-down proteomics in clinical research. *Genome Med.* **5**, 1–8.
- Scapini, P., Pereira, S., Zhang, H., and Lowell, C.A. (2009). Multiple roles of Lyn kinase in myeloid cell signaling and function. *Immunol. Rev.* **228**, 23–40.
- Scharenberg, A.M., and Kinet, J.-P. (1996). The emerging field of receptor-mediated inhibitory signaling: SHP or SHIP? *Cell* **87**, 961–964.
- Schenk, M., Belisle, J.T., and Modlin, R.L. (2009). TLR2 Looks at Lipoproteins. *Immunity* **31**, 847–849.
- Schoenfeld, D.A., and Bernard, G.R. (2002). Statistical evaluation of ventilator-free days as an efficacy measure in clinical trials of treatments for acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med.* **30**, 1772–1777.
- Schoske, R., Vallone, P.M., Ruitberg, C.M., and Butler, J.M. (2003). Multiplex PCR design strategy used for the simultaneous amplification of 10 Y chromosome short tandem repeat (STR) loci. *Anal. Bioanal. Chem.* **375**, 333–343.
- Sendide, K., Reiner, N.E., Lee, J.S., Bourgoin, S., Talal, A., and Hmama, Z. (2005). Cross-talk between CD14 and complement receptor 3 promotes phagocytosis of mycobacteria: regulation by phosphatidylinositol 3-kinase and cytohesin-1. *J. Immunol.* **174**, 4210–4219.
- Serhan, C.N. (2007). Resolution Phase of Inflammation: Novel Endogenous Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators and Pathways. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 101–137.
- Sethuraman, M., McComb, M.E., Huang, H., Huang, S., Heibeck, T., Costello, C.E., and Cohen, R.A. (2004). Isotope-Coded Affinity Tag (ICAT) Approach to Redox Proteomics: Identification and Quantitation of Oxidant-Sensitive Cysteine Thiols in Complex Protein Mixtures. *J. Proteome Res.* **3**, 1228–1233.
- Shah, S., Harwood, S.M., Döhler, B., Opelz, G., and Yaqoob, M.M. (2012). Inosine Monophosphate Dehydrogenase Polymorphisms and Renal Allograft Outcome. *Transplant. J.* **94**, 486–491.
- al-Shami, A., Bourgoin, S., and Naccache, P. (1997). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. I. Tyrosine phosphorylation-dependent stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase and inhibition by phorbol esters. **89**, 1035–1044.
- Shechter, D., Dormann, H.L., Allis, C.D., and Hake, S.B. (2007). Extraction, purification and analysis of histones. *Nat. Protoc.* **2**, 1445–1457.
- Sheedy, F.J., Palsson-McDermott, E., Hennessy, E.J., Martin, C., O’Leary, J.J., Ruan, Q., Johnson, D.S., Chen, Y., and O’Neill, L.A.J. (2009). Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat. Immunol.* **11**, 141–147.
- Shen, Y., Kawamura, I., Nomura, T., Tsuchiya, K., Hara, H., Dewamitta, S.R., Sakai, S., Qu, H., Daim, S., Yamamoto, T., and Mitsuyama, M. (2010). Toll-Like Receptor 2- and MyD88-Dependent

Bibliographie

Phosphatidylinositol 3-Kinase and Rac1 Activation Facilitates the Phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by Murine Macrophages. *Infect. Immun.* **78**, 2857–2867.

Shim, M.S., and Kwon, Y.J. (2010). Efficient and targeted delivery of siRNA in vivo: In vivo siRNA delivery. *FEBS J.* **277**, 4814–4827.

Shin, D.-M., Yang, C.-S., Lee, J.-Y., Lee, S.J., Choi, H.-H., Lee, H.-M., Yuk, J.-M., Harding, C.V., and Jo, E.-K. (2008). Mycobacterium tuberculosis lipoprotein-induced association of TLR2 with protein kinase C ζ in lipid rafts contributes to reactive oxygen species-dependent inflammatory signalling in macrophages. *Cell. Microbiol.* **10**, 1893–1905.

Shin, D.-M., Yuk, J.-M., Lee, H.-M., Lee, S.-H., Son, J.W., Harding, C.V., Kim, J.-M., Modlin, R.L., and Jo, E.-K. (2010). Mycobacterial lipoprotein activates autophagy via TLR2/1/CD14 and a functional vitamin D receptor signalling: Mycobacterial lipoprotein induces autophagy. *Cell. Microbiol.* **12**, 1648–1665.

Shouten, J.P., McElgunn, C.J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., and Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* **57–70**.

Shu, Q., and Nair, V. (2008). Inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) as a target in drug discovery. *Med. Res. Rev.* **28**, 219–232.

Sikkema-Raddatz, B., Johansson, L.F., de Boer, E.N., Almomani, R., Boven, L.G., van den Berg, M.P., van Spaendonck-Zwarts, K.Y., van Tintelen, J.P., Sijmons, R.H., Jongbloed, J.D.H., and Sinke, R.J. (2013). Targeted Next-Generation Sequencing can Replace Sanger Sequencing in Clinical Diagnostics. *Hum. Mutat.* **34**, 1035–1042.

Simmons, D.P., Canaday, D.H., Liu, Y., Li, Q., Huang, A., Boom, W.H., and Harding, C.V. (2010). Mycobacterium tuberculosis and TLR2 Agonists Inhibit Induction of Type I IFN and Class I MHC Antigen Cross Processing by TLR9. *J. Immunol.* **185**, 2405–2415.

Simoneau, M., Boulanger, J., Coulombe, G., Renaud, M.-A., Duchesne, C., and Rivard, N. (2008). Activation of Cdk2 Stimulates Proteasome-dependent Truncation of Tyrosine Phosphatase SHP-1 in Human Proliferating Intestinal Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 25544–25556.

Simons, K., and Ehehalt, R. (2002). Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* **110**, 597–603.

Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–572.

Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev.* **1**, 31–41.

Sintchak, M.D., and Nimmesgern, E. (2000). The structure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors. *Immunopharmacology* **47**, 163–184.

Sintchak, M.D., Fleming, M.A., Futer, O., Raybuck, S.A., Chambers, S.P., Caron, P.R., Murcko, M.A., and Wilson, K.P. (1996). Structure and mechanism of inosine monophosphate dehydrogenase in complex with the immunosuppressant mycophenolic acid. *Cell* **85**, 921–930.

Slevogt, H., Zabel, S., Opitz, B., Hocke, A., Eitel, J., N'Guessan, P.D., Lucka, L., Riesbeck, K., Zimmermann, W., Zweigner, J., Temmesfeld-Wollbrueck, B., Suttorp, N., and Singer, B.B. (2008). CEACAM1 inhibits Toll-like receptor 2-triggered antibacterial responses of human pulmonary epithelial cells. *Nat. Immunol.* **9**, 1270–1278.

Bibliographie

Somani, A.-K., Yuen, K., Xu, F., Zhang, J., Branch, D.R., and Siminovitch, K.A. (2001). The SH2 domain containing tyrosine phosphatase-1 down-regulates activation of Lyn and Lyn-induced tyrosine phosphorylation of the CD19 receptor in B cells. *J. Biol. Chem.* 276, 1938–1944.

Sombogaard, F. (2010). *Pharmacodynamic Monitoring of Inosine Monophosphate Dehydrogenase Activity: A Basis For Optimized and Individualized Mycophenolate Mofetil Therapy* (Erasmus University Rotterdam).

Sombogaard, F., van Schaik, R.H.N., Mathot, R.A., Budde, K., van der Werf, M., Vulto, A.G., Weimar, W., Glander, P., Essioux, L., and van Gelder, T. (2009). Interpatient variability in IMPDH activity in MMF-treated renal transplant patients is correlated with IMPDH type II 3757T > C polymorphism. *Pharmacogenet. Genomics* 626–634.

Soong, G., Reddy, B., Sokol, S., Adamo, R., and Prince, A. (2004). TLR2 is mobilized into an apical lipid raft receptor complex to signal infection in airway epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 113, 1482–1489.

Sørensen, T.I.A., Nielsen, G.G., Andersen, P.K., and Teasdale, T.W. (1988). Genetic and Environmental Influences on Premature Death in Adult Adoptees. *N. Engl. J. Med.* 318, 727–732.

Stead, W.W., Senner, J.W., Reddick, W.T., and Lofgren, J.P. (1990). Radical differences in susceptibility to infection by *Mycobacterium tuberculosis*. *N. Engl. J. Med.* 322, 422–427.

Stewart, C.R., Stuart, L.M., Wilkinson, K., van Gils, J.M., Deng, J., Halle, A., Rayner, K.J., Boyer, L., Zhong, R., Frazier, W.A., Lacy-Hulbert, A., Khoury, J.E., Golenbock, D.T., and Moore, K.J. (2009). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat. Immunol.* 11, 155–161.

Stovall, S.H., Yi, A.-K., Meals, E.A., Talati, A.J., Godambe, S.A., and English, B.K. (2004). Role of vav1- and src-related Tyrosine Kinases in Macrophage Activation by CpG DNA. *J. Biol. Chem.* 279, 13809–13816.

Strassheim, D., Asehnoune, K., Park, J.-S., Kim, J.-Y., He, Q., Richter, D., Kuhn, K., Mitra, S., and Abraham, E. (2004). Phosphoinositide 3-Kinase and Akt Occupy Central Roles in Inflammatory Responses of Toll-Like Receptor 2-Stimulated Neutrophils. *J. Immunol.* 5727–5733.

Strober, W., Murray, P.J., Kitani, A., and Watanabe, T. (2005). Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 9–20.

Su, L., Cao, L., Zhou, R., Jiang, Z., Xiao, K., Kong, W., Wang, H., Deng, J., Wen, B., Tan, F., Zhang, Y., and Xie, L. (2013). Identification of Novel Biomarkers for Sepsis Prognosis via Urinary Proteomic Analysis Using iTRAQ Labeling and 2D-LC-MS/MS. *PLoS ONE* 8, e54237.

Summy, J.M., Trevino, J.G., Lesslie, D.P., Baker, C.H., Shakespeare, W.C., Wang, Y., Sundaramoorthi, R., Metcalf, C.A., Keats, J.A., Sawyer, T.K., and Gallick, G.E. (2005). AP23846, a novel and highly potent Src family kinase inhibitor, reduces vascular endothelial growth factor and interleukin-8 expression in human solid tumor cell lines and abrogates downstream angiogenic processes. *Mol. Cancer Ther.* 4, 1900–1911.

Suntharalingam, G., Perry, M.R., Ward, S., Brett, S.J., Castello-Cortes, A., Brunner, M.D., and Panoskaltzis, N. (2006). Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N. Engl. J. Med.* 355, 1018–1028.

Sutherland, A.M., and Walley, K.R. (2009). Bench-to-bedside review: Association of genetic variation with sepsis. *Crit Care* 13, 210.

Bibliographie

Syvänen, A.-C. (1999). From gels to chips: “minisequencing” primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. *Hum. Mutat.* **13**, 1–10.

Tabeta, K., Hoebe, K., Janssens Edith, Du, X., Georgel, P., Crozat, K., Mudd, S., Mann, N., Sovath, S., Goode, J., Shamel, L., Herskovits, A.A., Portnoy, D.A., Cooke, M., Tarantino, L.M., Wiltshire, T., Steinberg, B., Grinstein, S., and Beutler, B. (2006). The sensing of membrane microdomains based on pore-forming toxins. *Nat. Immunol.* **7**, 156–164.

Tacke, F., and Randolph, G.J. (2006). Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* **211**, 609–618.

Tada, H., Aiba, S., Shibata, K.-I., Ohteki, T., and Takada, H. (2005). Synergistic Effect of Nod1 and Nod2 Agonists with Toll-Like Receptor Agonists on Human Dendritic Cells To Generate Interleukin-12 and T Helper Type 1 Cells. *Infect. Immun.* **73**, 7967–7976.

Tada, Y., Koarada, S., Morito, F., Mitamura, M., Inoue, H., Suematsu, R., Ohta, A., Miyake, K., and Nagasawa, K. (2008). Toll-like receptor homolog RP105 modulates the antigen-presenting cell function and regulates the development of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **10**, R121.

Takahashi, K., Kawai, T., Kumar, H., Sato, S., Yonehara, S., and Akira, S. (2006). Cutting Edge: Roles of Caspase-8 and Caspase-10 in Innate Immune Responses to Double-Stranded RNA. *Immunology* **176**, 4520–4524.

Takahashi, K., Shibata, T., Akashi-Takamura, S., Kiyokawa, T., Wakabayashi, Y., Tanimura, N., Kobayashi, T., Matsumoto, F., Fukui, R., Kouro, T., Nagai, Y., Takatsu, K., Saitoh, S. -i., and Miyake, K. (2007). A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses. *J. Exp. Med.* **204**, 2963–2976.

Takahashi, K., Chang, W.-C., Takahashi, M., Pavlov, V., Ishida, Y., La Bonte, L., Shi, L., Fujita, T., Stahl, G.L., and Van Cott, E.M. (2011). Mannose-binding lectin and its associated proteases (MASPs) mediate coagulation and its deficiency is a risk factor in developing complications from infection, including disseminated intravascular coagulation. *Immunobiology* **216**, 96–102.

Takahasi, K., Yoneyama, M., Nishihori, T., Hirai, R., Kumeta, H., Narita, R., Gale, M., Inagaki, F., and Fujita, T. (2008). Nonself RNA-Sensing Mechanism of RIG-I Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. *Mol. Cell* **29**, 428–440.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* **140**, 805–820.

Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**, 443–451.

Takezako, N., Hayakawa, M., Hayakawa, H., Aoki, S., Yanagisawa, K., Endo, H., and Tominaga, S. (2006). ST2 suppresses IL-6 production via the inhibition of I κ B degradation induced by the LPS signal in THP-1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 425–432.

Tan, S.-L., Liao, C., Lucas, M.C., Stevenson, C., and DeMartino, J.A. (2013). Targeting the SYK–BTK axis for the treatment of immunological and hematological disorders. *Pharmacol. Ther.* **138**, 294–309.

Tanaka, T., Grusby, M.J., and Kaisho, T. (2007). PDLIM2-mediated termination of transcription factor NF- κ B activation by intranuclear sequestration and degradation of the p65 subunit. *Nat. Immunol.* **8**, 584–591.

Bibliographie

Tang, B.M.P., McLean, A.S., Dawes, I.W., Huang, S.J., and Lin, R.C.Y. (2009). Gene-expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in sepsis*: *Crit. Care Med.* **37**, 882–888.

Tanimura, N., Saitoh, S., Matsumoto, F., Akashi-Takamura, S., and Miyake, K. (2008). Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **368**, 94–99.

Taylor, P.R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H.-H., Brown, G.D., and Gordon, S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 901–944.

Tenoever, B.R., Ng, S.-L., Chua, M.A., McWhirter, S.M., Garcia-Sastre, A., and Maniatis, T. (2007). Multiple Functions of the IKK-Related Kinase IKK in Interferon-Mediated Antiviral Immunity. *Science* **315**, 1274–1278.

Texereau, J., Chiche, J.-D., Taylor, W., Choukroun, G., Comba, B., and Mira, J.-P. (2005). The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clin. Infect. Dis.* **41**, S408–S415.

Thye, T., Vannberg, F.O., Wong, S.H., Owusu-Dabo, E., Osei, I., Gyapong, J., Sirugo, G., Sisay-Joof, F., Enimil, A., Chinbuah, M.A., Floyd, S., Warndorff, D.K., Sichali, L., Malema, S., Crampin, A.C., Ngwira, B., Teo, Y.Y., Small, K., Rockett, K., Kwiatkowski, D., Fine, P.E., Hill, P.C., Newport, M., Lienhardt, C., Adegbola, R.A., Corrah, T., Ziegler, A., Morris, A.P., Meyer, C.G., Horstmann, R.D., and Hill, A.V.S. (2010). Genome-wide association analyses identifies a susceptibility locus for tuberculosis on chromosome 18q11.2. *Nat. Genet.* **42**, 739–741.

Tian, Z., Tolic, N., Zhao, R., Moore, R.J., Hengel, S.M., Robinson, E.W., Stenoien, D.L., Wu, S., Smith, R.D., and Pasa-Tolic, L. (2012). Enhanced top-down characterization of histone post-translational modifications. *Genome Biol* **13**, R86.

Tiganis, T., and Bennett, A.M. (2007). Protein tyrosine phosphatase function: the substrate perspective. *Biochem. J.* **402**, 1.

Ting, J.P.-Y., Kastner, D.L., and Hoffman, H.M. (2006). CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 183–195.

Ting, J.P.-Y., Lovering, R.C., Alnemri, E.S., Bertin, J., Boss, J.M., Davis, B.K., Flavell, R.A., Girardin, S.E., Godzik, A., Harton, J.A., Hoffman, H.M., Hugot, J.-P., Inohara, N., MacKenzie, A., Maltais, L.J., Nunez, G., Ogura, Y., Otten, L.A., Philpott, D., Reed, J.C., Reith, W., Schreiber, S., Steimle, V., and Ward, P.A. (2008). The NLR Gene Family: A Standard Nomenclature. *Immunity* **28**, 285–287.

Toubiana, J. (2010). Signalisation de TLR2, organisation et variabilité de la réponse immunitaire innée. *Sciences. Paris Descartes*.

Toubiana, J., Courtine, E., Pène, F., Viallon, V., Asfar, P., Daubin, C., Rousseau, C., Chenot, C., Ouaz, F., Grimaldi, D., Cariou, A., Chiche, J.-D., and Mira, J.-P. (2010). IRAK1 functional genetic variant affects severity of septic shock. *Crit. Care Med.* **38**, 2287–2294.

Toubiana, J., Rossi, A.-L., Grimaldi, D., Belaidouni, N., Chafey, P., Clary, G., Courtine, E., Pene, F., Mira, J.-P., Claessens, Y.-E., and Chiche, J.-D. (2011). IMPDHIII Protein Inhibits Toll-like Receptor 2-mediated Activation of NF- κ B. *J. Biol. Chem.* **286**, 23319–23333.

Tracey, K.J. (2009). Reflex control of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 418–428.

Tran, J.C., Zamdborg, L., Ahlf, D.R., Lee, J.E., Catherman, A.D., Durbin, K.R., Tipton, J.D., Vellaichamy, A., Kellie, J.F., Li, M., Wu, C., Sweet, S.M.M., Early, B.P., Siuti, N., LeDuc, R.D., Compton,

Bibliographie

- P.D., Thomas, P.M., and Kelleher, N.L. (2011). Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics. *Nature* **480**, 254–258.
- Triantafilou, M., and Triantafilou, K. (2002). Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* **23**, 301–304.
- Triantafilou, M., Miyake, K., Golenbock, D.T., and Triantafilou, K. (2002). Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J. Cell Sci.* **115**, 2603–2611.
- Triantafilou, M., Brandenburg, K., Kusumoto, S., Fukase, K., Mackie, A., Seydel, U., and Triantafilou, K. (2004). Combinational clustering of receptors following stimulation by bacterial products determines lipopolysaccharide responses. *Biochem J* **381**, 527–536.
- Triantafilou, M., Gamper, F.G.J., Haston, R.M., Mouratis, M.A., Morath, S., Hartung, T., and Triantafilou, K. (2006). Membrane Sorting of Toll-like Receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 Heterodimers at the Cell Surface Determines Heterotypic Associations with CD36 and Intracellular Targeting. *J. Biol. Chem.* **281**, 31002–31011.
- Trinchieri, G., and Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 179–190.
- Troutman, T.D., Bazan, J.F., and Pasare, C. (2012). Toll-like receptors, signaling adapters and regulation of the pro-inflammatory response by PI3K. *Cell Cycle* **11**, 3559–3567.
- Tsongalis, G.J., Rainey, B.-J., and Hodges, K.A. (2001). READIT: A Novel Technology Used in the Interrogation of Nucleic Acid Sequences for Single-Nucleotide Polymorphisms. *Exp. Mol. Pathol.* **71**, 222–225.
- Tsujimoto, H., Ono, S., Efron, P.A., Scumpia, P.O., Moldawer, L.L., and Mochizuki, H. (2007). ROLE OF TOLL-LIKE RECEPTORS IN THE DEVELOPMENT OF SEPSIS: Shock 1.
- Tsukada, K., Kitazawa, T., Fukushima, A., Okugawa, S., Yanagimoto, S., Tatsuno, K., Koike, K., Nagase, H., Hirai, K., and Ota, Y. (2007). Macrophage tolerance induced by stimulation with Toll-like receptor 7/8 ligands. *Immunol. Lett.* **111**, 51–56.
- Turner, J.J.O., Smolinska, M.J., Sacre, S.M., and Foxwell, B.M.J. (2009). Induction of TLR Tolerance in Human Macrophages by Adiponectin: Does LPS Play a Role? *Scand. J. Immunol.* **69**, 329–336.
- Tuveson, D.A., Carter, R.H., Soltoff, S.P., and Fearon, D.T. (1993). CD19 of B cells as a surrogate kinase insert region to bind phosphatidylinositol 3-kinase. *Science* **260**, 986–989.
- Ulevitch, R.J. (2004). Therapeutics targeting the innate immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 512–520.
- Vance, R.E., Isberg, R.R., and Portnoy, D.A. (2009). Patterns of Pathogenesis: Discrimination of Pathogenic and Nonpathogenic Microbes by the Innate Immune System. *Cell Host Microbe* **6**, 10–21.
- Vannozzi, F., Filipponi, F., Di Paolo, A., Danesi, R., Urbani, L., Bocci, G., Catalano, G., De Simone, P., Mosca, F., and Del Tacca, M. (2004). An exploratory study on pharmacogenetics of inosine-monophosphate dehydrogenase II in peripheral mononuclear cells from liver-transplant recipients. *Transplant. Proc.* **36**, 2787–2790.
- Verbrugge, A., and Meyaard, L. (2005). Signaling by ITIM-bearing receptors. *Curr. Immunol. Rev.* **1**, 201–212.

Bibliographie

- Vermeulen, L., De Wilde, G., Van Damme, P., Berghe, W.V., and Haegeman, G. (2003). Transcriptional activation of the NF- κ B p65 subunit by mitogen-and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO J.* **22**, 1313–1324.
- Vester, B., and Wengel, J. (2004). LNA (Locked Nucleic Acid): High-Affinity Targeting of Complementary RNA and DNA †. *Biochemistry (Mosc.)* **43**, 13233–13241.
- Vianna, R.C.S., Gomes, R.N., Bozza, F.A., Amâncio, R.T., Bozza, P.T., David, C.M.N., and Castro-Faria-Neto, H.C. (2004). Antibiotic Treatment in a Murine Model of Sepsis: Impact on Cytokines and Endotoxin Release: *Shock* **21**, 115–120.
- Vieira, F.S., Corrêa, G., Einicker-Lamas, M., and Coutinho-Silva, R. (2010). Host-cell lipid rafts: a safe door for micro-organisms? *Biol. Cell* **102**, 391–407.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**, 503–510.
- Wacker, C., Prkno, A., Brunkhorst, F.M., and Schlattmann, P. (2013). Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.*
- Wald, D., Qin, J., Zhao, Z., Qian, Y., Naramura, M., Tian, L., Towne, J., Sims, J.E., Stark, G.R., and Li, X. (2003). SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor–interleukin 1 receptor signaling. *Nat. Immunol.* **4**, 920–927.
- Walzer, T. (2005). Natural-killer cells and dendritic cells: “l’union fait la force.” *Blood* **106**, 2252–2258.
- Wang, H. (1999). HMG-1 as a Late Mediator of Endotoxin Lethality in Mice. *Science* **285**, 248–251.
- Wang, J., and Richards, D.A. (2012). Segregation of PIP2 and PIP3 into distinct nanoscale regions within the plasma membrane. *Biol. Open* **1**, 857–862.
- Wang, D., Esselman, W.J., and Cole, P.A. (2002). Substrate Conformational Restriction and CD45-catalyzed Dephosphorylation of Tail Tyrosine-phosphorylated Src Protein. *J. Biol. Chem.* **277**, 40428–40433.
- Wang, D., Lou, J., Ouyang, C., Chen, W., Liu, Y., Liu, X., Cao, X., Wang, J., and Lu, L. (2010a). Ras-related protein Rab10 facilitates TLR4 signaling by promoting replenishment of TLR4 onto the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 13806–13811.
- Wang, J., Yang, J., Zeevi, A., Webber, S., Girnita, D., Selby, R., Fu, J., Shah, T., Pravica, V., Hutchinson, I., and Burckart, G. (2007). IMPDH1 Gene Polymorphisms and Association With Acute Rejection in Renal Transplant Patients. *Clin. Pharmacol.* **38** Ther. **83**, 711–717.
- Wang, L., Gordon, R.A., Huynh, L., Su, X., Min, K.-H.P., Han, J., Arthur, J.S., Kalliolias, G.D., and Ivashkiv, L.B. (2010b). Indirect Inhibition of Toll-like Receptor and Type I Interferon Responses by ITAM-Coupled Receptors and Integrins. *Immunity* **32**, 518–530.
- Wang, W., Liu, L., Song, X., Mo, Y., Komma, C., Bellamy, H.D., Zhao, Z.J., and Zhou, G.W. (2011). Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase SHP-1 in the open conformation. *J. Cell. Biochem.* **112**, 2062–2071.
- Wang, X., Zhang, Z., Louboutin, J.-P., Moser, C., Weiner, D.J., and Wilson, J.M. (2003). Airway epithelia regulate expression of human α -defensin 2 through toll-like receptor 2. *FASEB J.*

Bibliographie

- Waterman, P.M., and Cambier, J.C. (2010). The conundrum of inhibitory signaling by ITAM-containing immunoreceptors: Potential molecular mechanisms. *FEBS Lett.* **584**, 4878–4882.
- Weighardt, H., and Holzmann, B. (2008). Role of Toll-like receptor responses for sepsis pathogenesis. *Immunobiology* **212**, 715–722.
- Wen, H., Schaller, M.A., Dou, Y., Hogaboam, C.M., and Kunkel, S.L. (2007). Dendritic cells at the interface of innate and acquired immunity: the role for epigenetic changes. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 439–446.
- Whiteaker, J.R., Zhao, L., Zhang, H.Y., Feng, L.-C., Piening, B.D., Anderson, L., and Paulovich, A.G. (2007). Antibody-based enrichment of peptides on magnetic beads for mass-spectrometry-based quantification of serum biomarkers. *Anal. Biochem.* **362**, 44–54.
- Wieland, C.W., van Lieshout, M.H.P., Hoogendijk, A.J., and van der Poll, T. (2010). Host defence during *Klebsiella pneumoniae* relies on haematopoietic-expressed Toll-like receptors 4 and 2. *Eur. Respir. J.* **37**, 848–857.
- Willart, M.A.M., and Lambrecht, B.N. (2009). The danger within: endogenous danger signals, atopy and asthma. *Clin. Exp. Allergy* **39**, 12–19.
- Williams, D.L., Ha, T., Li, C., Kalbfleisch, J.H., Schweitzer, J., Vogt, W., and Browder, I.W. (2003). Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality*. *Crit. Care Med.* **31**, 1808–1818.
- Winnicki, W., Weigel, G., Sunder-Plassmann, G., Bajari, T., Winter, B., Herkner, H., and Sengoelge, G. (2009). An inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 2 single-nucleotide polymorphism impairs the effect of mycophenolic acid. *Pharmacogenomics J.* **10**, 70–76.
- Wong, S.W., Kwon, M.-J., Choi, A.M.K., Kim, H.-P., Nakahira, K., and Hwang, D.H. (2009). Fatty Acids Modulate Toll-like Receptor 4 Activation through Regulation of Receptor Dimerization and Recruitment into Lipid Rafts in a Reactive Oxygen Species-dependent Manner. *J. Biol. Chem.* **284**, 27384–27392.
- Wright, J.R. (2005). Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 58–68.
- Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T.A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A.L., Roeder, R.G., Brivanlou, A.H., and Allis, C.D. (2005). WDR5 Associates with Histone H3 Methylated at K4 and Is Essential for H3 K4 Methylation and Vertebrate Development. *Cell* **121**, 859–872.
- Xavier, R.J., and Rioux, J.D. (2008). Genome-wide association studies: a new window into immune-mediated diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 631–643.
- Xia, Z.-P., Sun, L., Chen, X., Pineda, G., Jiang, X., Adhikari, A., Zeng, W., and Chen, Z.J. (2009). Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. *Nature* **461**, 114–119.
- Xiao, W., Mindrinos, M.N., Seok, J., Cuschieri, J., Cuenca, A.G., Gao, H., Hayden, D.L., Hennessy, L., Moore, E.E., Minei, J.P., Bankey, P.E., Johnson, J.L., Sperry, J., Nathens, A.B., Billiar, T.R., West, M.A., Brownstein, B.H., Mason, P.H., Baker, H.V., Finnerty, C.C., Jeschke, M.G., Lopez, M.C., Klein, M.B., Gamelli, R.L., Gibran, N.S., Arnoldo, B., Xu, W., Zhang, Y., Calvano, S.E., McDonald-Smith, G.P., Schoenfeld, D.A., Storey, J.D., Cobb, J.P., Warren, H.S., Moldawer, L.L., Herndon, D.N., Lowry, S.F., Maier, R.V., Davis, R.W., Tompkins, R.G., and the Inflammation and Host Response to Injury Large-Scale Collaborative Research Program (2011). A genomic storm in critically injured humans. *J. Exp. Med.* **208**, 2581–2590.

Bibliographie

- Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, C.T., Semeraro, F., Taylor, F.B., Esmon, N.L., Lupu, F., and Esmon, C.T. (2009). Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat. Med.* *15*, 1318–1321.
- Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M.J., and Harrison, S.C. (1999). Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol. Cell* *3*, 629–638.
- Xu, Y., Harder, K.W., Huntington, N.D., Hibbs, M.L., and Tarlinton, D.M. (2005). Lyn Tyrosine Kinase. *Immunity* *22*, 9–18.
- Yakubovskaya, M.G., Belyakova, A.A., Gasanova, V.K., Belitsky, G.A., and Dolinnaya, N.G. (2010). Comparative reactivity of mismatched and unpaired bases in relation to their type and surroundings. Chemical cleavage of DNA mismatches in mutation detection analysis. *Biochimie* *92*, 762–771.
- Yamamoto, M., Yaginuma, K., Tsutsui, H., Sagara, J., Guan, X., Seki, E., Yasuda, K., Yamamoto, M., Akira, S., Nakanishi, K., Noda, T., and Taniguchi, S. (2004). ASC is essential for LPS-induced activation of procaspase-1 independently of TLR-associated signal adaptor molecules. *Genes Cells* *9*, 1055–1067.
- Yang, J., Liu, L., He, D., Song, X., Liang, X., Zao, Z.J., and Zhou, W. (2002a). Crystal Structure of Human Protein-tyrosine Phosphatase SHP-1. *J. Biol. Chem.* *278*, 6516–6520.
- Yang, W., Tabrizi, M., Berrada, K., and Yi, T. (1998). SHP-1 phosphatase C-terminus interacts with novel substrates p32/p30 during erythropoietin and interleukin-3 mitogenic responses. *Blood* *91*, 3746–3755.
- Yang, W., Tabrizi, M., and Yi, T. (2002b). A Bipartite NLS at the SHP-1 C-Terminus Mediates Cytokine-Induced SHP-1 Nuclear Localization in Cell Growth Control. *Blood Cells. Mol. Dis.* *28*, 63–74.
- Yang, W., Di Vizio, D., Kirchner, M., Steen, H., and Freeman, M.R. (2010). Proteome scale characterization of human S-acylated proteins in lipid raft-enriched and non-raft membranes. *Mol. Cell. Proteomics* *9*, 54–70.
- Yang, Y., Liu, B., Dai, J., Srivastava, P.K., Zammit, D.J., Lefrançois, L., and Li, Z. (2007). Heat Shock Protein gp96 Is a Master Chaperone for Toll-like Receptors and Is Important in the Innate Function of Macrophages. *Immunity* *26*, 215–226.
- Yi, T.L., Bolen, J.B., and Ihle, J.N. (1991). Hematopoietic cells express two forms of lyn kinase differing by 21 amino acids in the amino terminus. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 2391–2398.
- Yoneyama, M., and Fujita, T. (2008). Structural Mechanism of RNA Recognition by the RIG-I-like Receptors. *Immunity* *29*, 178–181.
- Yoneyama, M., and Fujita, T. (2009). RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunol. Rev.* *227*, 54–65.
- Yoshizaki, F., Nakayama, H., Iwahara, C., Takamori, K., Ogawa, H., and Iwabuchi, K. (2008). Role of glycosphingolipid-enriched microdomains in innate immunity: Microdomain-dependent phagocytic cell functions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1780*, 383–392.
- Yoza, B.K., Hu, J.Y.-Q., Cousart, S.L., Forrest, L.M., and McCall, C.E. (2006). Induction of RelB participates in endotoxin tolerance. *J. Immunol.* *177*, 4080–4085.
- Zajchowski, L.D., and Robbins, S.M. (2002). Lipid rafts and little caves. *Eur. J. Biochem.* *269*, 737–752.

Bibliographie

- Zech, T., Ejsing, C.S., Gaus, K., de Wet, B., Shevchenko, A., Simons, K., and Harder, T. (2009). Accumulation of raft lipids in T-cell plasma membrane domains engaged in TCR signalling. *EMBO J.* **28**, 466–476.
- Zhang, L., Poh, C.F., Williams, M., Laronde, D.M., Berean, K., Gardner, P.J., Jiang, H., Wu, L., Lee, J.J., and Rosin, M.P. (2012). Loss of Heterozygosity (LOH) Profiles--Validated Risk Predictors for Progression to Oral Cancer. *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* **5**, 1081–1089.
- Zhang, Q., Raoof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., and Hauser, C.J. (2010). Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* **464**, 104–107.
- Zhang, X., Kimura, Y., Fang, C., Zhou, L., Sfyroera, G., Lambris, J.D., Wetsel, R.A., Miwa, T., and Song, W.-C. (2007). Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by complement in vivo. *Blood* **110**, 228–236.
- Zhang, X., He, K., Duan, Z., Zhou, J., Yu, Z., Ni, Y., and Lu, C. (2009). Identification and characterization of inosine 5-monophosphate dehydrogenase in *Streptococcus suis* type 2. *Microb. Pathog.* **47**, 267–273.
- Zhang, Z., Shen, K., Lu, W., and Cole, P.A. (2002). The Role of C-terminal Tyrosine Phosphorylation in the Regulation of SHP-1 Explored via Expressed Protein Ligation. *J. Biol. Chem.* **278**, 4668–4674.
- Zhao, C., Wang, I., and Lehrer, R.I. (1996). Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett.* **396**, 319–322.
- Zhong, H., E. Voll, R., and Ghosh, S. (1998). Phosphorylation of NF-kappaB p65 by PKA Stimulates Transcriptional Activity by Promoting a Novel Bivalent Interaction with the Coactivator CBP/p300.
- Zimmermann, A.G., Sychala, J., and Mitchell, B.S. (1995). Characterisation of the Human Inosine-5'-monophosphate Dehydrogenase Type II Gene. *J. Biol. Chem.* 6808–6814.
- Zunt, S.L., Burton, L.V., Goldblatt, L.I., Dobbins, E.E., and Srinivasan, M. (2009). Soluble forms of Toll-like receptor 4 are present in human saliva and modulate tumour necrosis factor- α secretion by macrophage-like cells. *Clin. Exp. Immunol.* **156**, 285–293.

Annexes

1. La recherche expérimentale

1.1. La protéomique

Outre la régulation des organismes par leur génome, le protéome (ensemble des protéines) joue un rôle essentiel, notamment aux niveaux du métabolome (les métabolismes dans leur ensemble) et du signalosome (la signalisation dans sa totalité). Les protéines et leurs fonctions sont étudiées par une approche spécifique, la protéomique. Les outils sont fondés sur la préparation des échantillons, éventuellement leur séparation (électrophorèse bi-dimensionnelle par exemple), leurs analyses, comme par spectrométrie de masse puis le traitement des données par bioinformatique.

L'électrophorèse à deux dimensions (2D-PAGE) est une technique qui permet de séparer les protéines d'un échantillon en condition dénaturante selon leur point isoélectrique puis selon leur masse moléculaire. Les protéines sont visualisées par des colorants spécifiques (Bleu de Coomassie, nitrate d'argent, fluorescence : Cy3/Cy5, ruthénium) variables selon la sensibilité et les technologies employées ultérieurement. Ils permettent d'observer, sans les identifier, des changements dans la masse moléculaire ou la charge des protéines. Ces variations permettent de prédire certaines des modifications post-traductionnelles. Le système de *difference gel electrophoresis* (DIGE) est une amélioration de la 2D-PAGE utilisant le marquage des protéines par des dérivés de cyanine (Cy2, Cy3, Cy5). Cette technique permet de comparer les protéines de plusieurs échantillons sur un même gel, voire d'apprécier l'augmentation ou la diminution de protéines issues de protéomes de conditions différentes.

La spectrométrie de masse (MS) nécessite un spectromètre de masse qui comporte une source, un analyseur et un détecteur (Figure A1). Il existe des variantes pour chacun de ces éléments, ce qui donne accès à différentes approches : ascendante (*bottom up*) et descendante (*top down*). Les analyses protéomiques se font selon le niveau de complexité : peptide, protéine entière, complexe multi-protéique (Compton and Kelleher, 2012). La protéomique ascendante implique que les protéines présentes dans l'échantillon soient déduites à partir des peptides identifiés. La limite de cette approche est que la digestion de la protéine en peptides entraîne une perte d'information, notamment celle portée par la conformation et les modifications post-traductionnelles (Musselman et al., 2012). L'approche descendante permet d'analyser les protéines sans digestion enzymatique préalable mais

nécessite des protéines ou des complexes protéiques préalablement purifiés (Auffray et al., 2013; Fenn et al., 1989; Savaryn et al., 2013; Tran et al., 2011). Cette technique peut être associée à d'autres méthodes d'analyse comme la cytométrie en flux, pour l'étude cellulaire des déficits immunitaires par exemple (Ahlf et al., 2012; Savaryn et al., 2013; Tian et al., 2012).

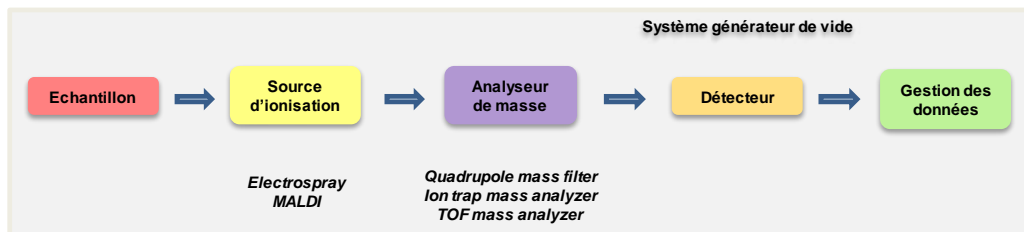


Figure A1. Système de spectrométrie de masse. Il est composé d'une source avec un système d'ionisation, d'un analyseur de masse, puis d'un détecteur. L'ensemble fonctionne sous vide. D'après Ameziane et al., Elsevier[®], 2005.

La protéomique quantitative permet d'étudier les variations de l'expression des protéines. La *label free quantitation*, les MeCATs (*metal-coded tags*), le *N-terminal labelling*, le SILAC (*stable isotope labeling with amino acids in cell culture*) ou le marquage isobarique permettent ainsi d'analyser les différences relatives entre les protéines de plusieurs échantillons. L'iTRAQ (*isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*) est une technologie de marquage isobarique donnant, au final, des peptides de même masse mais dont les ions émis après fragmentation sont de masses différentes (Bergmann et al., 2012; Evans et al., 2012; Ma et al., 2008).

Outre les techniques citées précédemment, la protéomique offre d'autres approches comme la séparation sans gels et les puces à protéines, qui peuvent être adaptées à des études à grande échelle sur des échantillons complexes. La séparation sans gel (MuDPIT (*multidimensional protein identification technology*) et l'ICAT[®] (*isotope-coded affinity tag*)) remplacent l'électrophorèse bi-dimensionnelle par deux colonnes d'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) associées à un spectromètre de masse (Mommen et al., 2013; Sethuraman et al., 2004). Quant aux techniques des puces à protéines (SELDI-TOF MS (*Surface-enhanced laser desorption/ionisation time-of-flight MS*), MSI (MS imaging)), elles peuvent être couplées à une analyse par MS.

1.2. La génomique

Les caractères phénotypiques, point de départ de la génétique classique, sont le fruit de l'action des protéines mais trahissent l'existence de gènes. Le but de la génomique est de les identifier. Pour ce faire, les techniques de séquençages ont offert de grandes perspectives dans l'identification et la caractérisation des gènes et de leurs polymorphismes. La réponse à l'infection a tout d'abord été étudiée à travers la génétique classique, qui a permis de mieux caractériser la reconnaissance des pathogènes à travers la découverte des TLRs et de leur signalisation (Hoebe and Beutler, 2008; Poltorak et al., 2000). Cependant, cette approche est limitée dans le décryptage des phénomènes complexes de l'infection, qui exige de créer des phénotypes nouveaux. C'est le rôle de la mutagenèse, notamment celle des lignées germinales de mammifères, tels que les souris. Les individus ainsi obtenus permettent d'étudier les gènes requis dans la résolution d'une infection, selon deux approches : la génétique « forward » et la génétique « reverse » (Figure A2) (Beutler, 2002; Beutler et al., 2003).

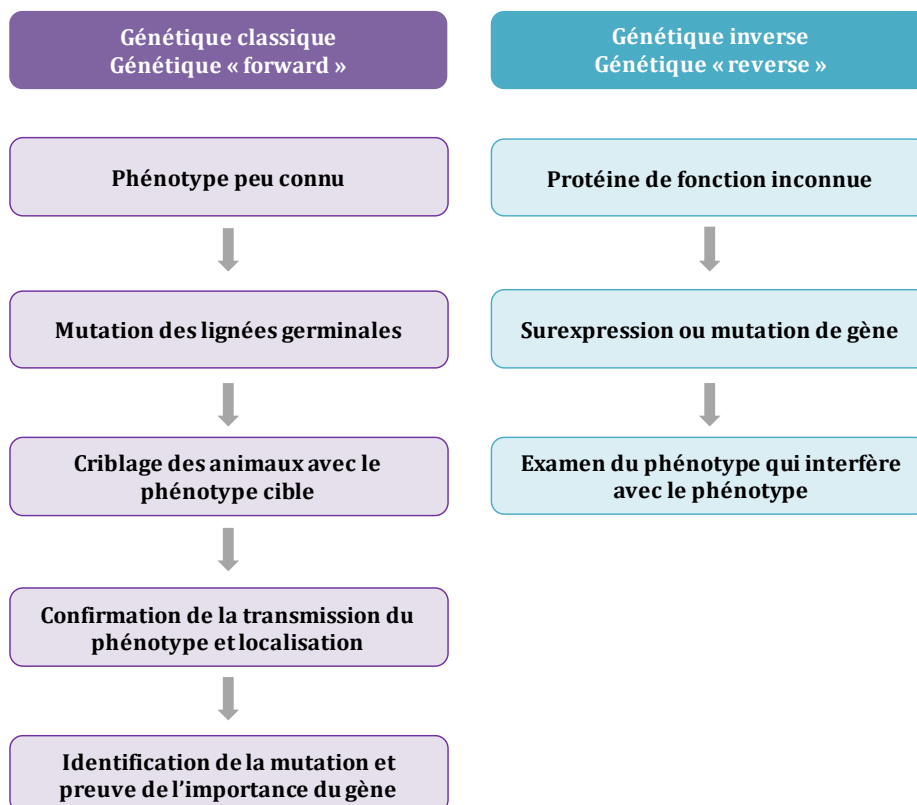


Figure A2. Applications pratiques des génétiques classique et inverse. Le principe de la génétique classique est fondé sur l'identification de la mutation à l'origine d'un phénotype connu. En revanche, celui de la génétique inverse est fondé sur l'identification du phénotype induit par une protéine d'intérêt.
D'après Beutler B, *Critical Care*, 2003.

1.2.1. La génétique inverse

La génétique inverse est fondée sur l'étude de l'impact de la mutation spécifique d'un gène sur le phénotype de l'organisme ou du type cellulaire. Cette approche requiert de nombreux prérequis comme une grande collection de mutants ainsi que la connaissance du génome et de son expression. Le processus d'altération du génome peut être ciblé (extinction de gène, recombinaison homologue) ou aléatoire (mutagenèse chimique, mutagenèse médiée par transposon).

La mutagenèse dirigée repose sur la connaissance préalable du gène et de la protéine responsable du phénotype que l'on souhaite étudier. Elle dépend essentiellement des avancées en biologie moléculaire. Une approche expérimentale intéressante est la technique d'interférence par ARN, qui est un processus par lequel le gène d'intérêt est ciblé par des ARNs sens et anti-sens (Kuttenkeuler and Boutros, 2004). Cette technique est applicable sur de multiples types cellulaires et a permis de générer de nombreux phénotypes de perte de fonction (Kuttenkeuler and Boutros, 2004; Rutz and Scheffold, 2004). En routine, les modes d'interférence impliquent surtout l'usage de *small interfering* ARNs (siARNs) (Dillin, 2003). Le côté transitoire de l'effet nous permet d'étudier, sur une période prédéterminée, des phénotypes non-viables. Pour l'observation longue d'un phénotype interférent, des techniques exploitant des vecteurs sont utilisées comme les cassettes siARN, les vecteurs plasmidiques (*short hairpin* ARN (shARN)) et les vecteurs viraux (Ogris and Wagner, 2011; Shim and Kwon, 2010). Les modèles animaux sont de bons outils pour l'observation des phénotypes sur des organismes entiers. Ils sont générés par transgénèse et par clonage (Hickman-Davis and Davis, 2006). Il est ainsi possible d'obtenir des modèles de type *knock out* (extinction de l'expression du gène d'intérêt), *knock in* (le gène d'intérêt est remplacé par un autre) et *knock down* (le transgène est un shARN) (Brown et al., 2011; Hickman-Davis and Davis, 2006; Kass et al., 2013; Manis, 2007). Cependant, au vu du caractère complexe des pathologies humaines, une approche ciblée ne permettra pas de comprendre leurs fonctionnements. Une approche par criblage aléatoire de phénotypes d'intérêts permet d'obtenir de nouveaux acteurs inattendus.

La mutagenèse aléatoire consiste en des mutations spontanées des lignées germinales de type substitution de l'ordre de la centaine de nucléotides. Elles génèrent l'introduction de variation de un ou deux nucléotides codants (Nachman and Crowell, 2000). Physiologiquement, les changements phénotypiques résultent de mutations aléatoires qui sont à l'origine de l'immense variabilité des phénotypes humains. Dans les souris, le niveau de

mutation aléatoire est généralement plus grand que chez l'Homme mais un criblage est requis pour identifier les changements de phénotype. Les problèmes génétiques y sont aussi plus faciles à détecter, c'est pourquoi, malgré leurs limites, ces modèles facilitent l'élucidation des phénomènes. La génération de lignées germinales de modèles murins peut se faire par plusieurs approches comme la mutagenèse insertionnelle, médiée par transposon, ou la mutagenèse chimique (TILLING, Targeting Induced Local Lesions in Genomes) (Hiraga and Arnold, 2003; Hoeller et al., 2008; Jones, 2005; Murakami et al., 2002). Par exemple, la mutagenèse chimique a permis au département d'Immunologie de La Jolla (US) de caractériser certains des gènes impliqués dans la phagocytose de *P. aeruginosa*, la réponse à certains PAMPs (LPS, lipide A, Cytosine-phosphodiester-guanine, Flagelline), la tolérance au LPS, la cytotoxicité des macrophages induite par le LPS et la résistance à *P. aeruginosa* (Beutler et al., 2003).

1.2.2. La génétique « forward »

La génétique classique ou génétique « forward » est fondée sur l'observation d'un phénotype, suivie de l'identification de la fonction d'un gène et de son produit. La comparaison des génomes montre que la variabilité inter-individuelle dans la défense contre les pathogènes peut être due à des modifications dans la séquence des acides nucléiques (polymorphisme) ou dans l'accessibilité au gène (épigénétique) (Alkan et al., 2011). Procéder au criblage des gènes, à la recherche de polymorphismes, requiert donc des techniques de séquençage, de détection des mutations ou des modifications épigénétiques (Ameziane et al., 2005). Le séquençage est une approche, à la base de toute la génétique « forward », qui permet de lire ce code en utilisant principalement une approche enzymatique comme la méthode Sanger (Huang et al., 2011) ou les techniques chimiques comme celle de Maxam et Gilbert (Sikkema-Raddatz et al., 2013). A l'exception de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) en milieu dénaturant, les techniques de détection des mutations sont fondées sur les propriétés de migration de l'ADN sur gel (agarose, acrylamide) dénaturant ou non-dénaturant (Brown, 2001; Casadei et al., 2001; Hawkins and Hoffman, 1999; Hestekin and Barron, 2006; Liu and Sommer, 1994; Luce et al., 1995; Ritis, 2004; Rossetti et al., 1997; Schoske et al., 2003; Yakubovskaya et al., 2010). Les modifications épigénétiques ont été identifiées comme étant des régulateurs de la réponse inflammatoire. Ce sont des modifications chimiques héréditaires et réversibles de l'ADN sans modification de sa séquence. Elles induisent une variation de l'expression d'un ou plusieurs gènes (modification du

phénotype sans modification du génotype) (Medzhitov and Horng, 2009; Wen et al., 2007; Xu et al., 2009). Elles ont pour origine la méthylation de l'ADN et les modifications des histones (Musselman et al., 2012). La méthylation de l'ADN est étudiée grâce à quatre technologies : le MeDIP-seq (*Methylated DNA immunoprecipitation sequencing*), la MethylCap-seq (*Methylated DNA capture by affinity purification*), le RRBS (*Reduced representation bisulfite sequencing*) et l'étude par Infinium (*Infinium HumanMethylation 27 assay*) (Bock et al., 2010; Clark et al., 2006; Darst et al., 2010; Dupont et al., 2004; Herman et al., 1996; Korshunova et al., 2007; Meng et al., 2004; Ogino et al., 2006). Les modifications des histones sont analysées en les séparant sur des critères de conformations, d'encombrements et de charges (Davey et al., 2002; Grün et al., 1988; Köhrer and RajBhandary, 2008; Kouzarides, 2007; Rogakou, 1998; Shechter et al., 2007; Wysocka et al., 2005). L'un des modèles de prédilection dans la compréhension du contrôle de la transcription et de l'inflammation est le programme de transcription induit par le LPS (Medzhitov and Horng, 2009; Wen et al., 2007; Xu et al., 2009).

2. La recherche translationnelle

La recherche translationnelle peut être définie comme un procédé par lequel les avancées et les innovations scientifiques sont incorporées à la clinique. Ses principaux objectifs sont de transposer rapidement les innovations scientifiques vers une meilleure prise en charge du patient pour faciliter la détection précoce des maladies, les pronostics et l'identification de cibles thérapeutiques. Dans sa forme la plus basique, elle analyse des échantillons humains à la recherche de marqueurs de la pathologie cible (Figure A3). En effet, les biomarqueurs sont des caractéristiques objectivement mesurables qui indiquent les processus biologiques, pathogéniques ou pharmacologiques (Bucher HC et al., 1999). La recherche des biomarqueurs a été associée avec une explosion des applications des technologies de « omique » haut-débit (Figure A4).

Si l'on prend l'exemple du sepsis, de nombreux candidats pour des biomarqueurs ont été évalués dans plus de 3000 études, cependant, leur utilité clinique est très limitée. Le sepsis est un syndrome complexe qui évolue rapidement. Ses conséquences dépendent de la réponse inflammatoire de l'hôte autant que des facteurs génétiques et environnementaux. Bien qu'il soit impossible qu'un seul biomarqueur soit suffisant, l'approche selon laquelle ils sont validés sur un mécanisme précis a fait émerger la procalcitonine (précurseur de la calcitonine)

comme un marqueur pronostic de la gravité de l'infection (Proudfoot et al., 2011; Wacker et al., 2013).

Le transfert de la paillasse au lit du patient reste encore peu courant. En effet, les modèles animaux précliniques sont simplistes et les propriétés physiopathologiques inhérentes à chaque espèce compliquent la généralisation des observations jusqu'à l'espèce humaine. Une méthode généralisée de transferts des bases scientifiques vers des thérapies efficaces fait encore gravement défaut (Proudfoot et al., 2011).

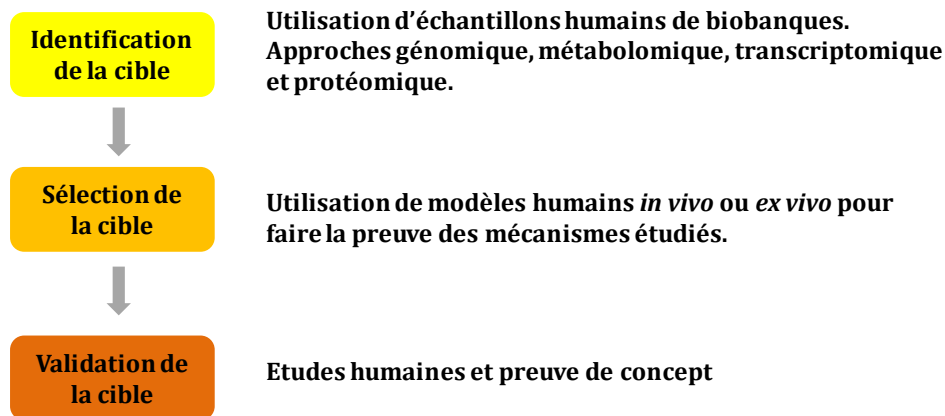


Figure A3. Le paradigme de la recherche translationnelle. Le développement de médicaments implique l'identification d'une cible par l'utilisation de technique de « omique » dans les tissus humains. Les études de preuve de concept confirment la cible avant de valider l'efficacité de la drogue dans les études humaines. D'après Proudfoot et al., *Current Opinion in Critical Care*, 2011.

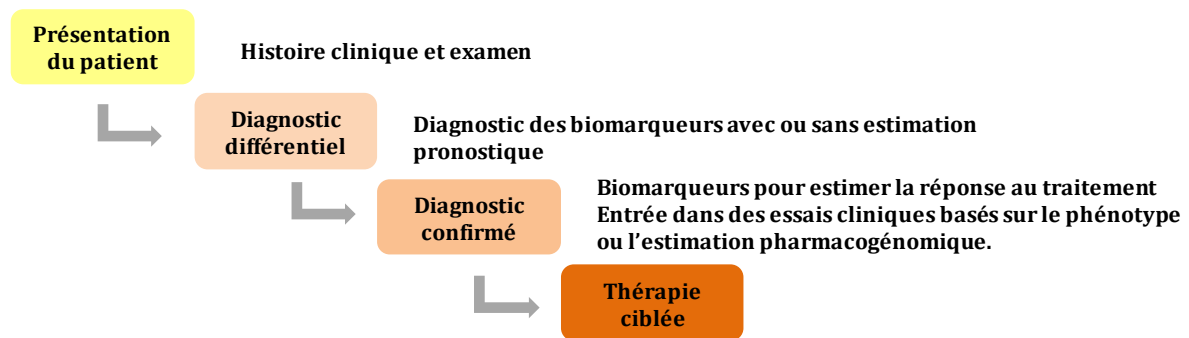


Figure A4. Le rôle des biomarqueurs dans la gestion des patients. L'évaluation initiale des biomarqueurs exige une connaissance approfondie des antécédents et des examens. La validation des biomarqueurs est associée à la confirmation du diagnostic et de l'évaluation des risques cliniques. Une fois le diagnostic confirmé, les marqueurs pharmacogénomiques permettent d'orienter les patients vers les essais cliniques. Dans ces essais, le phénotype est clairement défini, et les patients répondant le mieux au traitement sont caractérisés afin d'améliorer les conséquences des prochaines études. D'après Proudfoot et al., *Current Opinion in Critical Care*, 2011.

2.1.L'approche protéomique

La protéomique translationnelle a fourni de précieux renseignements qui ont ouvert de nouvelles voies dans la compréhension des maladies et les diagnostics (Anderson and Hunter, 2006; Dendrou et al., 2013). Un certain nombre de variantes des approches classiques (SISCAPA (*stable isotope standards and capture by antipeptides antibodies*), Multiple Reaction Monitoring (MRM)) ont permis d'analyser des échantillons complexes, comme le sérum et les urines (Huillet et al., 2011; Keshishian et al., 2007; Whiteaker et al., 2007). La majorité des approches protéomiques en recherche clinique ont pour but d'identifier des biomarqueurs du sepsis et de l'inflammation (Marshall and Reinhart, 2009; Su et al., 2013). Par exemple, des études protéomiques à grande échelle menées sur les urines de patients septiques ont permis d'identifier sept biomarqueurs du sepsis (selenium binding protein-1, heparan sulfate proteoglycan-2, alpha-1-B glycoprotein, haptoglobin, lipocalin, lysosome-associated membrane proteins-1 and dipeptidyl peptidase-4) (Su et al., 2013).

2.2.L'approche génétique

Trois approches principales permettent d'identifier les polymorphismes associés aux pathologies : par « gène candidat », sur génome entier (Genome Wide Association (GWA)), et sur les exons (Exome). i) La technique du « gène candidat » s'intéresse aux gènes codants pour les protéines impliquées dans le phénomène d'intérêt. Elle recherche les polymorphismes qui modifient la structure, l'expression ou l'activité des protéines prédéfinies. Elle a ainsi identifié TLR4 comme étant le récepteur reconnaissant le LPS (Poltorak et al., 1998). ii) L'approche sur génome entier prospecte sans *a priori* sur l'ensemble du génome à la recherche de polymorphismes impliqués dans le phénotype étudié. Il est donc nécessaire d'avoir accès à de vastes bases de données regroupant un maximum de SNPs dans la population cible comme HapMap. Il est ainsi possible d'intégrer des degrés de complexité inattendus mais indispensables à la compréhension du phénotype. Elles ouvrent des pistes à la compréhension des implications pathologiques de nouveaux facteurs génétiques (Xavier and Rioux, 2008). Cette approche utilise les dernières technologies dans le génotypage, fondées sur les puces (Affimetryx et Illumina), et permettent de séquencer plusieurs milliers de SNPs (Bush and Moore, 2012). Ces technologies ont mis en évidence des polymorphismes associés aux maladies infectieuses et sont déjà utilisées pour personnaliser les traitements (Davila et al., 2010; Thye et al., 2010). Par exemple, en 2009, Dubinsky et al.

ont identifié les facteurs impliqués dans la réponse aux anti-TNF α , déterminant ainsi les patients atteints d'inflammation chronique ne devant pas bénéficier de ce traitement (Dubinsky et al., 2010). iii) L'*Exome project* ne cible que le faible pourcentage de génome codant, l'exome. Il contient près de 85% des mutations mises en cause dans les maladies génétiques. Cette technique de séquençage a, par exemple, été utilisée pour souligner une susceptibilité génétique aux infections chroniques à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose. Le variant faux-sens de la dynactine 4 a ainsi été associé à la susceptibilité à des infections graves (Emond et al., 2012).

Les pathologies ayant des origines génétiques posent des problèmes aussi bien au niveau diagnostique qu'au niveau du traitement. En effet, elles reposent rarement sur une seule mutation et leur identification reste dépendante de leur caractère de dominance ou de récessivité. Ils peuvent aussi avoir déjà été associés, dans une autre étude, avec une pathologie différente de celle diagnostiquée pour le patient. Les limites des approches « gène candidat » et GWA sont respectivement la connaissance préalable des gènes impliqués et le coût du séquençage du génome entier pour plusieurs patients atteints de la même pathologie. L'*Exome Project* semble donc être l'approche la plus prometteuse et la plus facile à mettre en place dans l'étude des bases génétiques des maladies (Criqui and Baulande, 2010). Les études des polymorphismes associés ciblent un ou plusieurs polymorphismes pour des gènes spécifiques dont les produits protéiques sont des éléments de voies de signalisation impliquées dans cette pathologie. Ils ont inclus les cytokines pro- et anti-inflammatoires, l'immunité innée et les voies de la coagulation/fibrinolyse. Par le biais de ces approches, les groupes de patients porteurs de ces polymorphismes ont été comparés avec ceux de groupes dépourvus de ces SNPs. En l'état des choses, le polymorphisme 308A du TNF α a été associé au développement du sepsis sévère (Barber et al., 2006; Namath and Patterson, 2009). Les études GWA ont été utilisées pour comparer les populations de patients.

RESUME

L'invasion de l'hôte par un pathogène induit l'activation séquentielle des réponses immunitaires innées et adaptatives. La reconnaissance du pathogène par des récepteurs tels que les récepteurs de type Toll (TLRs) initie la réponse innée qui repose sur l'activation des lignées myéloïdes, la production de cytokines, de chémokines et de médiateurs pro-inflammatoires qui contribuent à l'éradication du pathogène. L'amplification incontrôlée de la réaction inflammatoire est délétère pour l'organisme. Afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation des réponses dépendant de TLR2, récepteur impliqué dans la reconnaissance de bactéries, parasites ou champignons, nous avons étudié la composition des complexes multimoléculaires d'activation au sein des radeaux lipidiques. En utilisant des approches protéomiques complémentaires, nous avons mis en évidence le rôle de la Src kinase Lyn et de la déshydrogénase IMPDHII après engagement des hétérodimères TLR2/TLR1 ou TLR2/TLR6. La tyrosine kinase Lyn est indispensable à l'activation de NF- κ B après engagement de TLR2 et agit en phosphorylant la sous-unité p110 de la PI3-kinase (PI3-K). IMPDHII, cible de l'acide mycophénolique, est un régulateur négatif de la voie TLR2-NF- κ B. IMPDHII interagit avec SHP1 pour inhiber la phosphorylation sur tyrosine de p85 α , la sous-unité régulatrice de PI3-K, et prévenir la transactivation de NF- κ B. Enfin, nous avons étudié le rôle d'un polymorphisme de *IMPDHII* dans la gravité du choc septique. Ces travaux affinent la compréhension de la régulation de la réponse dépendant de TLR2 et permettent d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour la prise en charge des infections graves.

MOTS CLES : Immunité innée, TLR2, Phosphorylation des tyrosines, Lyn, IMPDHII, SHP1