Exploration transcriptomique et logique de la voie TLR4 dans le contexte physiopathologique du sepsis

Claudio Monteiro Sousa

▶ **To cite this version:**

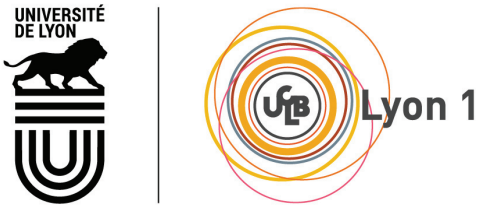
Claudio Monteiro Sousa. Exploration transcriptomique et logique de la voie TLR4 dans le contexte physiopathologique du sepsis. Bio-Informatique, Biologie Systémique [q-bio.QM]. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1098 . tel-01400555

HAL Id: tel-01400555
https://theses.hal.science/tel-01400555

Submitted on 22 Nov 2016

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.



N° d'ordre NNT : 2016LYSE1098

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale ED341
Évolution, Écosystèmes, Microbiologie, Modélisation (E2M2)

Spécialité de doctorat :
Biomathématiques-Bioinformatique-Génomique évolutive

Soutenue publiquement le 29/06/2016, par :
Claudio Monteiro Sousa

Exploration transcriptomique et logique de la voie TLR4 dans le contexte physiopathologique du sepsis

---

Devant le jury composé de :

Professeur Marc Hommel	Président
Professeur Jacques Demongeot	Rapporteur
Professeur Olivier Mimoz	Rapporteur
Docteur Cyrille Leperlier	Éxaminateur
Professeur Éric Vivier	Éxaminateur
Professeur François Gueyffier	Directeur de thèse
Professeur Michel Tod	Co-directeur de thèse
Professeur Jean-Pierre Boissel	Invité

Novadiscovery SAS, 60 Avenue Rockefeller, 69008 Lyon
Équipe EMET, UMR CNRS 5558, 43 bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directeur Général des Services	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

RÉSUMÉ

Le sepsis est un syndrome observé chez des patients associant une infection documentée (microbiologiquement ou cliniquement suspectée) à une réponse inflammatoire systémique (*Systemic Inflammatory Response Syndrome : SIRS*). Celui-ci peut évoluer vers un sepsis sévère s'il est associé à la défaillance d'un ou de plusieurs organes. Le choc septique est l'association d'un état septique grave et d'une défaillance hémodynamique caractérisée par une chute aiguë de la pression artérielle ne pouvant pas être corrigée par une procédure standard de remplissage vasculaire.

Les syndromes septiques sont aujourd'hui la première cause de mortalité en unités de réanimation. Cette mortalité élevée, en particulier pour les cas les plus graves tels que les chocs septiques, témoigne d'une absence de traitements curatifs pour cette pathologie.

Partant de l'hypothèse que les syndromes septiques graves sont la conséquence d'une perte de contrôle précoce de la régulation de la réponse inflammatoire, nous avons étudié, via deux démarches complémentaires, l'initiation de la voie de signalisation TLR4 et les mécanismes intracellulaires contribuant à sa régulation.

Dans un premier temps, l'utilisation d'approches transcriptomiques nous a permis d'identifier la voie de signalisation mTOR comme discriminante entre des patients sains (SIRS induit par l'injection d'endotoxines) et des patients souffrant de syndromes septiques graves. Nous avons ensuite développé et utilisé des techniques de modélisation logique pour simuler *in silico* le rôle joué par la voie mTOR dans la résolution d'une réponse inflammatoire. Ces résultats encourageants ouvrent des perspectives pour de nouvelles applications thérapeutiques dans le domaine du sepsis.

Mots clés: SIRS, sepsis, modélisation, physiopathologie, transcriptome, logique booléenne, logique floue

Abstract

Sepsis is a syndrome observed in patients combining a documented infection (microbiologically or clinically suspected) with a systemic inflammatory response (Systemic Inflammatory Response Syndrome : SIRS). It may progress to severe sepsis if it is associated with failures of one or more organs. Septic shock is the combination of a severe sepsis and a hemodynamic dysfunction characterized by an acute fall in blood pressure that cannot be corrected by a procedure of vascular filling.

Sepsis syndromes represent today the first cause of mortality in intensive care units around the world. This poor survival rate, in particular for the most severe cases, such as septic shock, testifies a real curative therapeutic demand.

Based on the assumption that severe sepsis syndromes are the consequence of a loss of control in early mechanisms of inflammatory response regulation, we studied via two complementary approaches the initiation of TLR4 signaling pathway and the intracellular mechanisms contributing to its regulation.

First, the use of transcriptomic approaches allowed us to identify the mTOR signaling pathway as discriminating between healthy patients (SIRS induced by the infusion of endotoxins) and patients with severe septic syndromes. We then developed and used logic modeling approaches to *in silico* simulate the role played by the mTOR signaling pathway in the resolution of an inflammatory response. These encouraging results open perspectives for new therapeutic applications in the field of sepsis.

Keywords: SIRS, sepsis, modeling, pathophysiology, transcriptome, Boolean logic, fuzzy logic

Remerciements

Au terme de ce travail, c'est avec émotion que je profite de ces quelques lignes pour remercier toutes les personnes qui ont participé, de près ou de loin, à la réalisation de cette thèse.

Je souhaiterais tout d'abord remercier François-Henri Boissel et Jean-Pierre Boissel pour m'avoir accueilli dans leur entreprise et offert la possibilité de mener à bien ces travaux de thèse.

Je tiens à adresser mes remerciements aux Professeurs François Gueyffier et Michel Tod, pour avoir accepté de diriger cette thèse et pour le temps qu'ils m'ont consacré tout au long de ce périple. Je remercie également mon laboratoire d'accueil, l'équipe EMET de l'UMR5558, ainsi que ses responsables qui m'ont permis de réaliser mes projets.

Je souhaiterais remercier mes rapporteurs pour le temps qu'ils ont accordé à la relecture de cette thèse et à l'élaboration de leur rapport. Je remercie les Professeurs Olivier Mimoz et Jacques Demongeot d'avoir accepté cette charge et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes travaux.

C'est également avec plaisir que je remercie le Professeur Marc Hommel, le Professeur Éric Vivier et le Docteur Cyrille Leperlier pour leur disponibilité et leur gentillesse. C'est un honneur de les compter parmi les membres de mon jury et je mesure à sa juste valeur le temps qu'ils m'accordent.

Je souhaiterais remercier le Professeur Jean-Pierre Boissel pour tout le temps qu'il m'a accordé au cours de cette thèse. C'est un honneur d'apprendre tous les jours à ses côtés et de le compter parmi les membres de mon jury.

Je tiens également à remercier mes collègues de travail à Novadiscovery pour leur bonne humeur et les bons moments partagés. Une mention particulière pour Julien Wan et Jean Ponchon pour l'aide qu'ils m'ont apporté dans le développement des outils pour la modélisation logique. Une mention spéciale également pour Eulalie Landèche, qui a vu sa charge de travail augmentée ces dernières semaines afin de me permettre de finir la rédaction de ce manuscrit.

Je souhaite également remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu et accompagné ces dernières années : Florian, Julien, Paul, Noelline, Nathalie, et tous ceux que j'oublie. On se retrouve très vite !

Je remercie mes parents et mon (petit) frère Alex ainsi que ma famille pour leur soutien. Sans eux, il m'aurait été difficile d'aller jusqu'au bout.

Mes derniers remerciements et non les moindres, s'adressent à ma future femme, Marine, qui pour mon plus grand bonheur partage ma vie et mes expériences professionnelles depuis leurs origines. Elle a su m'encourager tout au long de cette thèse et m'a aidé à tenir le bon cap. Son soutien a été sans faille et je lui serai à jamais reconnaissant.

TABLE DES MATIÈRES

Page

Liste des tableaux **xiii**

Table des figures **xv**

Glossaire **xvii**

1 Introduction **1**
- 1.1 Définitions . . . 2
- 1.2 Épidemiologie . . . 4
- 1.3 Étiologie . . . 6
- 1.4 Physiopathologie . . . 6
  - 1.4.1 Système immunitaire inné . . . 7
  - 1.4.2 La reconnaissance de l'intrus . . . 7
  - 1.4.3 Réponse pro-inflammatoire . . . 8
  - 1.4.4 Réponse adaptative . . . 11
  - 1.4.5 Réponse anti-inflammatoire . . . 12
  - 1.4.6 Mécanismes de la défaillance d'organes . . . 13
- 1.5 Problématique . . . 15

2 Partie I : Analyse transcriptomique **17**
- 2.1 Introduction . . . 18
  - 2.1.1 Rappels sur les gènes et leur expression . . . 18
  - 2.1.2 Principe des puces à ADN . . . 20
- 2.2 Matériel et méthodes . . . 21
  - 2.2.1 Le pré-traitement des données de puces . . . 21
  - 2.2.2 Description des études . . . 22
  - 2.2.3 Récupération des données . . . 23
  - 2.2.4 Lecture et pré-traitement des données . . . 23
  - 2.2.5 Identification des cibles différemment exprimées . . . 25
  - 2.2.6 Classification . . . 27
  - 2.2.7 Analyse fonctionnelle . . . 27

2.3 Article : *Comparative transcriptomic analysis between an artificially induced SIRS in healthy individuals and spontaneous sepsis* . . . 28
2.4 Conclusion . . . 40

3 Partie II : État de l'art de la voie TLR4 **41**
3.1 Introduction . . . 42
3.2 Voie Myd88-indépendante . . . 43
3.2.1 Interférons (IFN) de type I . . . 44
3.3 Voie Myd88-dépendante . . . 46
3.3.1 IL-1β . . . 50
3.3.2 TNFα . . . 50
3.4 Voie PI3K-AKT-mTOR . . . 51
3.5 Rétro-contrôles négatifs . . . 54
3.5.1 IL-10 . . . 54
3.5.2 Les protéines SOCS . . . 55
3.5.3 Autres inhibiteurs de la voie TLR4 . . . 56
3.5.4 IRAK-M . . . 56
3.5.5 IκBs . . . 57

4 Partie III : Modélisation logique de la voie TLR4 **59**
4.1 Introduction . . . 60
4.2 Matériel et méthodes . . . 61
4.2.1 Introduction à la modélisation logique . . . 62
4.2.2 Définition de l'approche . . . 64
4.2.3 Implémentaion : l'outil *Logml* . . . 67
4.2.4 Construction du modèle logique de la voie TLR4 . . . 69
4.2.5 Plan d'expérience *in silico* . . . 70
4.3 Article : *In silico simulation of mTOR signalling pathway in Toll like receptor 4 via a logical modelling approach* . . . 72
4.4 Conclusion . . . 96

5 Conclusion **99**
5.1 Analyse transcriptomique . . . 100
5.2 Modélisation logique . . . 100
5.3 Perspectives . . . 101

A Ontologie graphique **103**

B Graphe logique de la voie TLR4 et de ses boucles de rétro-contrôle **105**

C Valeurs initiales du modèle logique **107**

D Equations logiques de la voie TLR4 **109**

Bibliographie **113**

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAUX **Page**

1.1 Définition des syndromes septiques d'après le consensus de l'ACCP/SCCM. Bone et *al.*[5] 3
1.2 Critères du score SOFA (pour *Sepsis-related Organ Failure Assessment*). M. Singer *et al.* [7] . 4
1.3 Estimation de la prévalence des SSG en fonction des études menées. Brun-Buisson et *al.*[13] 5
1.4 Agonistes des récepteursTLRs humains les mieux connus et leurs adaptateurs. Yves Delneste et *al.*[24] 8

4.1 Définition des paramètres qualitatifs utilisés lors de la création des graphes logiques et de leurs valeurs quantitatives correspondantes. 68

C.1 Valeurs initiales attribuées pour chaque entité du modèle logique. 108

D.1 Équations logiques générées par *Logml* définissant chaque entité du modèle logique. . . 111

TABLE DES FIGURES

FIGURES **Page**

1.1 Classification des syndromes septiques en fonction de l'intensité de la réponse de l'organisme. D'après le consensus de l'ACCP/SCCM [5]. 2

1.2 Courbe de survie des syndromes septiques graves issue de l'enquête "Episepsis". Brun-Buisson et *al.*[13] 5

1.3 Reconnaissance des différents PAMPs par leurs TLRs spécifiques. (A) Identification d'un champignon. (B) Identification des bactéries à Gram-positive et à Gram-Negatif. Tom van der Poll, et *al.* [25] 9

1.4 Transduction du signal après activation des NODs et autres PRRs. Naohiro Inohara et *al.*[27] 9

1.5 Représentation de la cascade de coagulation responsable de la défaillance multiviscérale lors d'un choc septique. Cohen et *al.* [31] 11

2.1 Représentation des trois principaux niveaux de granularité du génie génétique : le génome, le transcriptome et le protéome. Source : Appareils et méthodes en biochimie et biologie-2e éd.Bernard Hainque, Bruno Baudin et Philippe Lefebvre 19

2.2 Etapes nécessaires à une analyse de transcriptome avec une puce ADN Affymetrix© : 1. Sélection des cellules d'intérêt, 2. Préparation de l'ARNm, 3. Amplification puis Reverse Transcriptase de l'ARNm, 4. Marquage fluorescent, 5. Hybridation avec les sondes puis lavages, 6. Analyse des sondes par laser, 7. Analyse d'image. Adapté de l'illustration de Squidonius (public domain), Wikimedia. 20

2.3 Comparatif des boxplots des intensités brutes ($\log 2$) avant (en haut) et après (en bas) l'étape de *preprocessing* sur l'ensemble des puces HGU-133A de l'étude de Calvano. Chaque boîte illustre la distribution des intensités de chaque puce. La ligne intérieure d'une boîte indique la valeur médiane, les extrémités les 1er et 3e quartiles. 25

3.1 Activation du récepteur TLR4 par du LPS. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1. 42

3.2 Activation de la voie de signalisation MyD88-indépendante suite à l'endocytose du récepteur TLR4. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1. 44

3.3 Suite de la transduction du signal de la voie de signalisation MyD88-independante. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1. . . 45

3.4 Voie paracrine de l'interféron IFN-β. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1. 46
3.5 Initiation de la voie MyD88-dépendante suite à l'activation du récepteur TLR4. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1. 47
3.6 Activation de TRAF6 via la voie MyD88-dépendante. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1. 47
3.7 Suite de la transduction du signal de la voie MyD88-dépendante. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1. 49
3.8 Voie paracrine de IL-1β. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1. 50
3.9 Voie paracrine de TNFα. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1. 51
3.10 Initiation de la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR suite à l'activation du récepteur TLR4. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1. 52
3.11 Suite de la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1. 53
3.12 Voie paracrine de IL-10. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1. 55

4.1 Processus de construction d'un graphe logique. La première étape consiste en une revue de la littérature. La seconde étape consiste en la réalisation d'un graphe logique grâce à l'outil yED et à l'utilisation de l'ontologie graphique présentée en annexe A.1. 68
4.2 Description du fonctionnement de l'outil *Logml*. Le graphe logique donné en entrée est d'abord analysé syntaxiquement par l'outil, avant d'être transformé en équations logiques, puis en code exécutable. Les résultats sont ensuite affichés dans une interface dédiée. . . 69
4.3 Exemple extrait du graphe logique de la voie TLR4 montrant l'activation du récepteur TLR4 par le LPS. 70
4.4 Présentation des noeuds logiques utilisés pour définir les processus expérimentaux. . . 71

A.1 Ontologie graphique utilisée dans le cadre de cette thèse. 103

B.1 Graphe logique de la voie TLR4 et de ses boucles de rétro-contrôle. 106

GLOSSAIRE

in silico Néologisme d'inspiration latine désignant une recherche ou un essai effectué au moyen de calculs informatisés ou de modèles informatiques. iii, v, x, 15, 59, 60, 70, 96, 97, 99, 100

mTOR De l'anglais *mammalian Target of Rapamycin*, en français cible de la rapamycine chez les mammifères. iii, v, x, xvi, 15, 40, 41, 52, 53, 60, 70, 72, 97, 99–102

A20 Également connue sous le nom de TNFAIP3, pour *Tumor Necrosis Factor, Alpha-Induced protein 3*. 56

ADN L'acide désoxyribonucléique. C'est une macromolécule biologique présente dans l'ensemble des cellules et qui contient contient l'information génétique, appelée génome. ix, xv, 8, 17–23

AKT Pour *Protein Kinase B (PKB)*. x, xvi, 51–53, 102

AP-1 Pour *Activator Protein-1*. 48

ARN L'acide ribonucléique est produite par transcription à partir de l'ADN situé dans le noyau. Il s'agit d'une copie d'une région de l'un des brins de l'ADN. xv, 8, 18–23

BCAP Pour *B-Cell Adaptor for PI3K*. 52

BTK Pour *Bruton's Tyrosine Kinase*. 47, 56

CARS CARS (pour *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome*). 7

CBP Pour *CREB binding protein*. 54, 96, 97, 101

CD14 Pour *Cluster of Differenciation 14*. 6, 42, 43

CREB Pour *C-AMP Response Element-Binding protein*. 53, 54, 96, 97, 101

cytokine Substance soluble de signalisation cellulaire synthétisée principalement par les cellules du système immunitaire ou par d'autres cellules ou tissus, agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. 6, 8–10, 12–15, 43, 44, 46, 50, 51, 54–57, 70, 96, 97, 101

DAMPs Pour *Damage Associated Molecular Pattern*. 8

GAP Pour *GTPase Activating Protein*. 52

GSK3β Pour *Glycogen Synthase Kinase 3 β*. 53, 97

IFN-α Pour interféron α. 43

IFN-β Pour interféron β. xvi, 42, 43, 46

IFN-γ Pour interféron γ. 12, 13

IKK Pour *IκB Kinase*. 43, 48, 51

IL-1α Pour *InterLeukin 1 α*. 12, 13

IL-1β Pour *InterLeukin 1 β*. x, xvi, 6–8, 12–14, 43, 50, 54–56, 96, 97, 101

IL-10 Pour *InterLeukin 10*. x, xvi, 6, 7, 12, 13, 54, 55, 96, 97, 101

IL-12 Pour *InterLeukin 12*. 9, 12, 13, 54, 56

IL-13 Pour *InterLeukin 13*. 12

IL-15 Pour *InterLeukin 15*. 9

IL-18 Pour *InterLeukin 18*. 6, 9

IL-2 Pour *InterLeukin 2*. 12, 14

IL-4 Pour *InterLeukin 4*. 12, 13

IL-6 Pour *InterLeukin 6*. 13, 14

IL-8 Pour *InterLeukin 8*. 10, 11, 13, 43

infection Pénétration et développement dans un être vivant de micro-organismes. iii, v, 1–6, 96, 101

IRAK Pour *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinases*. x, 47, 48, 56, 57, 96, 101

IRF3 Pour *Interferon Regulatory Factor 3*. 43

IRF7 Pour *Interferon Regulatory Factor 7*. 43

ISGs Pour *IFN-Stimulated Genes*. 46

JAK Pour *Janus Activated Kinase*. 44, 54, 55

JNK Pour *c-Jun Kinases*. 48

LBP Pour *LPS-Binding Protein*. 42

LPS Pour lipopolysaccharides. Il s'agit d'un composant essentiel de la face externe de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. xv, xvi, 17, 22, 42, 55–57, 59, 70, 71, 96, 97, 100, 101

MCP-1 Pour *Monocyte Chemoattractant Protein 1*. 10, 43

MD2 Pour *Myeloid Differenciation protein 2*. 42, 43

MIF Pour *Migration Inhibitory Factor*. 9

MIP-1α Pour *Macrophage Inflammatory Protein 1 α*. 10, 11, 13

MKK Pour *MAPK kinases*. 48

MyD88 Pour *Myeloid differenciation primary response gene 88*. Protéine adaptatrice des récepteurs TLRs. xv, xvi, 8, 42–52, 96, 102

NFκB Pour *Nuclear Factor-kappa B*. 48, 50, 51, 54, 56, 57, 96, 97, 101

p38 Pour *p38 Mitogen-Activated Protein Kinases*. 48

PAMPs Pour *Pathogen-Associated Molecular Patterns*. xv, 7–9

PDK1 Pour *Phosphatidylinositol- 3-Dependent Kinase 1*. 52

physiopathologie Étude des troubles du fonctionnement de l'organisme ou de ses parties, au cours des maladies. iii, 2

PI3K Pour *Phosphoinositide 3-Kinase*. x, xvi, 51–53, 102

PIRO Concept PIRO (pour *Predisposition, infection, Response, Organ dysfunction*). 6

PRR Pour *Pattern Recognition Receptors*. xv, 7–9

RHEB Pour *RAS Homolog Enriched in brain*. 52

RIP-1 Pour *Receptor Interacting Protein-1*. 51

sepsis Syndrome observé chez des patients associant une infection documentée (microbiologiquement ou cliniquement suspectée) à une réponse inflammatoire systémique. iii, v, x, 1–7, 12, 14, 17, 18, 22, 23, 28, 40, 100–102

SIRS De l'anglais *Systemic Inflammatory Response Syndrome*, en français Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique. iii, v, x, 3, 4, 7, 15, 17, 22, 23, 28, 40, 99, 100

SOCS Pour *Suppressor Of Cytokine Signaling proteins*. x, 46, 54–56

SOFA Score SOFA (pour *Sepsis-related Organ Failure Assessment*). xiii, 4

SSG Syndromes septiques graves. xiii, 5, 6

STAT Pour *Signal Transducers and Activators of Transcription*. 44, 46, 54, 55

TAB Pour *TAK1-Binding proteins*. 48

TAK1 Pour *Transforming growth factor beta-Activated Kinase 1*. 48, 51, 56

TBK1 Pour *TANK-Binding Kinase 1*. 43

TF Facteur tissulaire (TF pour *Tissue Factor*). 10

TIRAP Pour *TIR-associated protein*. Protéine adaptatrice des récepteurs TLRs. 42, 46, 47, 52, 56

TLR4 De l'anglais *Toll Like Receptor 4*, en français récepteur de type Toll 4. iii, v, x, xv, xvi, 8, 15, 41–44, 46–48, 51, 52, 56, 59–61, 69, 70, 96, 97, 99–102

TLRs Pour *Toll Like Receptors*. Récepteurs de type Toll. xiii, xv, 8, 9, 42, 47, 52, 54, 56

TNFα Pour *Tumor Necrosis Factor α*. x, xvi, 2, 6–8, 10, 12–15, 43, 50, 51, 54–56

TRADD Pour *TNF Receptor-Associated Death Domain*. 51

TRAF3 Pour *TNF Receptor-Associated Factor 3*. 43, 56

TRAF6 Pour *TNF Receptor Associated Factor 6*. xvi, 47, 48, 56, 57

TRAM Pour *TRIF related adaptor molecule*. Protéine adaptatrice des récepteurs TLRs. 8, 42, 43

transcriptome Le transcriptome se définit comme l'ensemble des ARN issus de la transcription du génome. iii, v, xv, 18–20

TRIF Pour *TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN-β*. Protéine adaptatrice des récepteurs TLRs. 8, 42, 43

TYK2 Pour *Tyrosine Kinase-2*. 44, 54

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Le sepsis est un terme anglo-saxon, venant du grec ancien "$\sigma\eta\psi\iota\varsigma$" signifiant "putréfaction", et employé pour désigner un syndrome de réponse inflammatoire généralisée associée à une infection grave de l'organisme. Ce terme remplace aujourd'hui celui de septicémie (signifiant "infection du sang"), apparu pour la première fois en 1837 suite aux travaux du médecin français Pierre Piorry, et qui a longtemps été utilisé pour décrire ce syndrome. Pierre Piorry définissait alors cette pathologie par la présence de bactéries dans le sang (bactériémie) [1, 2].

Notre système de défense contre les pathogènes peut être vu comme un état d'équilibre entre l'activation d'une réponse pro-inflammatoire, indispensable à l'élimination des corps étrangers, et une réponse complémentaire anti-inflammatoire destinée à prévenir des dégâts collatéraux sur les tissus liée à une sur-activation de la réponse pro-inflammatoire. La perte de cet équilibre peut entraîner la survenue d'états pathologiques graves tels que les syndromes septiques, qui se définissent comme un dérèglement important et délétère du système immunitaire suite à une infection.

On estime aujourd'hui à 30 millions le nombre de cas de syndromes septiques dans le monde par an. Ces syndromes sont à l'origine de la mort d'une personne toutes les 3-4 secondes [1], faisant de leur prise en charge un enjeu majeur de santé publique à l'échelle mondiale. Cette pathologie touche généralement les personnes dont le système immunitaire est affaibli, en particulier dans les tranches d'âges extrêmes de la vie, incluant les nouveaux-nés et les personnes âgées.

Malgré d'importants progrès réalisés ces dernières décennies dans la compréhension de cette pathologie, aucun traitement spécifique n'existe pour les syndromes septiques. L'un des revers les plus récents dans le domaine est l'AZD9773 d'AstraZeneca [3], un fragment d'anticorps polyclonal dirigé contre l'un des principaux

1. http://www.world-sepsis-day.org/

médiateurs de l'inflammation qui est le TNFα, et dont le développement a été arrêté en Août 2012. Le retrait du marché de la protéine C activée (Xigris) en Octobre 2011, constitue un autre exemple de l'insuccès dans la proposition de thérapies dans ce domaine [4]. Aujourd'hui, les patients septiques admis en soins intensifs se voient administrer le plus tôt possible une antibiothérapie et reçoivent les supports nécessaires à leurs fonctions vitales.

Dans ce premier chapitre, nous reviendrons sur la définition des syndromes septiques avant de nous intéresser à l'épidémiologie et l'étiologie de cette pathologie. Nous aborderons ensuite la physiopathologie du sepsis avant de définir la problématique de ce travail de thèse.

1.1 Définitions

Depuis 1992 et la conférence de consensus commune à l'*American college of Chest Physicians* (ACCP) et à la *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) [5], les différents états septiques ont été classés en fonction des signes caractérisant la réponse de l'organisme à l'infection (documentée ou fortement suspectée). La classification distinguait alors trois paliers fondés sur l'intensité de la réponse de l'organisme : le sepsis, le sepsis sévère et le stade le plus avancé, le choc septique (figure 1.1).

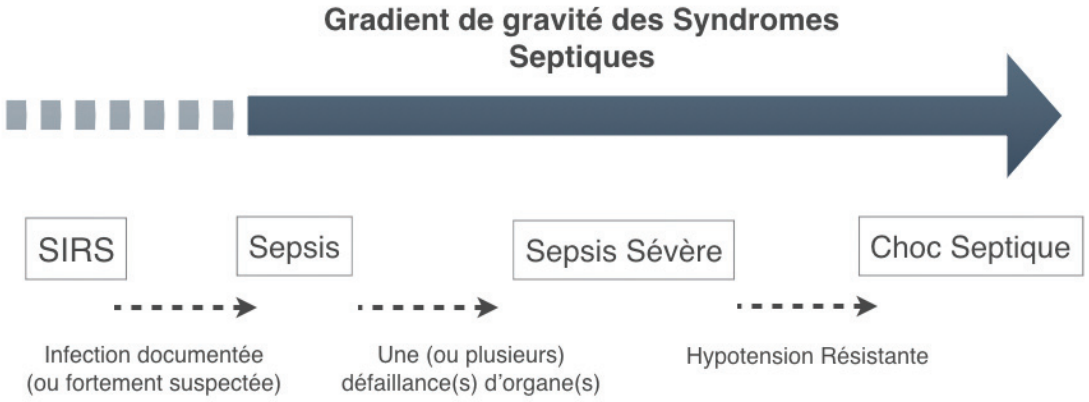


Figure 1.1 – Classification des syndromes septiques en fonction de l'intensité de la réponse de l'organisme. D'après le consensus de l'ACCP/SCCM [5].

Ces définitions et ces classifications ont par la suite été réévaluées lors d'un second consensus en 2001 [6] où il a été proposé de retenir une infection sur des critères cliniques et non plus seulement micro-biologiques (tableau 1.1).

Le terme infection désigne l'invasion de tissus normalement stériles d'un organisme vivant par des germes, plus précisément des micro-organismes potentiellement pathogènes comme des bactéries, des virus, des champignons ou des parasites.

Jusqu'en 2001, le sepsis se définissait comme un syndrome observé chez des patients associant une infection documentée (cliniquement ou microbiologiquement) à une réponse inflammatoire systémique (*SIRS*). Ce sepsis pouvait évoluer vers un sepsis sévère s'il était associé à la défaillance d'un ou de plusieurs organes. Le choc septique était l'étape suivante, l'association d'un état septique grave et d'une défaillance hémodynamique caractérisée par une chute aigüe de la pression artérielle ne pouvant pas être corrigée par une procédure de remplissage vasculaire.

Termes	Définitions
Infection	Invasion d'un tissu ou d'un organe par un micro-organisme pathogène, bactérien, viral, fongique ou parasitaire
SIRS	Au moins 2 éléments parmi : • température >38 °C ou <36 °C • fréquence cardiaque >90/min • fréquence respiratoire >20/min ou PaCO2 <32mmHg • glycémie >7,7 mmol.l^{-1} • leucocytose >12000 ou <4000/mm^3 ou >10% de formes immatures • altération des fonctions supérieures • temps de recoloration capillaire>2 sec • lactatémie>2 mmol.l^{-1}
Sepsis	Réponse systémique inflammatoire liée à une infection documentée ou suspectée
Sepsis sévère	Sepsis accompagné d'une ou plusieurs défaillances d'organes • Lactémie >4 mol.l^{-1} • Hypotension artérielle avant remplissage • Dysfonction respiratoire : PaO2/FiO2<300 ou FiO2>0,5 pour SpO2>92% • Dysfonction rénale : créatininémie >176 mol.l^{-1} ou >2N • Coagulopathie (INR >1,5) • Dysfonction hématologique : thrombopénie <100000/mm^3 • Dysfonction hépatique : TP>60 sec • Dysfonction neurologique : GCS <13
Choc septique	Sepsis sévère accompagné d'une hypotension artérielle résistante à une expansion volémique de 20 à 40 ml/kg et nécessitant le recours aux vasopresseurs

Tableau 1.1 – Définition des syndromes septiques d'après le consensus de l'ACCP/SCCM. Bone et *al.*[5]

En février 2016, et suite au troisième consensus international pour les définitions du sepsis et du choc septique (Sepsis-3) [7], de nouvelles définitions ont été proposées et validées par l'*European Society of Intensive Care Medicine* et la *Society of Critical Care Medicine*.

Il a été déterminé que les critères définissant le SIRS n'indiquent pas nécessairement une réponse immunitaire inappropriée. De plus, les critères caractérisant le SIRS sont présents chez un nombre trop élevé de patients hospitalisés, y compris ceux qui ne

développent jamais d'infection (faible capacité discriminante). Il a par conséquent été décidé d'écarter le SIRS des définitions des syndromes septiques.

Le terme sepsis a également été redéfini comme la dysfonction d'un ou de plusieurs organes suite à une réponse inappropriée de l'hôte envers une infection. Cela implique la mise à l'écart du terme sepsis sévère dans les définitions des syndromes septiques.

Les experts proposent désormais l'utilisation du score SOFA (pour *Sepsis-related Organ Failure Assessment*, tableau 1.2) pour identifier plus rapidement les patients présentant un sepsis. Il a été déterminé qu'un score SOFA supérieur ou égal à 2 ou qu'une élévation supérieure ou égale à 2 points étaient plus discriminants que le SIRS pour prédire l'évolution vers un sepsis et donc la mortalité des patients en services de réanimation.

Enfin, le choc septique se définit désormais comme un sepsis nécessitant des vasopresseurs afin de maintenir une pression artérielle moyenne (PAM) supérieure ou égale à 65 mmHg associée à une hyperlactatémie supérieure à 2 mmol/L malgré la correction d'une hypovolémie.

SOFA score	1	2	3	4
Respiration				
PaO_2/FiO_2, mmHg	<400	<300	<200 With respiratory support	<100
Coagulation				
Platelets $\times 10^3/mm^3$	<150	<100	<50	<20
Liver				
Bilirubin, mg/dl (μmol/1)	1.2- 1.9 (20 - 32)	2.0- 5.9 (33 - 101)	6.0-11.9 (102 - 204)	>12.0 (<204)
Cardiovascular				
Hypotension	MAP <70 mmHg	Dopamine ≤ 5 or dobutamine (any dose)	Dopamine >5 or epinephrine ≤ 0.1 or norepinephrine ≤ 0.1	Dopamine >15 or epinephrine >0.1 or norepinephrine >0.1
Central nervous system				
Glasgow Coma Score	13 - 14	10- 12	6-9	<6
Renal				
Creatinine, mg/dl (μmol/1) or urine output	1.2- 1.9 (110 - 170)	2.0 - 3.4 (171 - 299)	3.5-4.9 (300 - 440) or <500 ml/day	>5.0 (>440) or <200 ml/day

Tableau 1.2 – Critères du score SOFA (pour *Sepsis-related Organ Failure Assessment*). M. Singer *et al.* [7]

1.2 Épidemiologie

Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses études épidémiologiques on été réalisées sur le sepsis, en particulier dans ses formes graves. L'épidémiologie des syndromes septiques graves (SSG) en réanimation est désormais bien connue (Tableau 1.3).

Selon plusieurs études américaines [14–16], les tendances évolutives montreraient une augmentation de l'incidence des états septiques ces deux dernières décennies avec un passage de 82,7 à 240,4 cas pour 100 000 habitants [17]. Cette augmentation serait

Études	[Ref.]	Prévalence en réanimation p. 100 admis	IC 95%
France, 1995	[8]	11,9	10,6-13,3
Europe, 2001	[9]	15,5	14,9-16,0
Royaume-Uni, 2003	[10]	27,1	-
France, 2004	[11]	14,6	-
Nouvelle-Zélande, 2004	[12]	11,8	10,9-12,6

Tableau 1.3 – Estimation de la prévalence des SSG en fonction des études menées. Brun-Buisson et *al.*[13]

en partie due au vieillissement de la population. Cette augmentation de l'incidence engendre une augmentation conséquente de la charge portée par les systèmes de santé. Comme mis en évidence par le *National Center for Health Statistics*, la prise en charge des syndromes septiques représente un coût estimé de 1.8 milliards de dollars par an, soit la première place en terme de dépense pour hospitalisation aux États-Unis en 2011 [18].

On estime à 75000 le nombre de cas de syndromes septiques graves par an dans les services de réanimation des hôpitaux français. L'enquête "Episepsis" [11], réalisée en 2001 dans 205 services de réanimation français, a permis d'estimer à près de 15% la part de malades présentant des syndromes septiques graves à l'entrée en réanimation. Pour 50% des cas, ces malades souffrent d'une pathologie chronique. A noter que la moitié des infections liées à ces syndromes septiques sont d'origine respiratoire et que 25% sont d'origine intra-abdominale.

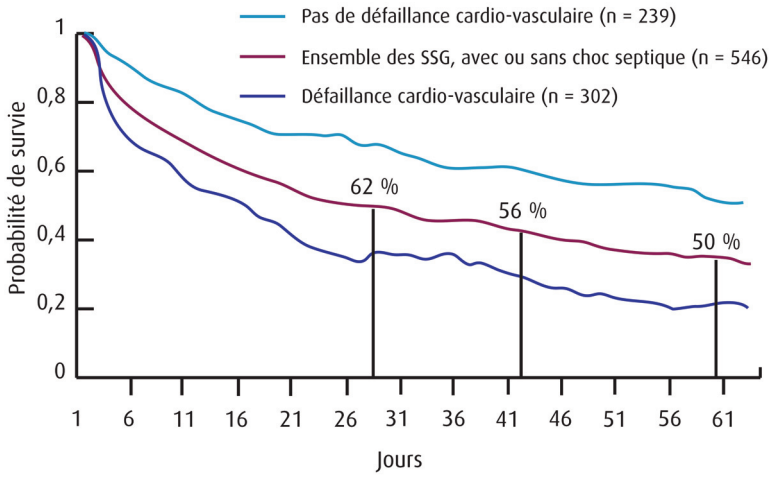


Figure 1.2 – Courbe de survie des syndromes septiques graves issue de l'enquête "Episepsis". Brun-Buisson et *al.*[13]

Selon une étude de Annane et *al.* [19], on peut observer une amélioration du pronostic vital depuis 15 ans, parallèlement à la mise en place de la *Surviving Sepsis Campaign*

[20] visant à uniformiser les bonnes pratiques en milieu hospitalier. Cependant, la mortalité des syndromes septiques graves reste élevée avec environ 30% à 28 jours et de l'ordre de 50% globalement (Figure 1.2). Elle est sensiblement plus importante en cas de choc septique.

1.3 Étiologie

Les syndromes septiques peuvent avoir différentes origines infectieuses, la source de l'infection restant néanmoins indéterminée dans 30% des cas.

Les causes majeures du sepsis en réanimation sont représentées dans l'ordre décroissant par les infections respiratoires (40 à 44%), les infections rénales et génitales (9 à 18%) et les infections intra-abdominales (9 à 14%) [11].

Selon l'étude de Martin et *al.* parue en 2003 [17], les agents infectieux induisant un sepsis peuvent être regroupés comme suit avec 52,1% des cas pour les bactéries à Gram-positif, 37,6% pour les bactéries à Gram-négatif, 4,7% pour les associations polymicrobiennes, 4,6% pour les levures et les champignons, 1% pour les bactéries anaérobies et moins de 0,1% pour les virus et parasites.

Bien que les sources d'infection jouent un rôle central dans la génèse des états septiques, la variabilité génétique inter-individuelle représente également une part importante dans la prédisposition de certains individus à évoluer vers un choc septique. Cet aspect génétique est désormais pris en compte dans le concept *PIRO* (pour *Predisposition, infection, Response, Organ dysfunction*) qui regroupe les facteurs ayant le plus d'impact sur le risque de décès consécutif à un SSG [6]. Parmi les facteurs génétiques, les plus étudiés dans le domaine du sepsis sont les polymorphismes des gènes codant pour les protéines importantes de la reconnaissance des pathogènes (Toll-Like Receptors 4 et 2, CD14, Mannose Binding Lectine), des cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire (TNFα, IL-1β, IL-10, IL-18) et dans les mécanismes de coagulation (PAI-1, Facteur V) [21].

1.4 Physiopathologie

La détection par l'organisme d'un corps considéré comme étranger à celui-ci va conduire à l'activation des défenses immunitaires et à l'apparition d'une réponse inflammatoire. Dans la grande majorité des cas, cette réponse est contrôlée et adaptée à l'infection, permettant l'éradication du pathogène et un retour rapide à un état physiologique [22]. Dans d'autres circonstances, la réponse du système immunitaire est disproportionnée et inadaptée à l'infection. Cette réaction excessive entraîne des effets délétères pour l'organisme, qui est alors incapable de contenir l'infection. La mortalité dans le choc septique a longtemps été imputée à une réaction pro-inflammatoire excessive. Suite aux échecs de l'immunothérapie anti-inflammatoire, Bone et *al.*[23] ont mis en avant la présence de deux phases distinctes dans le modèle physiopathologique.

La première phase dite précoce et de courte durée est pro-inflammatoire et consiste en la libération de nombreux médiateurs pro-inflammatoires. La seconde phase dite secondaire est appelée par Bone et *al.* CARS (pour *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome*) et est prédominante durant les phases ultérieures du sepsis et entraîne une dépression des fonctions immunitaires.

1.4.1 Système immunitaire inné

Le système immunitaire inné est l'ensemble des défenses d'un organisme contre des agents externes qui n'impliquent pas une reconnaissance spécifique de l'agent infectieux.

L'inflammation est l'un des mécanismes de défense innée mis en place par l'organisme pour reconnaître et détruire efficacement tous les micro-organismes ou substances du "non-soi".

La réaction inflammatoire commence par la reconnaissance de l'intrus en faisant intervenir certaines cellules immunitaires non spécifiques de l'organisme. Ce sont les monocytes (pouvant évoluer en macrophages ou en cellules dendritiques) et les polynucléaires neutrophiles (PNN) [22] qui sont souvent les premiers à entrer en contact avec le pathogène. Des structures moléculaires, les PRR (pour *Pattern Recognition Receptors*), communes à de nombreuses cellules immunitaires, vont alors interagir avec les molécules complémentaires de l'intrus, les PAMPs (pour *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) et déclencher un signal de "danger" via la production de différents médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1β (pour *InterLeukine 1*β) et le TNFα (pour *Tumor Necrosis Factor* α). La conséquence de ce signal est double : faire intervenir rapidement sur le site de l'infection le système immunitaire adaptatif et recruter à proximité des cellules immunocompétentes. Afin de limiter les effets néfastes pour l'organisme d'une réponse inflammatoire trop importante, celle-ci est modulée également par des médiateurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10 (pour InterLeukine 10). Cela constitue un équilibre entre la sur-activation (SIRS) et la sous-activation du système immunitaire (CARS). La perte de cet équilibre est à l'origine de syndromes septiques pouvant évoluer jusqu'au choc septique.

1.4.2 La reconnaissance de l'intrus

Comme vu précédemment, le corps étranger doit être détecté par les cellules du système immunitaire. Cette étape fait intervenir les récepteurs de l'immunité innée, les PRRs, qui sont capables de reconnaître et de se lier aux PAMPs. Cela permet l'activation de voies de signalisation cellulaires donnant lieu à l'expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Les PRRs peuvent être classés selon leur localisation : les PRRs solubles, membranaires et cytoplasmiques.
Les récepteurs membranaires sont les plus étudiés puisque impliqués dans la phagocytose et l'activation de la réponse inflammatoire. Parmi eux, les plus connus sont

les TLRs (pour *Toll Like Receptors*) [24]. Ce sont des protéines transmembranaires de type 1 divisées en trois parties distinctes : le domaine extracellulaire avec pour rôle la réception du signal de danger, le domaine transmembranaire et enfin le domaine intracellulaire permettant la propagation et la transduction du signal d'activation de la réponse.

Treize TLRs ont été identifiés jusqu'à présent chez l'homme, dont les plus connus sont présentés dans le tableau 1.4.

Récepteurs	Ligands	Pathogène	Adaptateurs
TLR1 (+TLR2)	Triacyl de lipoprotéines	Bactéries Mycobactéries	MyD88/MAL
TLR2	Lipoprotéines Peptidoglycanes Acides lipotéichoïques Porines Lipoarabinomannanes OmpA	Bactéries Gram+ Bactéries Gram- Mycobactéries	MyD88/MAL
TLR3	ARN double brin	Virus	TRIF
TLR4	Lipopolysaccharides Protéines virales	Bactéries Gram-	MyD88/MAL TRIF/TRAM
TLR5	Flagelline	Bactéries	MyD88
TLR6 (+TLR2)	Diacyl lipopeptides	Mycoplasme	MyD88/MAL
TLR7/TLR8	ARN simple brin	Virus	MyD88
TLR9	ADN hypométhylé	Bactéries	MyD88

Tableau 1.4 – Agonistes des récepteursTLRs humains les mieux connus et leurs adaptateurs. Yves Delneste et *al.*[24]

Chaque récepteur est spécifique à une catégorie de PAMPs ou DAMPs (pour *Damage Associated Molecular Pattern*, figure 1.3).

Bien qu'ils soient spécifiques à leurs ligands, les TLRs peuvent induire des effets similaires en terme de propagation de la réponse en fonction des protéines adaptatrices recrutées au niveau du domaine intracellulaire du récepteur [26].

D'autres PRRs tout aussi importants que les TLRs on été mis en évidence, tels que NOD1 [28] et NOD2 [27, 29] (pour *Nucleotide Oligomerization Domain receptors*). Ces protéines se trouvent à l'intérieur du cytoplasme où elles jouent un rôle de reconnaissance de pathogènes (notamment via le peptidoglycan). Bien que leur voie de signalisation diffère de celle des TLRs, l'activation de ces protéines aboutit également à la libération du facteur de transcription NF-κB (Figure 1.4).

1.4.3 Réponse pro-inflammatoire

La détection de PAMPs/DAMPs par les monocytes va entraîner la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β, l'IL-6 et le TNFα. Outre la

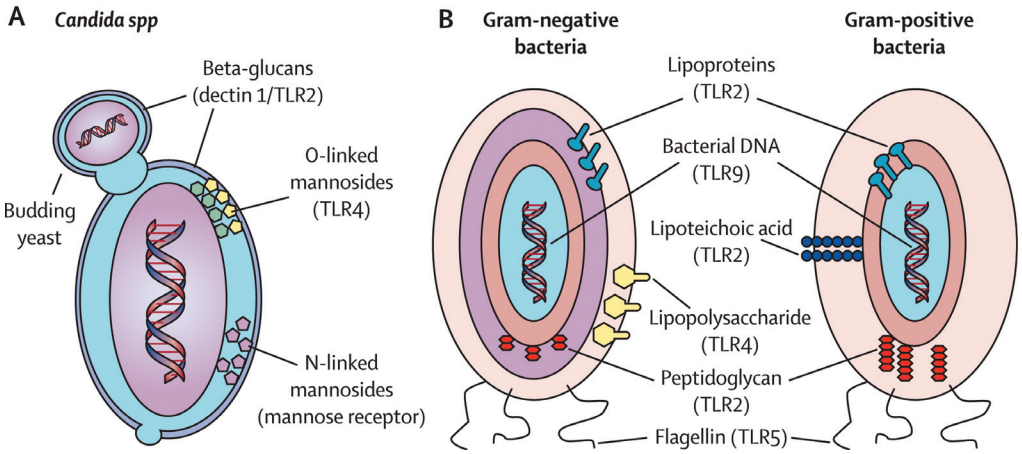


Figure 1.3 – Reconnaissance des différents PAMPs par leurs TLRs spécifiques. (A) Identification d'un champignon. (B) Identification des bactéries à Gram-positive et à Gram-Negatif. Tom van der Poll, et *al.* [25]

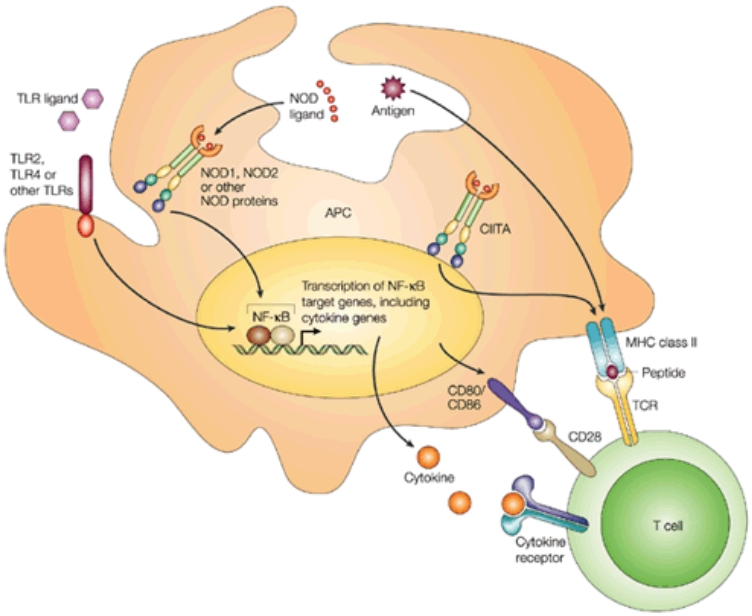


Figure 1.4 – Transduction du signal après activation des NODs et autres PRRs. Naohiro Inohara et *al.*[27]

stimulation de leur propre sécrétion, ces cytokines vont avoir plusieurs fonctions.

La première est l'amplification de la réaction inflammatoire locale via l'initiation de la production d'autres cytokines telles que l'IL-12, l'IL-15, l'IL-18, ou le MIF (pour *Migration Inhibitory Factor*). La production de ces cytokines va également participer à l'activation des neutrophiles (PNN), des lymphocytes et des cellules de l'endothélium. Enfin ces messagers des cellules immunitaires vont favoriser l'adhésion cellulaire et la

production de prostaglandines (via l'action des Cyclo-OXygénases COX-1 et COX2).

La seconde fonction jouée par ces premières cytokines est la stimulation de la production de chimiokines comme l'IL-8, MIP-1α (pour *Macrophage Inflammatory Protein 1* α), MIP-1β, MCP-1 (pour *Monocyte Chimoattractant Protein 1*) et MCP-3. Leur rôle est d'augmenter le chimiotactisme, c'est-à-dire de favoriser la migration vers le lieu d'infection d'autres cellules immunitaires : les lymphocytes, les monocytes/macrophages et les polynucléaires (éosinophiles, basophiles et neutrophiles).

Une dernière fonction de ces cytokines est l'induction de nombreux médiateurs secondaires tels que l'histamine, la sérotonine, et les médiateurs lipidiques comme le PAF (pour *Platelet Activing Factor*) dont les conséquences sont l'augmentation de la perméabilité vasculaire (nécessaire à la migration de cellules immuno-compétentes sur le lieu de l'infection), l'augmentation de l'agrégation plaquettaire et le recrutement de polynucléaires. Le TNFα présent initialement va stimuler la production d'iNOS (pour *inducible Nitric Oxide Synthase*) ce qui conduit à une augmentation d'oxyde nitrique (NO). Ceci a pour conséquence la diminution du tonus vasomoteur et la production, par les PNN et les cellules endothéliales, de puissants radicaux libres (comme l'anion superoxyde O_2^-) redoutables en tant qu'agents microbicides mais causant des lésions tissulaires importantes.

Au niveau vasculaire, la production de radicaux libres et autres substances vasodilatatrices par les cellules endothéliales et phagocytaires provoque des perturbations hémodynamiques précoces. A cela vient s'ajouter l'activation de la cascade de la coagulation (Figure 1.5).

Les cytokines pro-inflammatoires vont avoir des effets majeurs sur deux facteurs principaux du mécanisme de la coagulation [30]. Le premier est l'augmentation de l'expression du facteur tissulaire (TF pour *Tissue Factor*) à la surface des cellules endothéliales qui se lie au facteur VII pour activer le facteur X de la coagulation. Le second est l'augmentation de l'expression de PAI-1 (pour *Plasminogen Activator Inhibitor-1*), ce qui conduit à la diminution de la fibrinolyse (processus de dissolution des caillots sanguins qui sont majoritairement constitués de fibrine). Ces deux facteurs combinés sont à l'origine de l'apparition de micro-thromboses vasculaires pouvant entraîner des troubles de la perfusion tissulaire et provoquer la défaillance d'organes.

Au niveau plasmatique, les facteurs solubles sont primordiaux dans la genèse de la réaction inflammatoire. Parmi ces nombreux facteurs, on peut trouver les protéines de la phase aigüe de l'inflammation comme la protéine C ou les défensines libérées par les neutrophiles et cellules endothéliales aux propriétés microbicides. Le facteur le plus important reste néanmoins le système du complément. Son activation déclenche la formation de composants aux propriétés chimiotactiques et cytotoxiques comme le complexe d'attaque membranaire [31].

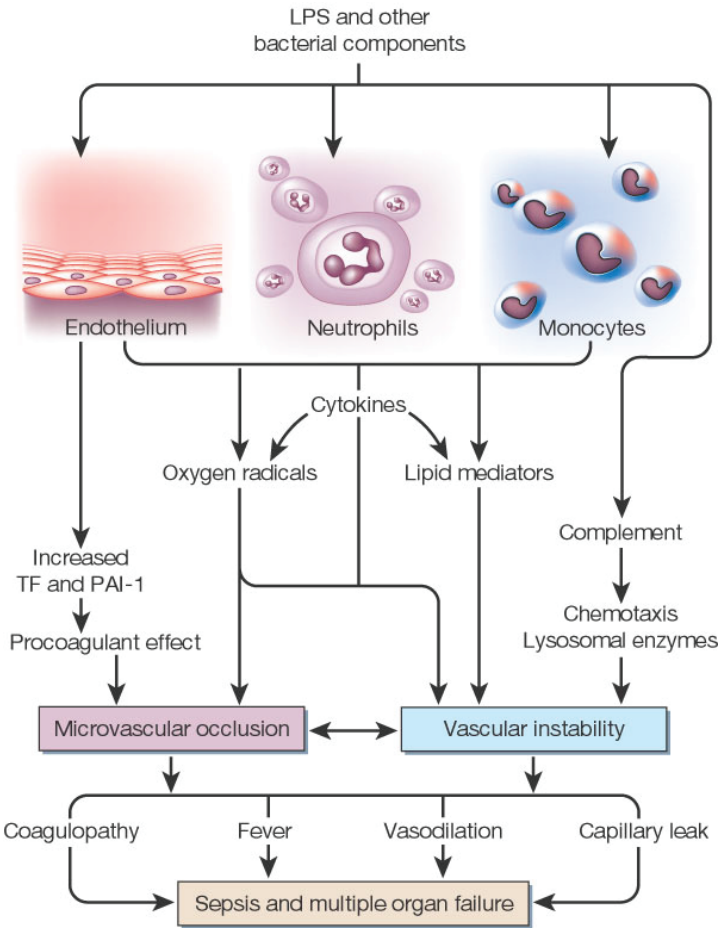


Figure 1.5 – Représentation de la cascade de coagulation responsable de la défaillance multiviscérale lors d'un choc septique. Cohen et *al.* [31]

1.4.4 Réponse adaptative

Le système immunitaire inné est composé de nombreux processus, l'inflammation restant l'un des plus efficaces lorsque celui-ci est contrôlé. Il ne faut cependant pas oublier une autre fonction importante de l'immunité innée, qui est l'orientation de l'immunité acquise vers les antigènes présumés via la production de chimiokines comme l'IL-8 ou la MIP-1α.

Les principaux acteurs du système immunitaire inné tels que les macrophages et les cellules dendritiques sont capables, outre leur rôle de destruction puis de dégradation des agents pathogènes, de présenter les composants antigéniques aux lymphocytes : c'est le point de départ de la réponse adaptative [22, 32]. Suite à ce premier contact avec des antigènes, il va y avoir prolifération des lymphocytes dits naïfs puis une différenciation en lymphocytes B (mastocytes) et en lymphocytes T (LT cytotoxiques, LTh "helpers" ou auxiliaires).

Une fois différenciés, les mastocytes (stade final de différenciation des Lympho-

cytes B) sécrètent des anticorps spécifiques sous forme soluble dont la conséquence est la neutralisation des antigènes, facilitant ainsi le travail des phagocytes. Ils sont responsables de l'immunité humorale.

Les lymphocytes T peuvent se diviser en deux familles, les lymphocytes T cytotoxiques et lymphocytes T auxiliaires (helpers). Ils ont une place importante dans la pathologie du sepsis et donc du choc septique. En plus de leur rôle de destruction des cellules cibles infectées via des mécanismes d'apoptose, les lymphocytes cytotoxiques (T CD8+) sont à l'origine de la libération d'IFN-γ [33] (puissant activateur des macrophages) qui a pour conséquence directe l'amplification de la réaction pro-inflammatoire locale.

Les lymphocytes auxiliaires (T CD4+) peuvent se différencier en deux classes selon le facteur de prolifération présent. En présence d'IL-12 synthétisée principalement par les monocytes, les CD4+ se différencient en LT-helpers 1 aux propriétés clairement pro-inflammatoires. En présence d'IL-4 synthétisée par les basophiles et les mastocytes, les CD4+ se différencient en LT-helpers 2 avec des propriétés relativement anti-inflammatoires. Les LTh1 (pour *LT-helpers 1*) sont également à l'origine de la sécrétion d'IFN-γ mais aussi la sécrétion de TNFα et de l'IL-2, des cytokines aux propriétés pro-inflammatoires. A l'inverse, les LTh2 (pour *LT-helpers 2*) sont reconnus comme à l'origine d'une sécrétion d'IL-4, d'IL-10 et IL-13, ces dernières étant impliquées dans des processus anti-inflammatoires dont l'inactivation des macrophages. Les cytokines originaires de la balance LTh1/LTh2 exercent d'importants effets sur l'activation macrophagique et donc sur la régulation de la réponse inflammatoire.

1.4.5 Réponse anti-inflammatoire

Il est désormais admis par la communauté scientifique que les phases pro- et anti-inflammatoires ne sont pas consécutives comme on pourrait l'imaginer mais plutôt concomitantes. Les différents états septiques et leur gravité dépendent de l'équilibre entre ces deux phases [34]. Cet équilibre est nécessaire pour se protéger des effets délétères d'un emballement de l'inflammation.

Il existe pour cela ce qu'on pourrait appeler des boucles de rétrocontrôle négatif axées autour de trois populations de cellules immunitaires : les macrophages et les polynucléaires stimulés par la présence d'antigènes, les cellules endothéliales stimulées par la présence de cytokines pro-inflammatoires et enfin les lymphocytes Th2 vus précédemment. Le point commun de ces trois populations est la production en grandes quantités de cytokines anti-inflammatoires. Parmi ces cytokines, on peut en citer trois jouant un rôle majeur. L'une des plus importantes est l'IL-1ra (pour *Interleukin 1 receptor antagonist*). Comme son nom l'indique, cette cytokine bloque l'action d'IL-1α et d'IL-1β en agissant comme un antagoniste compétitif sur le récepteur d'IL-1. IL-1ra se fixe sur le récepteur avec relativement la même affinité qu'IL-1α et IL-1β mais ne produit aucune réponse [35]. L'IL-1ra est synthétisée par les monocytes et les macrophages

et est relâchée dans la circulation systémique avec une concentration pouvant être jusqu'à cent fois supérieure à celle d'IL-1α [36].

Cependant, la cytokine jouant le rôle majeur dans la réponse anti-inflammatoire est l'IL-10. Celle-ci est principalement synthétisée par les monocytes mais également par les lymphocytes Th2. Cette cytokine va tout d'abord stimuler la production des inhibiteurs de l'IL-1β et du TNFα [37]. En se fixant sur les récepteurs des macrophages, elle est responsable de l'inhibition de la production d'IL-12 (nécessaire à la différenciation des lymphocytes Th naïfs en lymphocytes Th1), mais également celle de TNFα, d'IL-1β, d'IL-6, ainsi que des chemokines IL-8, MIP-1α et MIP-2α [38]. Enfin, cette cytokine entraîne l'inhibition de la production de NF-κB et provoque l'internalisation intra-cellulaire des molécules d'HLA-DR à la surface des monocytes [39].

Enfin, on peut citer IL-4 comme une cytokine ayant un effet important dans la réaction anti-inflammatoire. Elle est principalement produite par des lymphocytes B activés, des lymphocytes Th2 mais également par des cellules stromales [40]. Cette cytokine joue trois fonctions principales. Il s'agit tout d'abord d'un facteur de prolifération des lymphocytes T auxiliaires naïfs induisant leur différenciation en Th2 qui eux-mêmes produisent l'IL-4, et donc auto-stimulent leur différenciation. Ensuite, l'IL-4 permet d'inhiber la synthèse par les macrophages des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, TNFα et IL-6 tout en stimulant la synthèse de l'IL-1ra et d'inhibiteurs du TNFα. Enfin, l'IL-4 agit également sur les lymphocytes NK en inhibant la production de l'IFN-γ.

1.4.6 Mécanismes de la défaillance d'organes

Comme énoncé précédemment, le pronostic des syndromes septiques est souvent lié à la défaillance d'un ou de plusieurs organes. La pathogénèse de cette dysfonction d'organes est multifactorielle et influe directement sur plusieurs systèmes (système hémostatique, cardiovasculaire, endocrinien et le système nerveux central). Les mécanismes dominants de la dysfonction d'organes sont les troubles hémodynamiques de la micro et de la macro-circulation entraînant une disoxie (insuffisance respiratoire cellulaire) qui est le plus souvent secondaire à une insuffisance circulatoire aiguë.

Les troubles hémostatiques sont la conséquence d'une perturbation de la balance coagulation/fibronolyse liée à une activité inflammatoire disproportionnée. Lors d'un choc septique, la libération en trop grande quantité de cytokines pro-inflammatoires conduit à une sur-expression du facteur tissulaire à la surface des cellules endothéliales et entraîne donc une forte stimulation de la coagulation (cascade de coagulation). Par ailleurs cet "orage cytokinique" provoque une augmentation de l'expression de PAI-1 (principal inhibiteur des activateurs du plasminogène) ce qui conduit à la diminution de la fibrinolyse [30]. La combinaison de ces deux facteurs peut provoquer la formation de caillots sanguins (thromboses) entrainant une diminution de la perfusion sanguine dans les tissus voisins et engendrant une hypoxie localisée.

Ces troubles hémostatiques périphériques observés dans l'ensemble du corps humain jouent un rôle important dans les désordres viscéraux dont ceux du système cardiovasculaire. Ce ne sont néanmoins pas les plus influents. L'existence d'une atteinte myocardique précoce traduite par une diminution plus ou moins importante de la fraction d'éjection ventriculaire joue un rôle au moins aussi important. Une partie des cytokines sécrétées lors du processus pro-inflammatoire (IL-1β, IL-2, IL-6, TNFα et PAF) agissent sur les myocytes cardiaques en diminuant leur contractilité [41]. Selon Brady et *al.*, ces cytokines augmentent la synthèse de NO qui réagit avec les métabolites de l'oxygène d'une part et qui réduit la concentration de calcium intracellulaire d'autre part. Cela finit par créer des lésions endothéliales et par diminuer la contractilité ventriculaire. On observe une détérioration des fonctions de ces cellules lésées conduisant à une diminution du flux sanguin et par conséquent un déficit d'apport en oxygène provoquant une hypoxie d'une partie du myocarde, conduisant à une baisse du débit cardiaque [42].

Le système neuro-endocrinien est également perturbé selon différents axes pendant le sepsis. Au niveau de l'axe hypotalamo-hypophysio-surrénalien et sous l'effet des cytokines pro-inflammatoires, il a été observé une augmentation de la sécrétion de la neurohormone CRH (pour *Corticotropin-Releasing Hormone*) par l'hypothalamus. Celui-ci va stimuler les cellules basophiles du lobe antérieur de l'hypophyse qui vont augmenter de façon importante la libération d'ACTH (pour *AdrénoCorticoTrophine Hormone*) qui, à son tour, va stimuler la production de glucocorticoïdes au niveau des glandes surrénales. Cette réaction en chaîne a pour conséquence l'augmentation du cortisol plasmatique corrélé par Annane et *al.* à la gravité du choc septique [43]. En agissant au niveau cardiaque et au niveau vasculaire, ce mécanisme tend à maintenir l'homéostasie cardiovasculaire. Une augmentation insuffisante contribuera à une défaillance hémodynamique. Au niveau de l'axe de la régulation de la glycémie, on peut observer deux phénomènes majeurs : une augmentation des hormones hyperglycémiantes dont le cortisol et l'apparition d'une résistance à l'insuline due à la présence en grande quantité d'IL-1β et de TNFα. La résultante de ces deux phénomènes conjugués est une hyperglycémie qui modifie les réactions inflammatoires et immunitaires et conduit à la production de molécules oxygénées réactives. La vasopressine occupe également une place importante dans la régulation du système neuro-endocrinien. Il s'agit d'une hormone anti-diurétique sécrétée par l'hypothalamus. Il a été démontré une diminution progressive de sa concentration plasmatique pendant un choc septique [44]. Or, la vasopressine est nécessaire à la régulation de la pression artérielle selon deux mécanismes majeurs agissant sur la contraction musculaire lisse d'une part, et l'augmentation de la réabsorption d'eau d'autre part.

Enfin, le système nerveux autonome (ou viscéral), responsable des fonctions automatiques, fait partie de ceux mis en avant en tant que participants à la genèse du choc septique et du syndrome de la défaillance multiviscérale [31]. Le mécanisme principal mis en cause dans son dysfonctionnement serait lié à un défaut d'utilisation

de l'oxygène expliqué par une inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale médiée par le NO (pour *Nitric Oxyde*) dont la synthèse est stimulée par la présence de TNFα et autres cytokines pro-inflammatoires. Cela provoque une hypoxie suivie d'une apoptose de neurones et de cellules gliales des centres cardiovasculaires du système nerveux autonome [45].

1.5 Problématique

Les syndromes septiques sont des états pathologiques difficiles à appréhender et à traiter en raison du caractère multidisciplinaire et de la complexité des processus mis en jeux. Le nombre élevé d'entités biologiques et des relations quantitatives les reliant entre elles, la différence d'échelles spatiales et temporelles et les nombreuses rétroactions mises en place lors d'une réponse inflammatoire rendent presque impossible la prise en compte de cette pathologie dans son ensemble pour un esprit humain. Ces arguments font de la modélisation numérique un outil de choix dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques.

Partant de l'hypothèse que l'évolution vers des syndromes septiques graves est la conséquence d'une perte de contrôle précoce de la réponse inflammatoire du système immunitaire face à l'infection, l'objectif de ce travail est de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques via l'identification et la simulation *in silico* d'un ou de plusieurs des mécanismes physiologiques impliqués dans la régulation de la réponse inflammatoire précoce.

Dans un premier temps, nous nous sommes appuyés sur des approches d'analyse en bioinformatique et sur deux bases de données transcriptomiques pour identifier les mécanismes biologiques mis en jeu tout au long de la résolution d'une réponse inflammatoire. Le croisement des mécanismes intervenants chez les patients de ces deux bases de données a permis d'identifier la voie de signalisation mTOR comme discriminante entre les cas non pathologiques de SIRS et les cas de syndromes septiques.

Nous avons ensuite mis au point des approches de modélisation logique et développé un outil de simulation pour explorer *in silico* la réponse de la voie de signalisation TLR4 suite à différents *stimuli*. En nous basant sur les connaissances disponibles dans la littérature, nous avons produit un modèle logique de la voie TLR4. Ce modèle a été utilisé pour explorer qualitativement le rôle joué par la voie mTOR dans la régulation d'une réponse inflammatoire.

CHAPITRE 2

PARTIE I : ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE

Au vu de la complexité des mécanismes mis en jeux lors d'un SIRS ou d'un sepsis, la modélisation est devenue un outil de plus en plus mis en avant dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques.

A l'image des travaux réalisés par Calvano et *al.* [46], l'approche transcriptomique apporte de nouvelles perspectives dans l'étude de la réponse inflammatoire. Dans le cadre d'un programme de recherche centré sur l'exploration de la réponse inflammatoire, les auteurs se sont aidés de la technologie des puces à ADN pour mesurer, à différents intervalles de temps, le niveau d'expression des gènes des leucocytes présents dans le sang avant et après l'injection de Lipopolysaccharides (LPS, composant essentiel de la paroi des bactéries à Gram négatif). Cela a permis d'explorer la dynamique des mécanismes intervenant dans la régulation de l'inflammation lors d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique contrôlée ; l'ensemble des sujets ayant retrouvé leur état physiologique dans les 24 heures suivant l'injection de LPS.

Afin d'identifier les mécanismes potentiellement impliqués dans une perte de contrôle de la régulation de la réponse inflammatoire, nous nous sommes appuyés sur les résultats de cette première étude et les avons comparés à ceux d'une autre plus récente portant sur des cas pathologiques de sepsis observés en services de réanimation. Ainsi, la première partie de ce travail a consisté en l'analyse d'une subdivision de la base de données issue de l'étude de Calvano et *al.* pour étudier la cinétique d'une réaction inflammatoire. Dans un deuxième temps, le reste de cette base de données a été utilisée pour confronter, à un niveau intracellulaire, les mécanismes jouant un rôle dans la régulation de la réaction inflammatoire entre des sujets sains et des sujets pathologiques.

L'objectif de cette première partie de thèse a été d'identifier la ou les voies métaboliques qui s'expriment de manière significativement différente entre des cas de SIRS

induit (où la réponse inflammatoire reste proportionnée et sous contrôle) et des cas de sepsis en services de réanimation avec une réponse inflammatoire exacerbée et incontrôlée.

2.1 Introduction

Depuis la découverte de la structure en double hélice de l'ADN (pour Acide DésoxyriboNucléique) par J.Watson et F.Crick en 1953, le génie génétique n'a eu de cesse de se développer.
Tout d'abord avec l'ère de la génomique et l'apparition de la technique de séquençage d'acides nucléiques mise au point par F. Sanger en 1977.
Plus récemment, avec l'ère de la transcriptomique dont l'avènement est lié au séquençage complet à 99,99% du génome humain [47] en 2003, il a été observé une démocratisation de l'utilisation de puces à ADN pour répondre à des hypothèses biologiques.

Depuis la création de la première puce (sur membrane de nylon) en 1987, cette technologie connait un grand succès compte tenu de son faible coût par rapport à la grande quantité de données observables. Si on prend l'exemple de GEO (pour Gene Expression Omnibus [1]), l'un des principaux entrepôts de données du transcriptome, il n'existait en 2000 que deux fichiers d'expression de gènes référencés, aujourd'hui cette même base en compte presque deux millions.

2.1.1 Rappels sur les gènes et leur expression

Il est difficile de décrire le fonctionnement d'une puce à ADN sans revenir sur quelques définitions des gènes et de leur expression.

L'ensemble des molécules d'ADN d'un organisme constituent son génome. Un gène est une séquence d'ADN qui code pour la synthèse d'une protéine (chaîne(s) polypeptidique(s)) ou d'un ARN (Acide RiboNucléique) fonctionnel. Le passage de l'ADN à une protéine se fait en deux étapes : la transcription et la traduction. Pendant la transcription, l'ADN double brin est transcrit en plusieurs copies d'ARN simple brin. Les ARNm (ARN messagers) sont des molécules d'ARN contenant la séquence d'une protéine qui, après un certain nombre d'étapes de maturation, vont participer au processus de traduction dans le cytoplasme de la cellule. La traduction est le processus biologique au cours duquel un ribosome lit l'ARNm et le traduit en une protéine. Cette protéine passera généralement ensuite par des procédés de maturation avant de devenir fonctionnelle.

Bien que le génome d'un organisme soit le même d'une cellule à une autre, l'expression des gènes est différente en fonction de la stimulation des cellules et du tissu dans lequel elles se trouvent. En effet, le nombre de gènes codants chez l'homme est

1. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/

aujourd'hui évalué à environ 30000, mais cette estimation reste fluctuante donnant des chiffres compris entre 20000-25000 [48] et 40000. Ces gènes ne sont pas toujours traduits car leur expression est soumise à des processus de régulation de la transcription. C'est pour cela que même si on évalue à 200000 le nombre d'ARNm différents chez l'homme, seulement 10000 à 15000 d'entre eux seraient exprimés dans une cellule spécialisée pour un instant donné (figure 2.1).

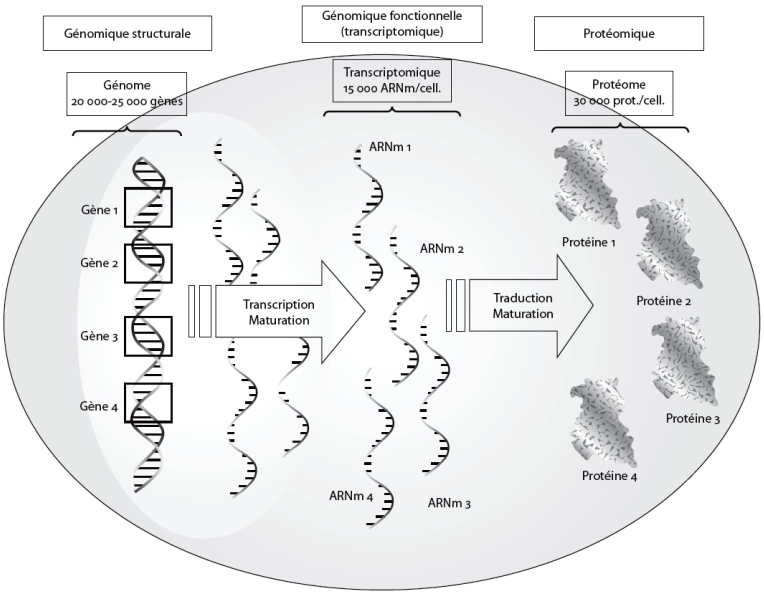


Figure 2.1 – Représentation des trois principaux niveaux de granularité du génie génétique : le génome, le transcriptome et le protéome. Source : Appareils et méthodes en biochimie et biologie-2e éd.Bernard Hainque, Bruno Baudin et Philippe Lefebvre

L'ensemble des ARNm transcrits présents dans une cellule à un instant précis et dans une condition biologique donnée constituent son transcriptome. Par conséquent, son étude permet non seulement d'analyser l'expression des gènes et les mécanismes génétiques associés ; mais aussi de connaître la cinétique des phénomènes cellulaires, d'améliorer la compréhension des voies métaboliques et enfin d'inférer les fonctions de gènes inconnus grâce à l'identification de leur co-régulation avec des gènes connus.

Au vu de la complexité du fonctionnement du corps humain, les puces à ADN apparaissent aujourd'hui comme un outil privilégié pour l'analyse de certains de ses mécanismes comme celui de la réaction inflammatoire. L'avantage majeur de cette technologie est la possibilité de pouvoir analyser simultanément le niveau d'expression de plusieurs milliers de gènes pour un type cellulaire choisi et dans un contexte physiologique/physiopathologique particulier.

2.1.2 Principe des puces à ADN

Le principe de fonctionnement des puces à ADN est fondé sur la propriété d'hybridation spécifique entre deux séquences nucléotidiques complémentaires.
Les puces Affymetrix© analysées dans cette étude comportent plusieurs dizaines de milliers d'unités d'hybridation (*probe sets* en anglais) fixées sur une surface solide (verre avec un revêtement en silicone).

Chaque *probe set* se compose d'une vingtaine de séquences oligonucléotidiques de synthèse longues de 20 à 25 bases (sondes). Deux sortes de sondes existent pour chaque *probe set*. Les premières sont composées de séquences appelées PM (pour *Perfect Match*) et spécifiques d'un transcrit. Les secondes se composent de séquences nommées MM (pour *MisMatch*) et qui ont été volontairement mutées au milieu de leur séquence. La création de cette mutation a pour objectif de mesurer l'hybridation non spécifique, phénomène observé lorsqu'un brin de transcrit s'hybride à la fois sur une séquence PM et MM.

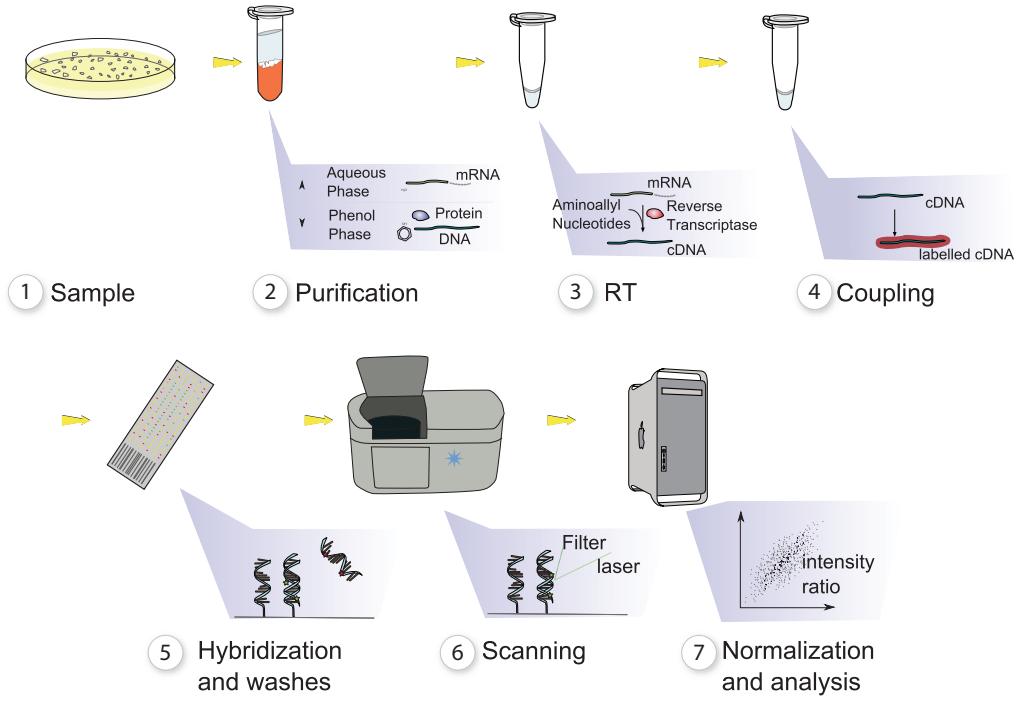


Figure 2.2 – Etapes nécessaires à une analyse de transcriptome avec une puce ADN Affymetrix© : 1. Sélection des cellules d'intérêt, 2. Préparation de l'ARNm, 3. Amplification puis Reverse Transcriptase de l'ARNm, 4. Marquage fluorescent, 5. Hybridation avec les sondes puis lavages, 6. Analyse des sondes par laser, 7. Analyse d'image. Adapté de l'illustration de Squidonius (public domain), Wikimedia.

Plusieurs manipulations préalables sont nécessaires avant de pouvoir réaliser l'analyse du transcriptome d'une cellule (figure **2.2**). Il faut tout d'abord isoler les cellules

d'intérêt. Les parois de ces cellules sont ensuite lysées pour récupérer les molécules d'intérêt, les ARNm. Ces ARNm sont transformés en ADNc (ADN complémentaire) par un processus de *Reverse Transcriptase* (rétro-transcription) puis purifiés et amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction). Une étape de marquage fluorescent est réalisée avant que ces molécules ne soient déposées sur les puces pour l'hybridation. Après plusieurs étapes de lavage, les puces vont être scannées grâce à l'interaction entre les flurorochromes ayant servi au marquage et des lasers. L'image produite est par la suite traitée numériquement pour obtenir une matrice d'intensités de signaux. Chaque cellule de la matrice correspond à l'intensité lumineuse mesurée sur un point de la puce et donne une évaluation de la quantité d'ARNm correspondant à ce point, dans la cellule pour l'échantillon étudié.

2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Le pré-traitement des données de puces

Les données issues des puces à ADN ne peuvent pas être utilisées directement car elles sont trop "bruitées". En effet, celles-ci sont soumises à deux formes importantes de variabilité lors des manipulations : une variabilité biologique, que l'on cherche justement à mesurer, mais également une variabilité technique (introduite par des différences de concentrations, de manipulations, de qualités de réactifs…) et que l'on veut éliminer [49].

Le pré-traitement (*preprocessing*) consiste en une succession d'étapes nécessaires à l'exploitation des données d'expression des gènes. Celui-ci permet de s'affranchir de la variabilité expérimentale pour débruiter le signal biologique et favoriser la comparaison des puces entre elles [50]. Cette opération augmente la spécificité, c'est-à-dire l'aptitude à détecter l'expression d'un gène, si expression il y a réellement.

La correction du bruit de fond (*background correction*) est la première de ces étapes. Celui-ci provient généralement de phénomènes physiques tels que les dépôts de poussières, de bruit dans l'instrumentation, ou de tout artefact. L'intensité de chaque sonde est ainsi corrigée en utilisant l'information sur chaque puce.

La seconde étape est appelée "normalisation" et part de l'hypothèse que peu de gènes sont différentiellement exprimés entre deux conditions étudiées. Le but de la normalisation est de rendre les niveaux d'expression des gènes entre les puces à ADN comparables entre elles en transformant les signaux de sondes pour chaque gène et pour chaque puce. Cette étape consiste à identifier puis à supprimer les erreurs systématiques entre les puces.

L'étape de correction des PM est liée à la structure des puces Affymetrix© dont la moitié des sondes sont de type MM (*MisMatch*). Ce procédé vise à obtenir une valeur proportionnelle des MM au nombre réel de transcrits hybridés sur les PM (*Perfect Match*).

Enfin, la dernière étape est appelée la *summarization*. Essentiellement statistique, ce processus est lié au fait que les sondes d'un même *probe set* n'ont pas pour origine la même partie de la séquence cible. A la fin de cette étape, nous disposons d'une matrice, avec pour chaque ligne correspondant aux *probe sets*, une valeur attribuée d'expression.

2.2.2 Description des études

2.2.2.1 L'étude de Calvano

Menée dans le cadre d'un programme de recherche multi-disciplinaire (projet *Gluegrant* [2]), l'étude de Calvano [46] et de son équipe avait pour objectif l'amélioration de la compréhension de la réaction inflammatoire. Cette analyse, basée sur l'analyse des réseaux de gènes, avait pour but d'identifier la dynamique des mécanismes de la réponse inflammatoire perturbés après un *stimulus* du système immunitaire.

Le protocole de cette étude peut être divisé en deux étapes principales. La première a consisté à induire une réaction inflammatoire systémique (SIRS) sur un des deux sous-groupes (sujets sains, âge compris entre 18 et 40 ans). Les sujets du premier sous-groupe (n=4) se sont vus administrer une dose de 2 $ng.kg^{-1}$ de LPS (pour LipoPolySaccharides, composant essentiel de la paroi des bactéries à Gram négatif) en intraveineuse alors que ceux appartenant au deuxième sous-groupe (n=4), le groupe contrôle, ont reçu une perfusion de solution saline (0,9% de chlorure de sodium). Des prélèvements de sang ont été effectués avant l'injection de LPS ou de solution saline (à T0), puis à 2, 4, 6, 9, et 24 heures. La seconde étape, dont l'unique but a été de créer un jeu de données de validation, a consisté en l'administration de la même dose de LPS à un seul groupe (sujets sains, n=6). Des prélèvements de sang ont été effectués avant l'injection d'endotoxine (à T0), puis à 2 et 6 heures. Pour chaque échantillon de sang, les leucocytes ont été isolés et la totalité de leur ARN cellulaire a été extraite puis synthétisé en ADNc. L'hybridation a ensuite été réalisée à l'aide de puces Affymetrix Human Genome U133A et U133B pour la première étape de l'étude, et avec des puces Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 pour la dernière étape.

2.2.2.2 L'étude de Sutherland

Entre 2007 et 2009, l'équipe de Sutherland [51] a réalisé une étude dans quatre unités de soins intensifs en Australie dans le but d'identifier des biomarqueurs pour la détection précoce de sepsis.

Pour cela, trois groupes de patients ont été retenus, un groupe sepsis (n=10), un groupe post-chirurgie (n=11) et enfin un groupe contrôle (n=20). Les critères d'inclusion du premier groupe étaient des patients de plus de 18 ans présentant les symptômes d'un sepsis dont les critères cliniques on été définis par le consensus

2. http://www.gluegrant.org/

ACCP/SCCM de 1992 [5] et dont l'infection à été prouvée. Leur indice de masse corporelle était inférieur à 40 et ils avaient été admis depuis moins de 24 heures en soins intensifs. Le second groupe se compose de patients recrutés avant une intervention chirurgicale et développant par la suite une réponse inflammatoire systémique [52] (sans origine infectieuse) dans un intervalle de 24 heures suivant l'opération. Enfin, les critères d'inclusion du dernier groupe étaient des personnes faisant partie du personnel médical de l'hôpital, non malades au moment de la prise de sang et sans antécédents de dysfonctions du système immunitaire. Tout comme pour l'expérience de Calvano, des prises de sang ont été effectuées aux membres des trois groupes, les leucocytes ont été isolés et la totalité de leur ARN cellulaire a été extrait puis synthétisé en ADNc. L'hybridation a ensuite été réalisée à l'aide de puces Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0.

2.2.3 Récupération des données

L'ensemble de nos analyses ont été réalisées à partir de jeux de données bruts créés par les équipes de Calvano [46] et de Sutherland [51] dans leurs études respectives. Les bases de données sont disponibles en libre accès sur GEO. Les données brutes correspondantes à l'étude de Calvano SE. et *al.* sont répertoriées avec la référence GSE3284 (110 fichiers CEL) et celles correspondantes à l'étude de Sutherland A. et *al.* le sont avec la référence GSE28750 (41 fichiers CEL).

L'absence dans la littérature scientifique récente d'études transcriptomiques réalisées sur le sepsis et sur des puces de type *Human Genome* U-133A et *Human Genome* U-133B a conduit à utiliser la première partie de la base de données de Calvano dans une optique principalement exploratoire. L'objectif a été de déterminer si les intervalles de temps du jeu de données de validation de l'étude de Calvano (à savoir 2 heures et 6 heures), réalisé sur des puces *Human Genome* U-133 plus 2.0, permettaient l'observation d'épisodes de régulation de la réaction inflammatoire.

Les données issues de la première partie de l'étude de Calvano ont donc été utilisées dans le but de confirmer, comme il a été vu dans les résultats de son article, que les principaux processus de régulation du système immunitaire se déroulent entre 0 et 2 heures, puis entre 6 et 9 heures.

Les données issues de la seconde partie de l'étude de Calvano initialement créées dans un objectif de validation, ont été utilisées pour la comparaison entre les processus de régulation du système immunitaire mis en jeux lors d'un SIRS induit artificiellement et ceux d'un sepsis observé en milieu hospitalier.

2.2.4 Lecture et pré-traitement des données

L'analyse de données issues de *microarrays* a été faite grâce à l'outil R (*R version 3.1.1*) et la suite de librairies fournies par *Bioconductor*.

2.2.4.1 Importation des données dans R

Comme le montre le code R ci-dessous, l'importation des fichiers d'intensités de signal de puces pour chaque échantillon s'est faite à l'aide de la librarie *affy* conçue pour l'exploitation des données de puces Affymetrix© :

```
source("http://bioconductor.org/biocLite.R")
biocLite("affy") # Installation de la librairie affy
library("affy") # Chargement de la librairie affy
setwd("~/Desktop/R/db/Exp_1/") # Definition du dossier de travail
Calvano.rawdata <- ReadAffy() # Chargement des fichiers d'intensite
```

La fonction *ReadAffy()* permet de charger dans la variable définie l'ensemble des fichiers "CEL" (format spécifique aux fichiers d'intensité de puces) contenus dans le dossier de travail.

2.2.4.2 Pré-traitement des données

Comme vu précédemment, les données ne sont pas exploitables à ce stade puisque trop bruitées. Une étape de pré-traitement est donc nécessaire pour l'exploitation des données brutes :

```
norm.Calvano.rawdata<-expresso(Calvano.rawdata, pmcorrect.method="pmonly",
    bgcorrect.method="none", normalize.method="invariantset", summary.method="
    liwong") # Utilisation de expresso() pour le pre-traitement des donnees
expr.Calvano.data<-(log2(exprs(norm.Calvano.rawdata)))
```

Cette partie a été réalisée avec la fonction *expresso()*. Son principal avantage est de combiner plusieurs alternatives, permettant ainsi de reproduire le plus fidèlement possible le fonctionnement du logiciel dChip [53], utilisé initialement par Calvano et *al.* [46].

L'algorithme implémenté dans dChip intègre une normalisation de type *invariant set* puis applique un modèle *pmonly de liwong* [54, 55].

La méthode de normalisation par *invariant set* consiste en une régression non paramétrique basée sur la sélection d'un sous-ensemble de gènes $(g_1,\ldots,g_N)$, correspondant à un sous-ensemble de sondes $(s_1,\ldots,s_K)$, de sorte à ce que le rang de ces sondes reste invariant entre les puces $(s_1<s_2<s_3\ldots s_K)$.

La méthode de *summarization* de *liwong* qui a été utilisée permet d'estimer la quantité de transcrit fixé sur les sondes de type PM (*Perfect Match*), et par conséquent, le niveau d'expression des gènes correspondants. Cette méthode est basée sur le modèle suivant :

$$PM_{ij} = v_j + \theta_i\alpha_j + \theta_i\phi_j + \epsilon, \epsilon \sim \mathcal{N}(0,\sigma^2)$$

Avec $v_j + \theta_i\alpha_j$ la réponse de la j^{eme} paire de sondes à une hybridation non spécifique pour un échantillon i, $\theta_i\phi_j$ la réponse à une hybridation spécifique et ϵ le terme d'erreur de l'équation.

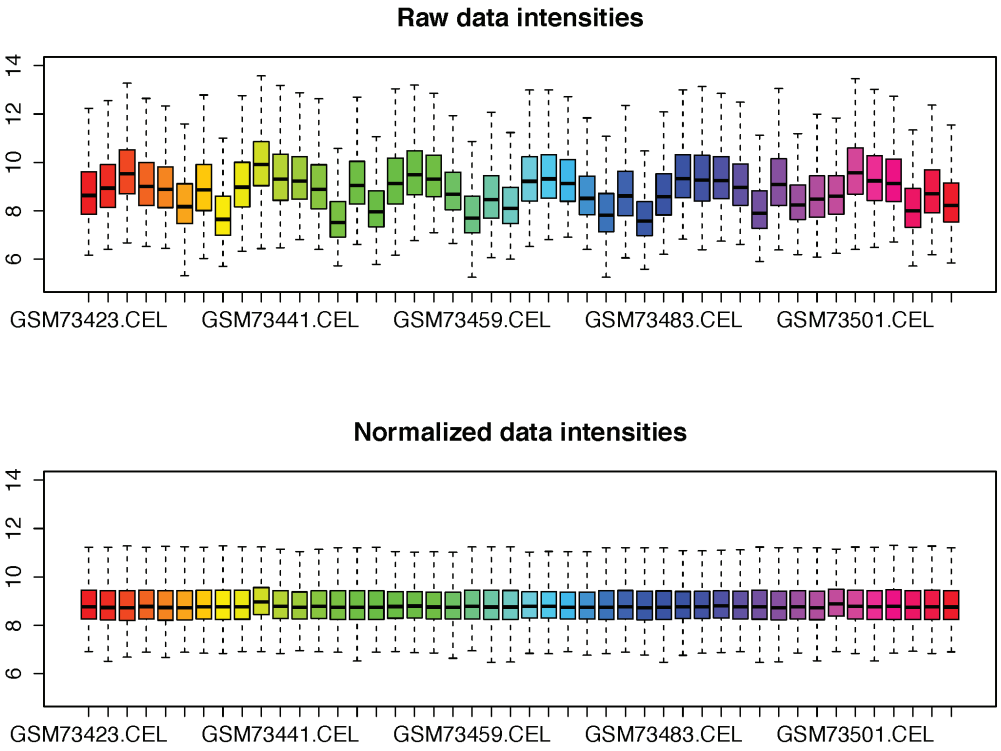


Figure 2.3 – Comparatif des boxplots des intensités brutes (log2) avant (en haut) et après (en bas) l'étape de *preprocessing* sur l'ensemble des puces HGU-133A de l'étude de Calvano. Chaque boîte illustre la distribution des intensités de chaque puce. La ligne intérieure d'une boîte indique la valeur médiane, les extrémités les 1er et 3e quartiles.

Compte tenu des performances de cette méthode [56], et de l'impact que représente le *preprocessing* sur les résultats finaux en termes de sensibilité et donc de comparabilité (figure 2.3), cette technique a été appliquée de manière identique à l'ensemble des bases de données utilisées.

2.2.5 Identification des cibles différemment exprimées

En raison du type de données qui les composent, les deux parties de l'analyse n'ont pas été réalisées avec la même méthode d'identification des gènes exprimés.

La première partie, dont le but a été d'identifier des étapes clés dans la dynamique de la régulation du système immunitaire, est effectuée sur des données de type temporelles avec répétitions sur les mêmes individus. La fonction choisie a été *maSigPro*. Pour la seconde partie qui a consisté à comparer différents états de stimulus à des états de contrôle, la fonction utilisée a été *Limma*.

MaSigPro (pour *MicroArray SIGnificant PROfiles*) est un outil spécialement conçu pour l'analyse des données transcriptomiques issues d'expériences de séries tempo-

relles, pour lesquelles il a été démontré plus performant que *Limma* [57]. Ce genre de données est généralement plus compliqué à étudier à cause de la multiplication du nombre de conditions expérimentales, de la nature dynamique des expériences en question et des différences entre les intervalles de temps utilisés. Pour répondre à ce problème, cet outil se base sur l'utilisation de la succession de deux modèles.

Dans un premier temps, l'algorithme va permettre l'identification des gènes significativement exprimés en utilisant un modèle de régression qui est plus adapté aux données dynamiques et permet de traiter le temps et les conditions expérimentales initiales comme des variables quantitatives :

$$Y_{ijr} = \beta_0 + \beta_1 D_{1ijr} + \ldots + \beta_{I-1} D_{(I-1)ijr} + \delta_0 T_{ijr} + \delta_1 T_{ijr} D_{1ijr} + \ldots + \delta_{I-1} T_{ijr} D_{(I-1)ijr} + \ldots + \epsilon_{ijr}$$

Avec Y_{ijr} la valeur de l'expression des gènes normalisée, β et δ les coefficients de régression (linéaire, quadratique) estimés par la méthode des moindres carrés, i le groupe expérimental, j le pas de temps, r le nombre de répétitions, D les variables muettes (*dummy variables*), et T la variable temps.

Dans un second temps, une méthode itérative par paliers (*stepwise backward regression*) est utilisée sur les gènes précédemment identifiés pour ajuster les paramètres du modèle et définir les tendances de variations spécifiques aux gènes (sur ou sous-expression). La performance prédictive est mesurée par un coefficient de prédiction (R^2).

Pour la seconde partie de l'analyse, *Limma* (pour *LInear Models for MicroArray data*) permet d'identifier les gènes différemment exprimés via l'utilisation d'une régression linéaire et d'un modèle bayésien [58]. L'analyse des données de micropuces nécessite cependant la création de deux matrices : P une matrice du plan expérimental et C une matrice des contrastes [59]. Le modèle linéaire est utilisé avec la fonction *lmFit()* suivant l'équation suivante :

$$Y_j = \mathbf{P}\alpha_j + \epsilon_j$$

Avec Y_j l'expression du gène j sur toutes les puces, $\mathbf{P}$ la matrice du plan expérimental, α_j le vecteur de coefficients de contrastes pour le gène g et ϵ_j le terme d'erreur. Les contrastes d'intérêt sont données par :

$$\beta_j = \mathbf{C^T}\alpha_j$$

Avec $\mathbf{C}$ la matrice des contrastes. La nullité du contraste β_j est testée en utilisant la statistique t pondérée (Emperical Bayes test) donnée par :

$$\tilde{t}_j = \sqrt{n}\frac{\hat{\beta}_j}{\tilde{s}_j} \quad \text{avec} \quad \tilde{s_j}^2 = \frac{d_0 s_0^2 + d_j s_j^2}{d_0 + d_j}$$

Avec $\tilde{s_j}^2$ la variance à postériori, d_j et s_j^2 les degrés de libertés et variance du gène j et enfin, s_0^2 et d_0 la variance et les dégrés de liberté à priori.

Bien que les méthodes utilisées par *maSigPro* et *Limma* soient différentes, elles sont toutes deux basées sur des tests multiples. L'inconvénient majeur provoqué par la répétition de tests statistiques est l'inflation du risque de première espèce (risque α), provoquant l'augmentation du nombre de faux positifs : gènes déclarés différentiellement exprimés alors qu'ils ne le sont pas en réalité. La méthode de correction qui a été utilisée est celle développée par Benjamini et Hochberg [60]. Celle-ci est basée sur le contrôle de la proportion d'erreur FDR (pour *False Discovery Rate*) et permet de calculer la p-valeur ajustée pour chaque gène testé.

2.2.6 Classification

Les méthodes de classification ont pour objectif de regrouper les gènes en fonction de la ressemblance de leurs profils d'expressions. L'hypothèse sur laquelle se base ce type de techniques est que deux gènes avec un profil d'expression similaire ont plus de chances de faire partie des mêmes processus biologiques ou d'être régulés par les mêmes facteurs.

L'analyse en Composantes Principales (*ACP*) est une approche statistique qui permet d'isoler les variables qui expliquent au mieux les différences entre les expressions des gènes. L'objectif principal de l'ACP est de projeter les observations dans un espace de faible dimension tout en conservant le maximum de l'information originale : la variabilité des mesures observées sur chaque variable. Compte-tenu de la particularité des données transcriptomiques (matrices déséquilibrées : plus de variables que d'individus), la fonction choisie a été *prcomp* car elle permet de calculer directement la décomposition en valeurs singulières.

L'avantage majeur de cette méthode est de permettre la classification et la visualisation des patients en fonction des patterns d'expression de leurs gènes et de la composante temps.

L'ACP a, par la suite, été complétée par une classification hiérarchique ascendante et sa représentation en *heatmap* grâce aux fonctions *hlclust* et *heatmap.2*. La représentation simultanée des lignes (correspondant aux *probesets*) et des colonnes (correspondant à des échantillons) sous la forme d'un graphe *heatmap* est très répandue dans le domaine de la transcriptomique car elle permet d'observer les liens entre les gènes et les échantillons.

2.2.7 Analyse fonctionnelle

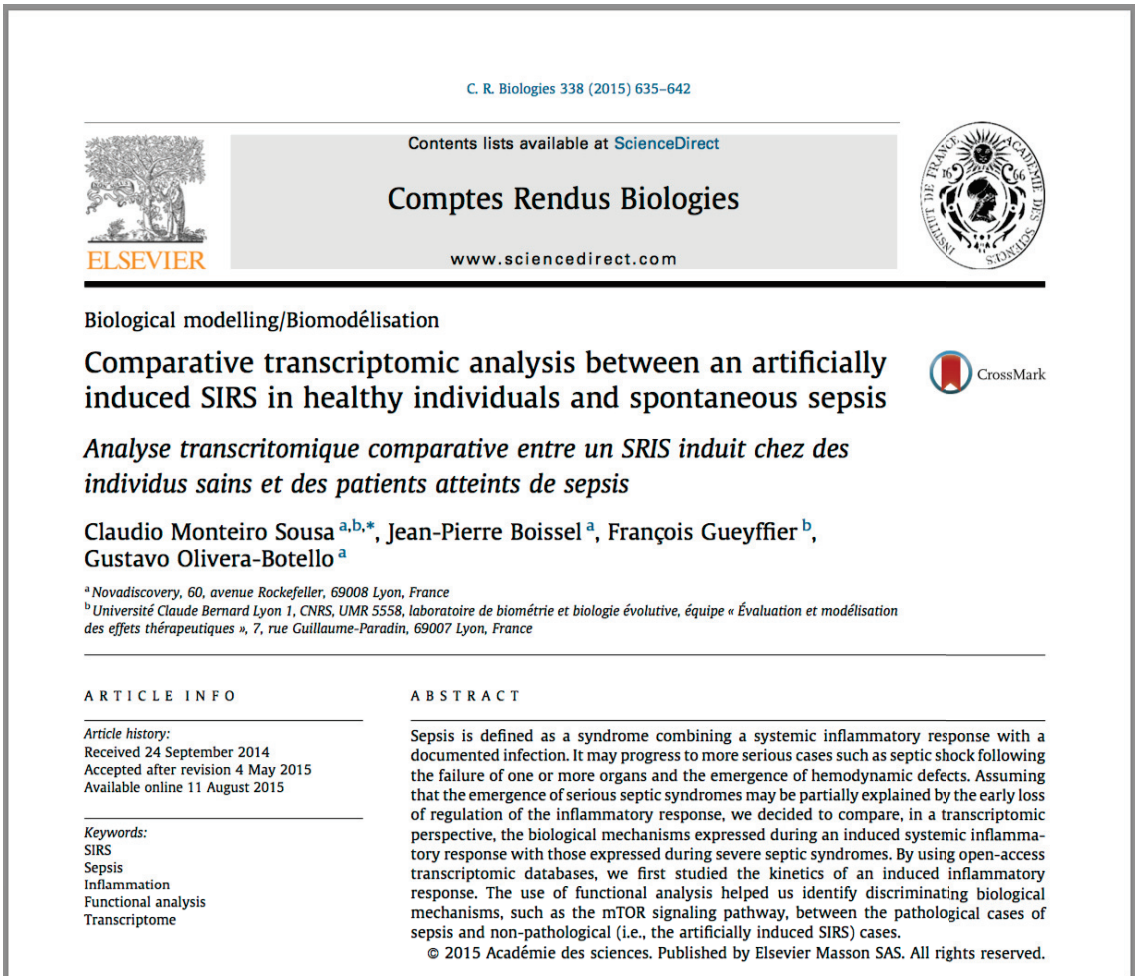
Puisqu'une liste de gènes isolés n'a que peu d'intérêt, l'objectif de cette partie a été de caractériser un gène (ou un groupe de gènes) par sa fonction biologique.

Dans un premier temps, la plateforme *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) et son outil *IPA Core Analysis* ont été utilisés pour identifier les processus biologiques, les voies métaboliques et les réseaux moléculaires affectés à partir des listes de gènes différemment exprimés (obtenues suite à l'analyse sur *Limma*).

Ce même logiciel a ensuite été utilisé pour la comparaison d'un point de vue biologique des différents processus régulatoires de la réaction inflammatoire.

2.3 Article : *Comparative transcriptomic analysis between an artificially induced SIRS in healthy individuals and spontaneous sepsis*

L'ensemble des résultats de cette étude comparative sont présentés dans un premier article publié dans le journal Compte Rendus de l'Académie des Sciences de Biologies en 2015 [61].



C. R. Biologies 338 (2015) 635–642

Contents lists available at ScienceDirect

Comptes Rendus Biologies

www.sciencedirect.com

Biological modelling/Biomodélisation

Comparative transcriptomic analysis between an artificially induced SIRS in healthy individuals and spontaneous sepsis

Analyse transcritomique comparative entre un SRIS induit chez des individus sains et des patients atteints de sepsis

Claudio Monteiro Sousa [a,b,*], Jean-Pierre Boissel [a], François Gueyffier [b], Gustavo Olivera-Botello [a]

[a] *Novadiscovery, 60, avenue Rockefeller, 69008 Lyon, France*
[b] *Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR 5558, laboratoire de biométrie et biologie évolutive, équipe « Évaluation et modélisation des effets thérapeutiques », 7, rue Guillaume-Paradin, 69007 Lyon, France*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 24 September 2014
Accepted after revision 4 May 2015
Available online 11 August 2015

Keywords:
SIRS
Sepsis
Inflammation
Functional analysis
Transcriptome

ABSTRACT

Sepsis is defined as a syndrome combining a systemic inflammatory response with a documented infection. It may progress to more serious cases such as septic shock following the failure of one or more organs and the emergence of hemodynamic defects. Assuming that the emergence of serious septic syndromes may be partially explained by the early loss of regulation of the inflammatory response, we decided to compare, in a transcriptomic perspective, the biological mechanisms expressed during an induced systemic inflammatory response with those expressed during severe septic syndromes. By using open-access transcriptomic databases, we first studied the kinetics of an induced inflammatory response. The use of functional analysis helped us identify discriminating biological mechanisms, such as the mTOR signaling pathway, between the pathological cases of sepsis and non-pathological (i.e., the artificially induced SIRS) cases.

© 2015 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Analyse transcritomique comparative entre un SRIS induit chez des individus sains et des patients atteints de sepsis

Comparative transcriptomic analysis between an artificially induced SIRS in healthy individuals and spontaneous sepsis

Claudio Monteiro Sousa[a,b,*], Jean-Pierre Boissel[a], François Gueyffier[b], Gustavo Olivera-Botello[a]

[a] *Novadiscovery, 60 Avenue Rockefeller, 69008, Lyon, France*
[b] *Université Lyon 1, CNRS, UMR 5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, Equipe Modélisation et Evaluation des Thérapeutiques, 7 rue Guillaume Paradin, 69007, Lyon, France*

Abstract

French version. Le sepsis se définit comme un syndrome combinant une réponse inflammatoire systémique à une infection documentée. Celui-ci peut évoluer vers des cas plus graves tels que le choc septique suite à la défaillance d'un ou de plusieurs organes et l'apparition d'une défaillance hémodynamique.

Partant de l'hypothèse que l'apparition de syndromes septiques graves est la conséquence d'une perte de contrôle précoce dans la régulation de la réponse inflammatoire, nous avons décidé de comparer d'un point de vue transcriptomique les mécanismes opérant lors d'une réponse inflammatoire systémique induite et contrôlée à ceux exprimés lors de syndromes septiques graves.

A partir de bases de données transcriptomiques en libre accès, nous avons étudié la cinétique d'une réponse inflammatoire induite. L'utilisation d'outils bioinformatiques d'analyse fonctionnelle a permis d'identifier des mécanismes biologiques discriminants, tels que la voie de signalisation mTOR, entre des cas pathologiques de sepsis et des cas de SIRS induits non pathologiques.

English version. Sepsis is defined as a syndrome combining a systemic inflammatory response with a documented infection. It may progress to more serious cases such as septic shock following the failure of one or more organs and the emergence of hemodynamic defects.

Assuming that the emergence of serious septic syndromes may be partially explained by the early loss of regulation of the inflammatory response, we decided to compare, in a transcriptomic perspective, the biological mechanisms expressed during an induced systemic inflammatory response with those expressed during severe septic syndromes.

By using open access transcriptomic databases, we first studied the kinetics of an induced inflammatory response. The use of functional analysis helped us identify discriminating biological mechanisms, such as the mTOR signaling pathway, between the pathological cases of sepsis and non-pathological (i.e., the artificially induced SIRS) cases.

Keywords: SIRS, sepsis, inflammation, functional analysis, transcriptome

1. Introduction

The term Sepsis refers to a complex clinical syndrome observed in patients who exhibit a systemic inflammatory response syndrome (SIRS) along with an infection [1]. It may progress to a severe sepsis if acute organ dysfunction occurs. A septic shock is the combination of a severe sepsis with an acute fall in blood pressure that does not respond to treatments.

Septic syndromes represent approximately 750,000 cases per year in the United States [2] and it remains the first cause of mortality in intensive care units (ICUs). Although in the last 10 years an improvement has been observed, commonly ascribed to the Surviving Sepsis Campaign [3], the mortality of severe septic syndromes remains high,

*Corresponding author
Email address: claudio.ms@universite-lyon.fr (Claudio Monteiro Sousa)

reaching in some settings 50% for septic shock [2, 4, 5]. The incidence of septic syndromes increased during the last decade [6, 7, 8, 9] , which implies a considerable burden for health-care systems. As recently evidenced by the National Center for Health Statistics, septic syndromes were, with an estimated annual cost of 1.8 billion dollars, the most expensive reason for hospitalization in the United States in 2011 [10].

Despite extensive research, no specific treatment exists for septic syndromes. One of the most recent cases of failure was AstraZeneca's AZD9773 [11], a polyclonal antibody against the major inflammatory mediator TNF-α, whose development was stopped in August 2012, while still in phase II. The withdrawal of activated protein C (Xigris) from the market, in October 2011, constitutes another example of failure in this field [12].

In light of the complexity of the underlying mechanisms and taking into account the high number of entities and mediators involved during a SIRS, we believe that a systems biology approach could be an alternative for analyzing the innate immune system responses during septic syndromes. Based on the assumption that most severe sepsis cases ultimately stem from the loss of natural control over the initial inflammatory response, we employed bioinformatics in order to pinpoint the mechanisms potentially involved in the loss of such control.

Several studies have been published in the last few years in which microarray-based techniques are used to obtain genome-wide transcription snapshots of the immune function in several clinical setups related to SIRS and sepsis [13]. Among those, the highly cited 2005 Calvano's study [14] continues to be considered seminal work, for it was the first to focus on the resolution of an artificially induced SIRS in healthy individuals. Also based on microarray experiments, Sutherland et al. [15] conducted a multi-centre and prospective clinical trial in order to establish a novel molecular biomarker diagnostic test for the early detection of sepsis.

To our knowledge, no transcriptomic comparative study exists between healthy individuals, in whom a SIRS is rapidly controlled, and septic patients, in whom such control has been lost. Based on previously published gene expression raw datasets, we compared the pathological to the non-pathological cases, through the analysis of the most relevant biochemical mechanisms involved.

2. Materials and methods

Datasets. The number of original articles based on microarray experiments published yearly passed from a couple of hundreds in the year 2000 to more than five thousand by the end of the decade. Notwithstanding the high degree of heterogeneity that characterizes microarray experiments, a systematic review of literature [13] and public gene expression repositories (e.g., gene expression omnibus) enabled us to find two relevant datasets in order to compare the pathological and the non-pathological systemic inflammatory responses.

We used the openly shared raw datasets from both Calvano's et al. [14] and Sutherlands's et al. [15] studies (data accessible at NCBI GEO database [16] with the references GSE3284 and GSE28750, respectively).

In the first study, the researchers analyzed the inflammatory response dynamically. Data from Calvano's et al. study originally comprises two subsets: the first one, obtained in a group of 8 healthy volunteers was used by the authors to conduct functional analyses; the second one, obtained in an independent group of 6 healthy volunteers was used for validation purposes. At a glance, the first subset, composed of 8 healthy individuals, 18-to-40 years old, was divided into two groups to receive either intravenous LPS (i.e. lipopolysaccharide) or placebo. Blood samples were collected at t=0 (i.e. just before the injection), and at t=2, 4, 6, 9 and 24 hours. Leukocytes were separated and a genome-wide transcriptomic analysis was conducted onto oligonucleotide arrays (Affymetrix Hu133A and Hu133B). The second subset was drawn from the experience conducted in 6 healthy individuals, also divided into two groups to recieve either intravenous LPS or placebo. Blood samples were taken at t=0 hours (i.e. just before the injection), then at t=2 hours and at t=6 hours. Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 chips were used to get a genome-wide transcriptomic picture of the biochemical processes induced by the LPS stimulus.

In Sutherland's study [15], the main objective was to identify biomarkers for the early detection of sepsis. For that, the authors conducted a prospective study in four intensive care units in Australia between 2007 and 2009. Data from this study comprises three subsets: a sepsis group (n=10), a post-surgery group (n=11) and finally a control group (n=20). The main inclusion criteria for the sepsis group were patients over 18 years, enrolled within 24 hours of admission, presenting clinical suspicion of sepsis as defined by the ACCP consensus/SCCM 1992 [1] and whose infection had been confirmed a posteriori. The second subset consists of patients recruited before a surgery and that had developed a systemic inflammatory response (not infectious) within the 24 hours following the intervention. The last subset consisted in adults from the medical staff of the hospital, without any concurrent illnesses at the time of blood collection nor any past history of immunological dysfunction. Blood tests were performed for the three subgroups, leukocytes were isolated and hybridization was then performed using Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0.

Microarray data pretreatment. Because we had to handle data sets produced by different research groups, we started from collected raw data sets and applied to them the same standardized pretreatment procedures. Raw data expression files were loaded and analyzed with R (v3.1.1) and Bioconductor [17]. The CEL files were imported into R environment. Before any differential expression analysis,

all raw datasets were preprocessed using both the affy library [18] and the liwong probe summary method [19].

Microarray data analysis. This part of the work was conducted in two stages. The first phase was based on the first subset of the database produced during Calvano's et al. study. We analyzed the kinetics of SIRS focusing on the times during which major changes in gene expression were observed. The aim was to confirm, as reported by Calvano et al. that the main immune regulatory processes occur between 0 and 2 hours and between 6 and 9 hours. We used the maSigPro algorithm developped by Conesa et al. [20] for the analysis of single and multi-series time course microarray data. An ascending hierarchical classification was then applied and completed with a principal component analysis (unsupervised method) in order to explore differential expression results, minimizing the dimensionality of the data while preserving most of the variation.

The second phase was based on the rest of subsets included in this study. The second subset from Calvano's et al. study was used in order to compare LPS-injected with placebo-injected healthy subjects gene expression values. Differential expression analysis was performed using LIMMA linear models with least squares regression and empirical Bayes moderated t-statistics [21, 22]. P-values were adjusted for multiple comparisons using the Benjamini-Hochberg false discovery rate correction (FDR). A corrected p-value of 0.001 was chosen as significance level. Since a list of genes is hardly exploitable as such, genes that were identified as significantly differentially expressed for each time point from the experimental data were exported onto Ingenuity Pathway Analysis software (IPA). This platform was selected for the high quality of Ingenuity's knowledge base and the efficient web-based functional analysis tool that was provided. Specificity of connections for each gene of interest was calculated, allowing us to determine the corresponding expressed canonical pathways. Pathways of higly interconnected genes were identified by statistical likelihood. The same modus operandi was scrupulously applied to the transcriptomic database extracted from Sutherland's et al. study. Ingenuity's software was then employed to compare canonical pathways differentially expressed between the pathological and the non-pathological systemic inflammatory responses.

3. Results and discussion

Kinetics of an induced systemic inflammatory response. We started by conducting an exploratory analysis of the kinetics of an induced SIRS based on the first subset of the database extracted from Calvano's et al. study.

For this, we realized a temporal analysis using the maSigPro Bioconductor library. With a p-value fixed at 0.001 and a threshold error rate FDR fixed at 0.001, a total of 4,601 probe sets were identified as differentially expressed for the 6 time points, compared with the 5,093 initially found in the study conducted by Calvano et al. [14]. Although the algorithms are very similar, in particular those used for normalization and standardization of raw data, there is a fluctuation that can be explained by the use of different software tools (Calvano and his colleagues used dChip).

As presented in Fig.1, the 4,601 probesets previously identified as differentially expressed were displayed as a heatmap graph in order to provide a trend of the kinetics of inflammatory response induced by endotoxin injection. Each line in the graph corresponds to the level of expression of a given probe set; each column represents the results of an array. A color gradient was applied and ranging from dark blue to yellow for under-expressed to over-expressed genes.

Firstly, if we focus on the control group, we do not distinguish any fluctuation in the gene expression patterns throughout the 24-hour interval. With regard to the LPS group, three distinct phases can be observed. At t=0h, that is to say, before the infusion of endotoxin, we can observe that the expression of genes is comparable to that of the 24-hour interval in the control group. Between t=2h and t=9h, we can observe a complete change of gene expression patterns. Finally, between t=9h and t=24 hours, the level of regulation of genes gets back into a quasi-steady state as observed at t=0h. This graph highlights two interesting phenomena which are a first and rather rapid activation of the immune system during an inflammatory reaction (before t=2 hours) and the regulation of such inflammatory reaction which takes place between t=2h and t=9h after the first contact with an antigen.

As confirmation, a principal components analysis was carried out and presented in Fig. 2. As previously observed, three groups appeared. The first group consists of all microarrays from the control group (represented by hollow dots). Also included in this first group are all microarrays corresponding to time t=0h and t=24h from the LPS group (solid dots, black and purple respectively). The second group consists in microarrays corresponding to time t=2h. Finally, the last group consists in gene expression data for times t=4h, t=6h and t=9h. This second analysis confirms the previous observations, but also demonstrates that at t=2h, expression of genes was significantly different from t=4h and t=9h.

In order to study more closely what happened between t=4h and t=9h in the LPS-infusion group, maSigPro library was used on the previous dataset to group genes according to their expression level (agglomerative hierarchical clustering based on Ward's method and using correlation distance). It allowed us to analyse the average level of expression of genes in clusters over time (Fig. 3). The graph shows the average gene expression by clusters as a function of time. First we can observe that the red curve (corresponding to control group) remains relatively stable over time, while the green curve (corresponding to the endotoxin infused group) undergoes significant fluctu-

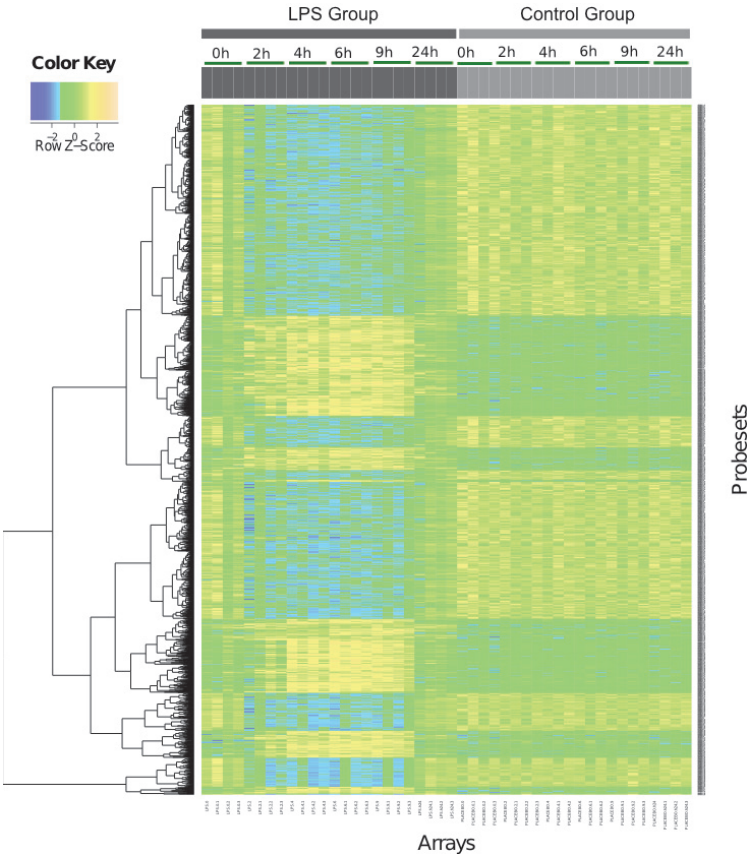


Figure 1: Heatmap graph and hierarchical clustering of significant probesets that were differentially expressed following endotoxin (or saline solution) infusion. The heatmap cell color ranges from blue, i.e. down-regulated, to yellow, i.e. up-regulated, according to the probeset expression level (normalized by Z-score). Columns represent arrays with time points indicated in hours before (0h) and after infusion (2h, 4h, 6h, 9h, 24h); rows represent probe sets.

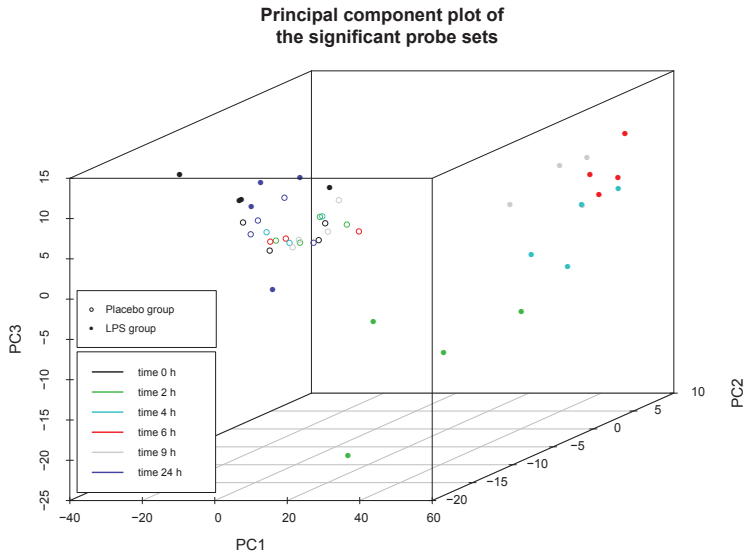


Figure 2: Principal component analysis of the kinetics of an inflammatory response induced by LPS infusion. Hollow dots represent expression data of control group, solid dots represent expression of LPS group. A different color is given for each time points, black: t=0h, green: t=2h, blue: t=4h, red: t=6h, gray: t=9h, purple: t=24h.

ations. Two phases can be distinguished as a function of these fluctuations. A first intense phase occurs between t=0h and t=2h, and then it goes slightly up until t=4h. A reverse phase then begins between 4-6 hours up to 24 hours.

Gene expression during an induced and controlled SIRS, an observed post-chirurgical SIRS and a diagnosed sepsis. The second part of this study is structured around the results obtained with the Limma package for the four observational conditions: SIRS 2 hours and 6 hours after the injection of lipopolysaccharide, spontaneous SIRS after a surgery and Sepsis. For the first conditions, at t=2h after endotoxin infusion, 3,099 probe sets were significantly identified, corresponding to 2,745 genes. For the second conditions, 6 hours after the endotoxin injection, 7,779 probe sets were identified corresponding to 6,666 genes. Finally, for the last conditions, 4,436 genes (5,302 probe sets) on the one hand and 5,033 genes (5,965 probe sets) on the other hand were identified as differentially expressed in the cases of post-surgical SIRS and septic SIRS respectively. By contrast with the previous part, this analysis was focused on the identification of genes differently expressed according to the context of an induced SIRS by administration of a low dose of LPS. Detailed results of microarray experiment analysis were presented in supplemental file Appendix S1.

Functional analysis and comparison between the pathologic and the non-pathologic cases. The purpose of this study was to identify any regulatory mechanisms of the inflammatory response behaving in a different way during a sepsis. We therefore carried out a functional analysis with the use of Ingenuity Pathway Analysis (IPA). The first two sets of Limma exported data are those concerning the expression of genes two hours and six hours after the injection of endotoxin.

As a first step, we were interested in transcription regulators. Those that were identified as playing a significant role (Fisher's exact test, p-value threshold 0.05), are referenced in Table 1.

As regards to the SIRS induced group, the regulators of transcription significantly expressed at two hours after LPS infusion were RELA, STAT3 and HMGB2 while those that were expressed at t=6 hours are SATB1, EP300 and FOXP3. RELA and STAT3 are two transcription regulators with a central role for an effective host defense without excessive inflammatory response [23] while HMGB2 plays a central role in nucleic acid-mediated TLR responses [24, 25]. At six hours following endotoxin injection, RELA gives way to STATB1 which is known to be involved in the regulation of the differentiation of naive T cells [26]. EP300 and FOXP3 are involved in the regulation of autoimmunity [27]. Regarding the post-chirurgical and sepsis groups, significantly expressed regulators of transcription

2 hours after LPS infusion		6 hours after LPS infusion		Post-chirurgical SIRS		Sepsis	
Transcription regulators	p-value	Transcription regulators	p-value	Transcription regulators	p-value	Transcription regulators	p-value
RELA	9,09e-4	SATB1	1,82e-2	SATB1	1,43e-3	SATB1	4,31e-4
STAT3	1,59e-3	EP300	2,54e-2	NFATC2	1,61e-2	FOXP3	1,72e-2
HMGB2	1,17e-2	FOXP3	3,09e-2	TCFL5	4,19e-2	TAL1	2,32e-2
				USF1	4,19e-2	NFATC2	3,70e-2
				EGR1	4,19e-2		

Table 1: Transcription regulators identified and classified with IPA according to their statistical significance at 2h and at 6h after endotoxin infusion, during a post-surgical SIRS and during a sepsis. P-values were adjusted using the Benjamini-Hochberg correction. A threshold value was set at 0.05.

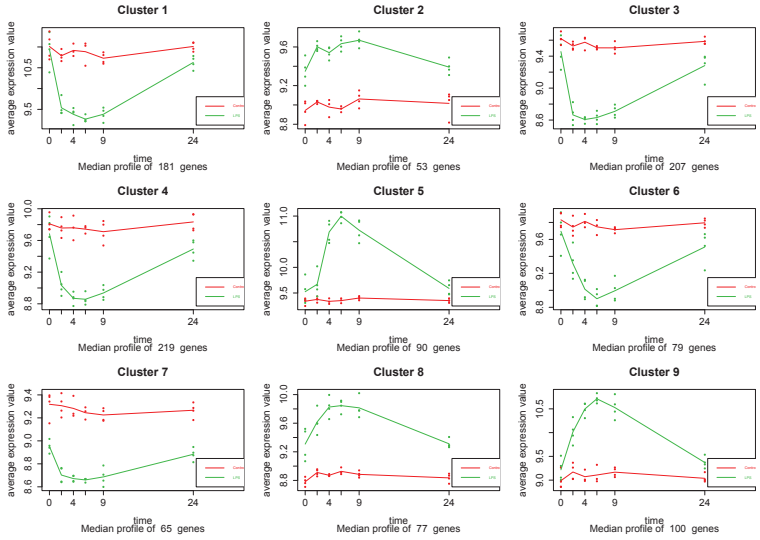


Figure 3: Representation of gene expression profiles by cluster for each experimental group (control group in red and SIRS group in green). Average gene expression profiles are presented according to time points: t=0h, t=2h, t=4h, t=6h, t=9h and t=24h. Cluster analysis was based on Ward's method (correlation distance) with a hierarchical classification.

are SATB1, NFATC2, TCFL5, USF1 and EGR1 on the one hand, and SATB1, FOXP3, TAL1, NFATC2 on the other hand. It should be noted that NFATC2 was significantly expressed in post-chirurgical and sepsis groups, which is a calcium-dependent transcription factor implicated in the activation of diverse cell types of immune system [28].

Using Ingenuity Pathway Analysis (IPA), we identified canonical pathways involved in the inflammatory response processes. We first analyzed gene expression tables during an induced and controlled SIRS and we identified 18 canonical pathways at t=2 hours after endotoxin infusion and 15 canonical pathways at t=6 hours (Table 2).

This process was repeated both for the post-chirurgical SIRS and the diagnosed sepsis gene expression tables. Thus, 19 canonical pathways have been identified for sepsis and 20 pathways for post-surgical SIRS cases (Table 3).

Among all the identified pathways, 9 are shared by all the conditions. Three of these are related to the regulation of apoptosis of immune cells during an inflammatory response (Calcium-induced T Lymphocyte Apoptosis, Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis, Nur77 signaling). The other six pathways (iCOS-iCOSL signaling, CD28 signaling, B Cell development, CTLA4 signaling, T Helper Cell differentiation, PCKθ signaling) are involved in the regulation of the activity and proliferation processes of immune cells. Focusing on the regulation of the inflammatory response and considering the differently expressed canonical pathways between non-pathologic and the pathologic cases, two canonical pathways drew our attention: the eIF4/p70S6K regulatory pathway and the mTOR signaling pathway. Despite the fact that they are presented separately, eIF4 and p70S6K are both downstream components of mTOR signaling pathway. Particularly studied over the last decade because of his involvement in the regulation of the immune response [29, 30, 31], mTOR signaling pathway was detected at t=6h after LPS infusion as well as the eIF4/p70S6K canonical pathway, that was also identified for post-chirurgical SIRS subjects. Although those pathways were not identified at t=2h after endotoxin stimulation and namely during a prevailing acute pro-inflammatory response, the regulatory role played by the mTOR signaling pathway during a systemic inflammatory response certainly commands further investigation.

4. Conclusion

Assuming that severe septic cases are partially caused by a loss of control in the inflammatory response, we decided to investigate and compare the physiologic mechanisms involved in the regulation of inflammation between pathological and non-pathological.

The dynamic analysis of an induced systemic inflammatory response led us to reach similar conclusions from what was established by Calvano et al. in their seminal work. From a transcriptomic point of view, the systemic inflammatory response goes through two stages, one is

2 hours after LPS infusion		6 hours after LPS infusion	
Canonical pathways	BH p-value	Canonical pathways	BH p-value
OX40 Signaling Pathway	5,01e-7	EIF2 Signaling	5,15e-32
Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target Cells	5,01e-7	Regulation of eIF4 and p70S6K	1,79e-9
Calcium-induced T Lymphocyte Apoptosis	7,62e-5	Calcium-induced T Lymphocyte Apoptosis	7,74e-7
Nur77 Signaling in T Lymphocytes	8,43e-5	mTOR Signaling	2,52e-6
CD28 Signaling in T Helper Cells	4,37e-4	iCOS-iCOSL Signaling in T Helper Cells	1,31e-5
PKCθ Signaling in T Lymphocytes	4,37e-4	CD28 Signaling in T Helper Cells	5,49e-4
iCOS-iCOSL Signaling in T Helper Cells	1,08e-3	Role of NFAT in Regulation of the Immune Response	7,85e-4
TREM1 Signaling	1,72e-3	CTLA4 Signaling in Cytotoxic T Lymphocytes	7,99e-4
CCR5 Signaling in Macrophages	3,90e-3	Nur77 Signaling in T Lymphocytes	1,13e-3
Cdc42 Signaling	4,44e-3	Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target Cells	2,07e-3
T Helper Cell Differentiation	4,73e-3	T Cell Receptor Signaling	2,09e-3
Tumoricidal Function of Hepatic Natural Killer Cells	5,17e-3	B Cell Development	2,85e-3
Dendritic Cell Maturation	6,94e-3	Phospholipase C Signaling	3,44e-3
IL-6 Signaling	8,79e-3	T Helper Cell Differentiation	6,52e-3
CTLA4 Signaling in Cytotoxic T Lymphocytes	8,79e-3	PKCθ Signaling in T Lymphocytes	8,92e-3
B Cell Development	8,79e-3		
iNOS Signaling	8,89e-3		
Natural Killer Cell Signaling	9,92e-3		

Table 2: Canonical pathways identified and classified with IPA according to their statistical significance 2h after endotoxin infusion (left) and 6h after endotoxin enfusion (right). P-values were adjusted using the Benjamini-Hochberg correction. A threshold value was set at 0.01.

Post-chirurgical SIRS		Sepsis	
Canonical pathways	BH p-value	Canonical pathways	BH p-value
EIF2 Signaling	7,84e-10	Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target Cells	3,26e-8
Calcium-induced T Lymphocyte Apoptosis	2,44e-8	Calcium-induced T Lymphocyte Apoptosis	3,26e-8
iCOS-iCOSL Signaling in T Helper Cells	5,01e-7	EIF2 Signaling	2,40e-7
Role of NFAT in Regulation of the Immune Response	3,49e-6	Role of NFAT in Regulation of the Immune Response	2,54e-7
OX40 Signaling Pathway	1,21e-5	OX40 Signaling Pathway	5,57e-7
Nur77 Signaling in T Lymphocytes	1,70e-5	Nur77 Signaling in T Lymphocytes	9,30e-7
Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target Cells	3,12e-5	iCOS-iCOSL Signaling in T Helper Cells	3,12e-6
CD28 Signaling in T Helper Cells	3,12e-5	T Helper Cell Differentiation	9,24e-6
B Cell Development	5,47e-5	Phospholipase C Signaling	1,29e-5
CTLA4 Signaling in Cytotoxic T Lymphocytes	7,22e-5	B Cell Development	2,01e-5
Communication between innate and Adaptative immune cells	7,39e-5	T Cell Receptor Signaling	9,03e-5
T Cell Receptor Signaling	8,96e-5	CTLA4 Signaling in Cytotoxic T Lymphocytes	1,33e-5
T Helper Cell Differentiation	1,71e-4	CD28 Signaling in T Helper Cells	1,61e-4
Hematopoiesis from Pluripotent Stem Cells	3,22e-4	Cdc42 Signaling	2,00e-3
CCR5 Signaling in Macrophages	6,89e-4	CCR5 Signaling in Macrophages	4,28e-4
iNOS Signaling	1,39e-3	PKCθ Signaling in T Lymphocytes	4,80e-4
Cdc42 Signaling	1,64e-3	Hematopoiesis from Pluripotent Stem Cells	1,30e-3
p38 MAPK Signaling	1,82e-3	p38 MAPK Signaling	4,50e-3
Regulation of eIF4 and p70S6K	3,55e-3	Antigen Presentation Pathway	4,58e-3
PKCθ Signaling in T Lymphocytes	4,50e-3		

Table 3: Canonical Pathways identified and classified with IPA according to their statistical significance during a post-surgical SIRS (left) and during sepsis (right). P-values were adjusted using the Benjamini-Hochberg correction. A threshold value was set at 0.01.

predominantly pro-inflammatory and occurs around two hours after endotoxin infusion and the other one is predominantly anti-inflammatory and occurs around six hours after the first contact with LPS.

Many mechanisms are common between the pathological and the non-pathological cases. There are nevertheless some differences in the processes involved in the regulation of the inflammatory response as it could be observed for the mTOR signaling pathway. The results obtained following the functional analysis are consistent with what has been recently observed in the field of inflammation and its regulation [32, 33, 34].

Although it cannot be established with certainty, owing to the limited number of patients included in Calvano's study and the disparate blood collection conditions between the two included transcriptomic databases, the detection of a different activity of the mTOR signaling pathway during the inflammation regulatory stages in non-pathological subjects in contrast to what was observed in the pathological cases could represent an interesting avenue to explore.

While encouraging, these results need to be confirmed by time series experiments including a significant number of ICU septic patients and in controlled blood collection conditions.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interests regarding this study.

Acknowledgments

The authors thank the reviewers for their valuable comments and suggestions. This study has been funded by Novadiscovery SAS.

References

[1] R. C. Bone, R. A. Balk, F. B. Cerra, R. P. Dellinger, A. M. Fein, W. A. Knaus, R. M. Schein, W. J. Sibbald, R. C. Bone, R. A. Balk, F. B. Cerra, R. P. Dellinger, A. M. Fein, W. A. Knaus, R. M. Schein, W. J. Sibbald, 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. 1992, Chest 136 (5 Suppl) (2009) e28.

[2] D. C. Angus, W. T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo, M. R. Pinsky, Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care, Crit. Care Med. 29 (7) (2001) 1303–1310.

[3] R. P. Dellinger, J. M. Carlet, H. Masur, H. Gerlach, T. Calandra, J. Cohen, J. Gea-Banacloche, D. Keh, J. C. Marshall, M. M. Parker, G. Ramsay, J. L. Zimmerman, J. L. Vincent, M. M. Levy, Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock, Crit. Care Med. 32 (3) (2004) 858–873.

[4] C. Brun-Buisson, P. Meshaka, P. Pinton, B. Vallet, EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units, Intensive Care Med 30 (4) (2004) 580–588.

[5] D. Annane, P. Aegerter, M. C. Jars-Guincestre, B. Guidet, Current epidemiology of septic shock: the CUB-Ra Network, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 168 (2) (2003) 165–172.

[6] G. S. Martin, D. M. Mannino, S. Eaton, M. Moss, The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000, N. Engl. J. Med. 348 (16) (2003) 1546–1554.

[7] D. F. Gaieski, J. M. Edwards, M. J. Kallan, B. G. Carr, Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States, Crit. Care Med. 41 (5) (2013) 1167–1174.

[8] T. J. Iwashyna, C. R. Cooke, H. Wunsch, J. M. Kahn, Population burden of long-term survivorship after severe sepsis in older Americans, J Am Geriatr Soc 60 (6) (2012) 1070–1077.

[9] S. B. Wilhelms, F. R. Huss, G. Granath, F. Sjoberg, Assessment of incidence of severe sepsis in Sweden using different ways of abstracting International Classification of Diseases codes: difficulties with methods and interpretation of results, Crit. Care Med. 38 (6) (2010) 1442–1449.

[10] C. Torio, R. Andrews, National inpatient hospital costs: The most expensive conditions by payer, 2011: Statistical brief 160, in: Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs, Agency for Health Care Policy and Research (US), Rockville (MD), 2006.

[11] G. R. Bernard, B. Francois, J. P. Mira, J. L. Vincent, R. P. Dellinger, J. A. Russell, S. P. Larosa, P. F. Laterre, M. M. Levy, W. Dankner, N. Schmitt, J. Lindemann, X. Wittebole, Evaluating the efficacy and safety of two doses of the polyclonal anti-tumor necrosis factor-α fragment antibody AZD9773 in adult patients with severe sepsis and/or septic shock: randomized, double-blind, placebo-controlled phase IIb study*, Crit. Care Med. 42 (3) (2014) 504–511.

[12] E. J. Giamarellos-Bourboulis, The failure of biologics in sepsis: where do we stand?, Int. J. Antimicrob. Agents 42 Suppl (2013) S45–47.

[13] B. M. Tang, S. J. Huang, A. S. McLean, Genome-wide transcription profiling of human sepsis: a systematic review, Crit Care 14 (6) (2010) R237.

[14] S. E. Calvano, W. Xiao, D. R. Richards, R. M. Felciano, H. V. Baker, R. J. Cho, R. O. Chen, B. H. Brownstein, J. P. Cobb, S. K. Tschoeke, C. Miller-Graziano, L. L. Moldawer, M. N. Mindrinos, R. W. Davis, R. G. Tompkins, S. F. Lowry, A network-based analysis of systemic inflammation in humans, Nature 437 (7061) (2005) 1032–1037.

[15] A. Sutherland, M. Thomas, R. A. Brandon, R. B. Brandon, J. Lipman, B. Tang, A. McLean, R. Pascoe, G. Price, T. Nguyen, G. Stone, D. Venter, Development and validation of a novel molecular biomarker diagnostic test for the early detection of sepsis, Crit Care 15 (3) (2011) R149.

[16] R. Edgar, M. Domrachev, A. E. Lash, Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository, Nucleic Acids Res. 30 (1) (2002) 207–210.

[17] R. C. Gentleman, V. J. Carey, D. M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A. J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney, J. Y. Yang, J. Zhang, Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics, Genome Biol. 5 (10) (2004) R80.

[18] L. Gautier, L. Cope, B. M. Bolstad, R. A. Irizarry, affy–analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level, Bioinformatics 20 (3) (2004) 307–315.

[19] K. Shakya, H. J. Ruskin, G. Kerr, M. Crane, J. Becker, Comparison of microarray preprocessing methods, Adv. Exp. Med. Biol. 680 (2010) 139–147.

[20] A. Conesa, M. J. Nueda, A. Ferrer, M. Talon, maSigPro: a method to identify significantly differential expression profiles in time-course microarray experiments, Bioinformatics 22 (9) (2006) 1096–1102.

[21] G. K. Smyth, Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments, Stat Appl Genet Mol Biol 3 (2004) Article3.

[22] G. Smyth, limma: Linear Models for Microarray Data, Statis-

tics for Biology and Health, Springer New York, 2005.
[23] L. J. Quinton, J. P. Mizgerd, NF-κB and STAT3 signaling hubs for lung innate immunity, Cell Tissue Res. 343 (1) (2011) 153–165.
[24] H. Yanai, T. Ban, T. Taniguchi, Essential role of high-mobility group box proteins in nucleic acid-mediated innate immune responses, J. Intern. Med. 270 (4) (2011) 301–308.
[25] Y. Rao, J. Su, C. Yang, L. Peng, X. Feng, Q. Li, Characterizations of two grass carp Ctenopharyngodon idella HMGB2 genes and potential roles in innate immunity, Dev. Comp. Immunol. 41 (2) (2013) 164–177.
[26] H. Ahlfors, A. Limaye, L. L. Elo, S. Tuomela, M. Burute, K. V. Gottimukkala, D. Notani, O. Rasool, S. Galande, R. Lahesmaa, SATB1 dictates expression of multiple genes including IL-5 involved in human T helper cell differentiation, Blood 116 (9) (2010) 1443–1453.
[27] Y. Liu, L. Wang, J. Predina, R. Han, U. H. Beier, L. C. Wang, V. Kapoor, T. R. Bhatti, T. Akimova, S. Singhal, P. K. Brindle, P. A. Cole, S. M. Albelda, W. W. Hancock, Inhibition of p300 impairs Foxp3$^+$ T regulatory cell function and promotes antitumor immunity, Nat. Med. 19 (9) (2013) 1173–1177.
[28] F. Macian, NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function, Nat. Rev. Immunol. 5 (6) (2005) 472–484.
[29] T. Weichhart, G. Costantino, M. Poglitsch, M. Rosner, M. Zeyda, K. M. Stuhlmeier, T. Kolbe, T. M. Stulnig, W. H. Horl, M. Hengstschlager, M. Muller, M. D. Saemann, The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response, Immunity 29 (4) (2008) 565–577.
[30] A. W. Thomson, H. R. Turnquist, G. Raimondi, Immunoregulatory functions of mTOR inhibition, Nat. Rev. Immunol. 9 (5) (2009) 324–337.
[31] J. D. Powell, K. N. Pollizzi, E. B. Heikamp, M. R. Horton, Regulation of immune responses by mTOR, Annu. Rev. Immunol. 30 (2012) 39–68.
[32] R. Cortes-Vieyra, A. Bravo-Patino, J. J. Valdez-Alarcon, M. C. Juarez, B. B. Finlay, V. M. Baizabal-Aguirre, Role of glycogen synthase kinase-3 beta in the inflammatory response caused by bacterial pathogens, J Inflamm (Lond) 9 (1) (2012) 23.
[33] S. P. Cobbold, The mTOR pathway and integrating immune regulation, Immunology 140 (4) (2013) 391–398.
[34] K. Katholnig, M. Linke, H. Pham, M. Hengstschlager, T. Weichhart, Immune responses of macrophages and dendritic cells regulated by mTOR signalling, Biochem. Soc. Trans. 41 (4) (2013) 927–933.

2.4 Conclusion

Dans cette étude, nous sommes partis de l'hypothèse que les états septiques graves découlaient d'une perte de contrôle précoce dans la régulation de la réponse inflammatoire. Nous avons ainsi décidé de comparer transcriptomiquement les mécanismes mis en jeu lors d'une réaction inflammatoire systémique contrôlée à ceux observés lors d'un sepsis. Pour cela, nous avons appliqué des méthodes de traitement et d'analyse de données identiques sur deux bases de données issues de deux études différentes, mais avec un protocole de collecte des données le plus proche possible.

La première partie de cette étude a consisté en l'analyse de la dynamique de la résolution d'une réponse inflammatoire systémique induite chez de sujets sains. Les résultats obtenus, concordants avec ceux obtenus par Calvano *et al.* [46] en 2005, permettent d'observer deux phases très distinctes d'un point de vue transcriptomique. Tout d'abord un première phase, très majoritairement pro-inflammatoire, apparaît 2 heures après l'injection d'endotoxine. S'en suit une seconde phase, cette fois ci majoritairement anti-inflammatoire, qui dure jusqu'à la résolution de cet épisode inflammatoire.

En nous servant ensuite des bases de données issues des études de Calvano *et al.* [46] et de Sutherland *et al.* [51], nous avons utilisé la librairie *Limma* du logiciel pour identifier les gènes différemment exprimés chez des patients sains où un SIRS a été induit, et chez des patients souffrant de syndromes septiques. À l'aide du web-logiciel IPA, nous avons réalisé une analyse fonctionnelle de ces gènes, ce qui nous a permis d'identifier la voie de signalisation mTOR comme potentiellement impliquée dans la perte de contrôle dans la réaction inflammatoire observée dans un cas de sepsis.

Ces résultats sont néanmoins à prendre avec précaution compte tenu du faible nombre de patients inclus, en particulier dans l'étude menée par l'équipe de Calvano. De plus, et bien que la base de données de IPA soit très importante, celle-ci ne dispose pas d'informations illimitées sur tous les mécanismes biologiques. À défaut d'être utilisés tels quels, ces résultats pourraient néanmoins être confirmés par une étude temporelle complémentaire de grande envergure menée en services de réanimation sur des patients atteints de sepsis. Une telle étude fournirait des informations précises sur la cinétique des mécanismes mis en jeu lors d'un sepsis.

CHAPITRE 3

PARTIE II : ÉTAT DE L'ART DE LA VOIE TLR4

L'identification de l'état du *pathway* mTOR comme discriminant entre les cas pathologiques de syndromes septiques et les cas non pathologiques nous a conduit à explorer son rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire. Nous avons dans un premier temps procédé à une revue de la littérature concernant la voie intracellulaire TLR4 et sa régulation par le complexe mTOR. L'objectif principal de cette revue étant le recueil des connaissances nécessaires aux étapes ultérieures de modélisation de ces deux voies.

Le focus a été fait sur la voie TLR4 en raison de son implication dans la reconnaissance de motifs moléculaires tels que les lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif. Il s'agit des mêmes motifs injectés à des sujets sains par Calvano *et al.* [46] pour induire une réponse inflammatoire systémique. De plus, les bactéries à Gram négatif sont à elles seules à l'origine de plus d'un tiers des syndromes septiques [17].

Cette revue de la littérature prend la forme d'un modèle de connaissances, qui se défini comme l'association d'un modèle discursif et du modèle graphique complémentaire. Le modèle discursif est la description textuelle de la voie de signalisation, des entités qui la composent, ansi que les relations faisant le lien entre ces entités. Le modèle graphique est l'ensemble des graphes qui permettent d'expliciter les relations causales et/ou temporelles entre les différentes entités de la voie de signalisation. Les graphes de cette partie ont été réalisés avec l'aide d'une ontologie graphique qui a été créée dans le cadre de ce travail de thèse (annexe A) et du logiciel yED [1] (v. 3.15.0.2).

1. https://www.yworks.com/

3.1 Introduction

L'activation des TLRs est suivie par l'initiation de plusieurs cascades de transduction du signal, conduisant à l'expression des gènes impliqués dans les réponses immunitaires innées et à la libération de nombreux médiateurs chimiques de la réponse inflammatoire [62].

Une fois activés, les récepteurs de type TLR recrutent des combinaisons différentes de protéines intracellulaires en fonction du ligand fixé. On dénombre aujourd'hui quatre molécules adaptatrices pour les récepteurs TLR : MyD88 (pour *Myeloid differenciation primary response gene 88*), TIRAP (pour *TIR-associated protein*), TRIF (pour *TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN-β*) et TRAM (pour *TRIF related adaptor molecule*).

Le recrutement spécifique de certaines de ces molécules adaptatrices offre aux cellules immunitaires la possibilité d'adapter leur réponse face à un pathogène rencontré [63]. La liaison d'endotoxines au récepteur TLR4 provoque son homodimérisation et active les domaines intracytosolosiques des deux chaînes du récepteur qui recrutent des protéines intracellulaires, ce qui conduit à une réponse inflammatoire [64, 65].

Comme on peut le voir dans la figure 3.1, l'induction d'une réponse au LPS se fait via l'action combinée de trois protéines : la *LPS-binding protein* (LBP), le *cluster of differenciation* 14 (CD14) et la *myeloid differentiation protein* 2 (MD2) [66].

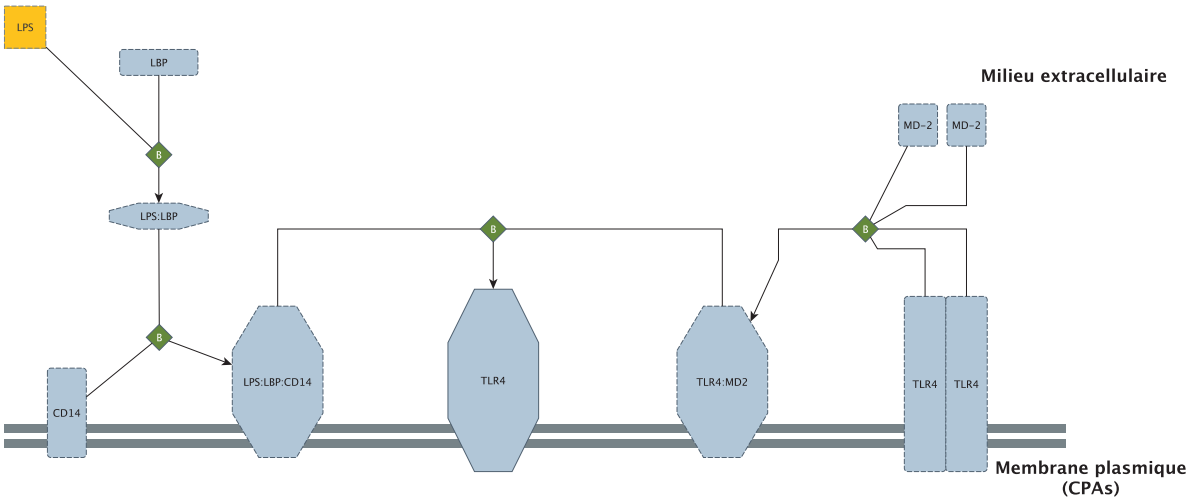


Figure 3.1 – Activation du récepteur TLR4 par du LPS. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1.

Dans un premier temps, LBP va interagir avec les membranes bactériennes (composées d'éléments riches en endotoxines) et entraîner l'extraction puis le transfert de monomères vers CD14. CD14 transfère ensuite les monomères de LPS vers l'hétérodimère MD2 :TLR4 [67, 68]. L'action conjuguant le transfert de LPS de CD14 vers MD2

et l'association de MD2 au récepteur TLR4 est requise pour activer le récepteur TLR4 et la transduction du signal correspondante [69].

La voie de signalisation TLR4 est historiquement divisée en deux sous-voies en fonction du recrutement au niveau du récepteur membranaire de la protéine intracellulaire MyD88 (pour *myeloid differentiation primary response gene 88*) [70]. Lorsque la protéine adaptatrice MyD88 est recrutée, on parle de l'activation de la voie MyD88 dépendante. Autrement, il s'agit de la voie MyD88 indépendante.

L'activation de la voie MyD88 dépendante est suivie d'une augmentation rapide des niveaux intracellulaires du facteur de transcription NF-κB dans sa forme activée, de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNFα (pour *tumor necrosis factor* α) ou l'IL-1β (pour *interleukin* 1β) ainsi que des chimiokines comme la MCP-1 (pour *monocyte chemoattractant protein 1*) ou IL-8 [71, 72].

L'activation de la voie MyD88 indépendante conduit à une augmentation rapide de la teneur des cellules en IRF3 (pour *interferon regulatory factor 3*), un facteur de transcription responsable de la production par les cellules du système immunitaire d'interférons de type I tels que l'IFN-β (pour *interferon* β).

3.2 Voie Myd88-indépendante

Comme présenté dans la figure 3.2, la voie de signalisation MyD88-indépendante, connue également sous le nom de TRIF-dépendante (pour *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-*β), nécessite l'action conjointe des deux protéines adaptatrices TRIF et TRAM (pour *translocating chain-associated membrane protein*) pour induire notamment la production d'interférons de type I [73].

Grâce à son domaine TIR (pour *Toll/interleukin-1 receptor*) et suite à l'internalisation du récepteur TLR4 via l'action de CD14, TRAM joue un rôle d'entremetteur entre le récepteur TLR4 activé et l'adaptateur TRIF [74, 75]. La fixation de TRIF signe le départ de la réponse MyD88-indépendante.

Ces deux adaptateurs vont favoriser le recrutement de TRAF3 (pour *TNF Receptor-Associated Factor* 3) au niveau du complexe de signalisation de l'endosome. TRAF3 va ensuite assembler, via son domaine E3 ligase, des chaînes de polyubiquitines en K63 afin de former une plateforme nécessaire au recrutement des kinases de type IKK (pour *I*κ*B kinase*)[76, 77].

Ceci va promouvoir les activations successives de TBK1 (pour *TANK-binding kinase 1*) et de IκB kinase-ϵ (IKKϵ) [78], qui vont induire la phosphorylation et la dimérisation de IRF3 (pour *interferon regulatory factor 3*) et de IRF7 [79]. Une fois phosphorylés, ces deux facteurs de transcription vont pouvoir migrer jusqu'au noyau pour se fixer sur l'ISRE (pour *interferon sensitive response element*) et induire la transcription d'un nombre important de gènes, dont ceux codant pour l'IFN-α et de l'IFN-β (figure 3.3).

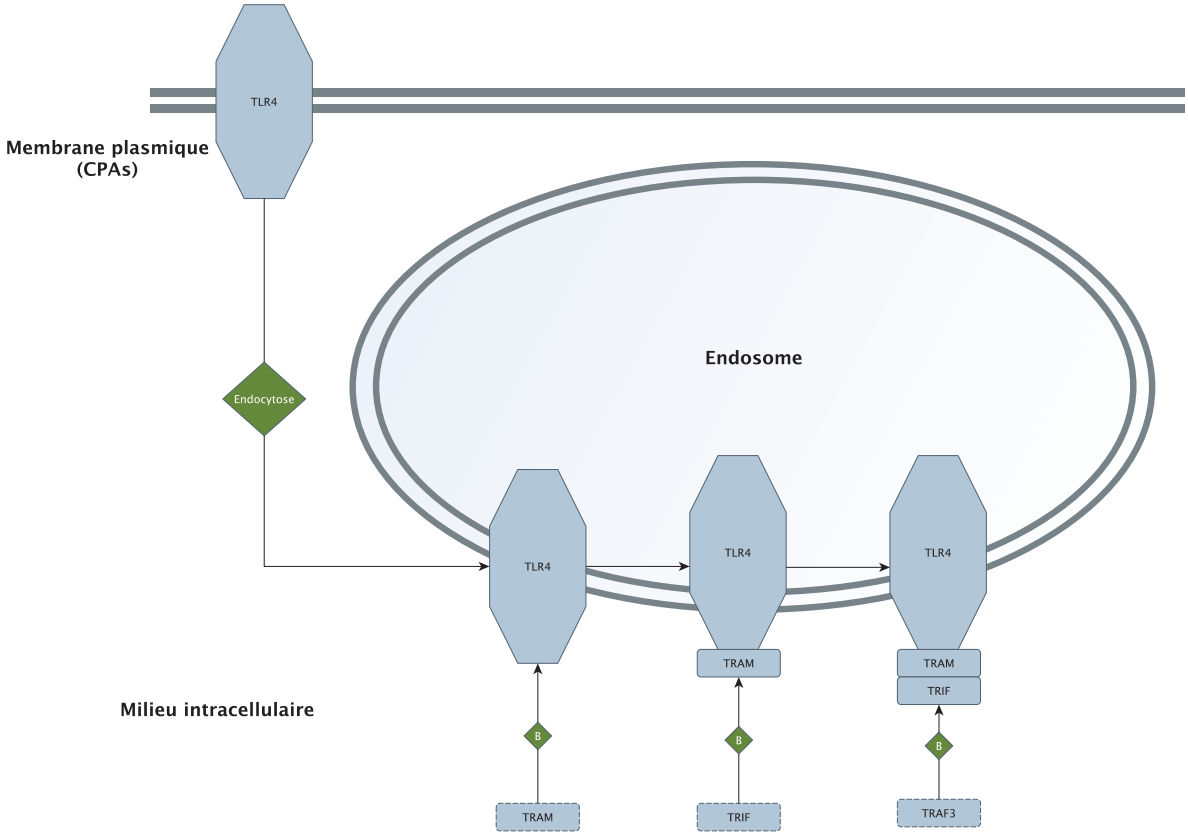


Figure 3.2 – Activation de la voie de signalisation MyD88-indépendante suite à l'endocytose du récepteur TLR4. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1.

3.2.1 Interférons (IFN) de type I

Une fois sécrétés par les cellules compétentes, les interférons de type I agissent comme la plupart des cytokines ; de façon autocrine (lorsqu'un messager chimique agit, à travers des récepteurs de la membrane cellulaire, sur la cellule même qui l'a synthétisé) et paracrine (production de messagers chimiques qui agissent dans le voisinage de la cellule qui les a synthétisés) [80]. Dans les deux cas, les interférons de type I vont se fixer sur les récepteurs interféron de type I, induisant leur activation et la transduction du signal intracellulaire correspondant.

Le récepteur IFN de type I se compose de deux sous-unités : IFNAR1 et IFNAR2 (Figure 3.4) [81]. Chacune de ces sous-unités interagit avec un membre de la famille des JAK (pour *Janus Activated Kinase*). Les sous-unités IFNAR1 et IFNAR2 sont constitutivement associées avec TYK2 (pour *Tyrosine Kinase*-2) et JAK1, respectivement [82].

La fixation d'un interféron de type I sur son récepteur conduit à une rapide autophosphorylation et activation des protéines JAKs. À leur tour, les protéines activées TYK2 et JAK1 provoquent l'activation par phosphorylation des protéines STATs (pour

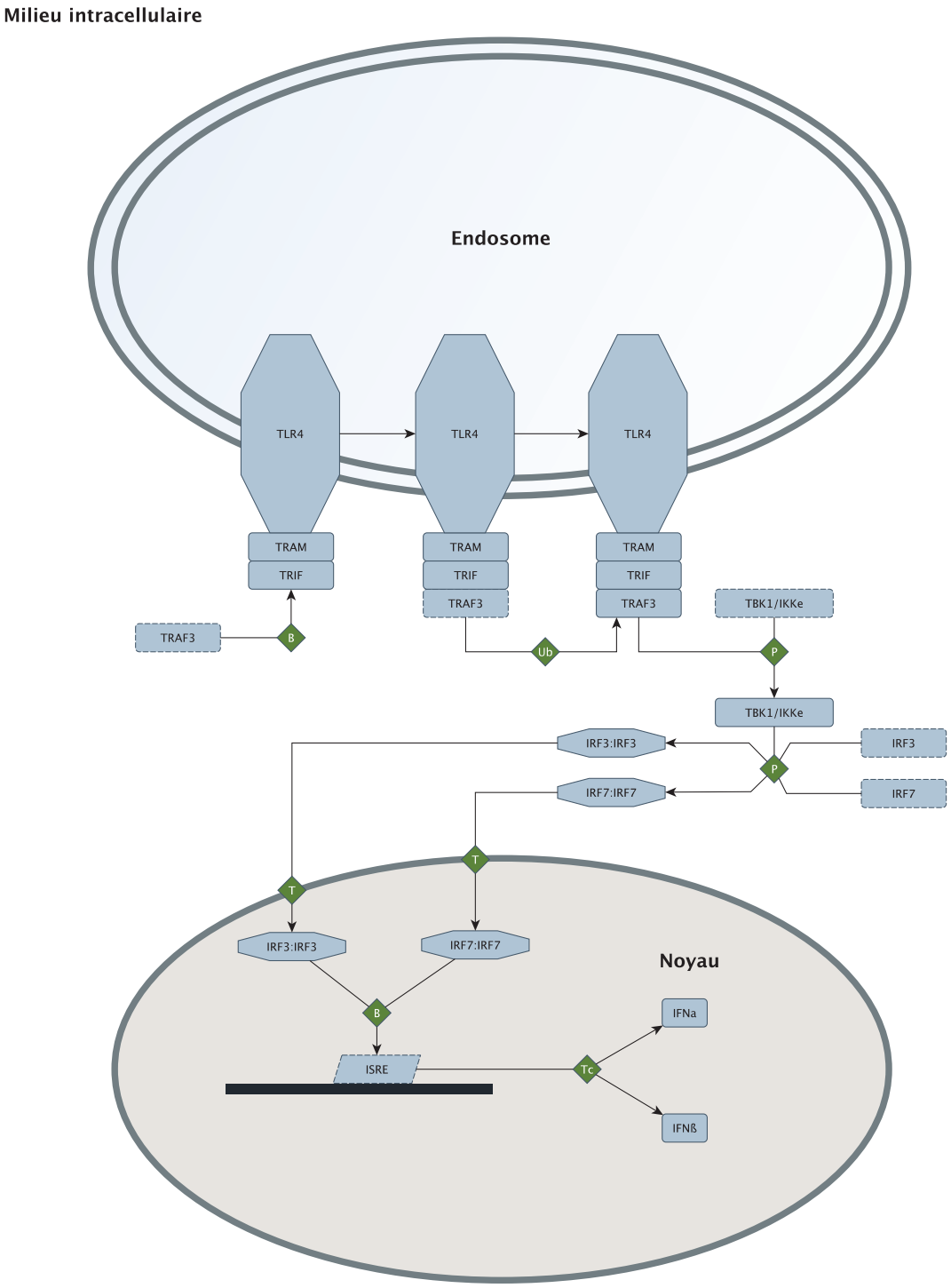


Figure 3.3 – Suite de la transduction du signal de la voie de signalisation MyD88-independante. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1.

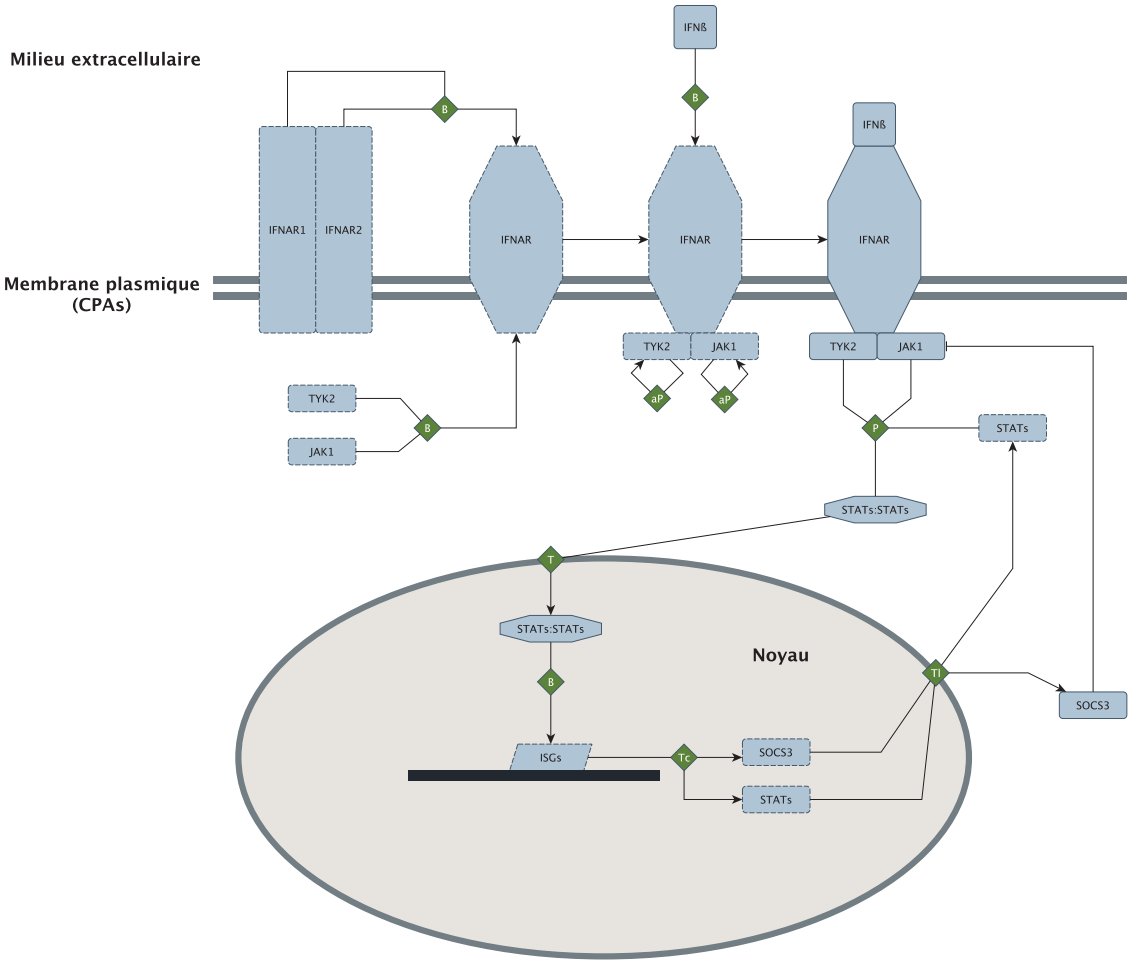


Figure 3.4 – Voie paracrine de l'interféron IFN-β. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1.

signal transducers and activators of transcription). Cette phosphorylation des STATs entraîne leur dimérisation et leur entrée dans le noyau où elles vont jouer un rôle de facteur de transcription sur des sites promoteurs des ISGs (pour *IFN-stimulated genes*). Cela induit la production d'autres protéines STATs ainsi que des protéines SOCS (pour *suppressor of cytokine signaling proteins*) [83–85].

3.3 Voie Myd88-dépendante

Comme énoncé précédemment, la voie TLR4 est communément divisée en deux parties distinctes, en fonction de la molécule adaptatrice recrutée au niveau du récepteur. Nous allons traiter dans ce paragraphe de la transduction du signal faisant suite à la fixation de MyD88 sur le récepteur TLR4 activé.

Comme on peut le voir dans la figure 3.5, la molécule adaptatrice TIRAP est essen-

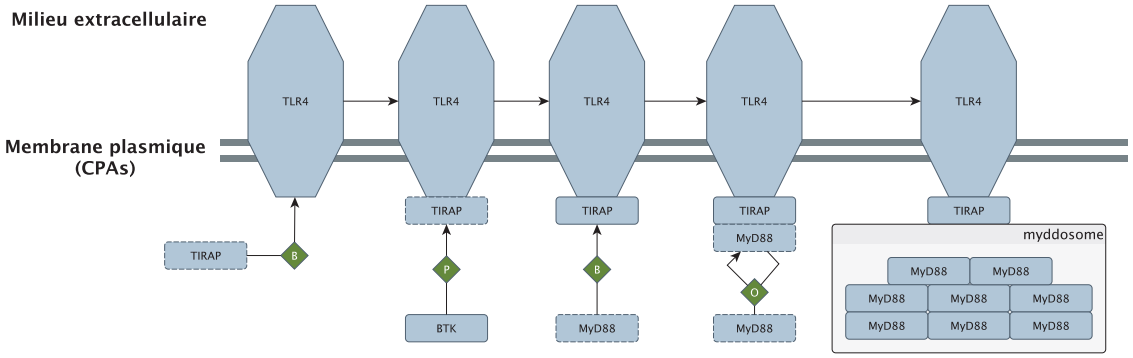


Figure 3.5 – Initiation de la voie MyD88-dépendante suite à l'activation du récepteur TLR4. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1.

tielle dans l'activation de la voie MyD88 dépendante. Les domaines intracellulaires TIR du récepteur TLR4 s'associent avec TIRAP du côté cytoplasmique de la membrane plasmatique, conduisant à sa phosphorylation par BTK (pour *Bruton's tyrosine kinase*) [86, 87].

BTK est une tyrosine kinase capable de s'associer avec le domaine TIR de TLR4. Cela lui permet d'interagir avec certaines des molécules impliquées dans la transduction du signal des voies TLRs, incluant MyD88 et TIRAP [88, 89, 89].

La phosphorylation de TIRAP via BTK favorise la fixation de MyD88 au niveau du récepteur, provoquant la formation d'un myddosome (plate-forme oligomérique favorisant la transduction du signal). La création de cette plate-forme permet le recrutement et l'activation par autophosphorylation de IRAK4 (pour *interleukin-1 receptor-associated kinase* 4, figure 3.6) [90–92].

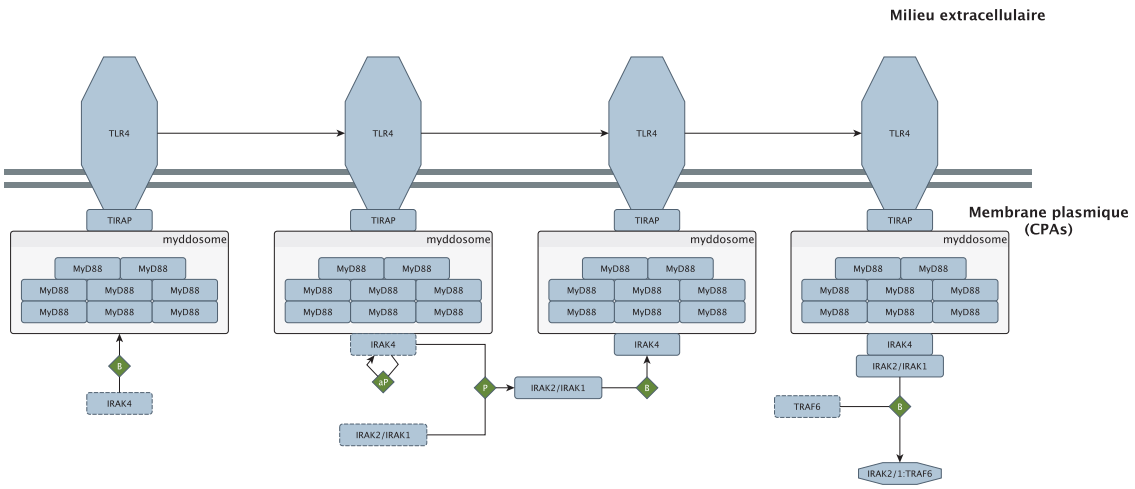


Figure 3.6 – Activation de TRAF6 via la voie MyD88-dépendante. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1.

Il est important de noter que IRAK4 possède un domaine DD (pour *death domain*) en N-terminal qui lui permet d'interagir avec MyD88 d'une part, et de s'associer avec d'autres molécules de la famille IRAK telles que IRAK1 et IRAK2 d'autre part [91, 93].

IRAK1 et IRAK2 sont ainsi recrutées au niveau du complexe du récepteur TLR4 [91] et phosphorylés par IRAK4 [94].

Une fois phosphorylées, IRAK1 et IRAK2 permettent la fixation de TRAF6 (pour *TNF receptor associated factor 6*) [95]. Cela va entraîner une dissociation du complexe nouvellement formé de celui du récepteur (figure 3.6) [96, 97].

TRAF6 possède une activité ubiquitine ligase E3 permettant son auto-ubiquitination [98]. TRAF6 va ensuite activer le complexe TAK1 (pour *transforming growth factor beta-activated kinase 1*) [99] en s'associant avec les sous-unités TAB2 et TAB3 (pour *TAK1-binding proteins*, figure 3.7) [100–102].

Une fois activé, le complexe TAK1 joue un rôle central dans l'activation et la libération des facteurs de transcription AP-1 (pour *Activator Protein-1*) et NFκB. Ce complexe permet l'activation des p38 MAPK (pour *p38 Mitogen-Activated Protein Kinase*) et des JNKs (pour *c-Jun Kinases*) d'une part, et l'activation du complexe IKK d'autre part [103].

L'activation des JNKs et des p38 MAPK par TAK1 va conduire à la libération du facteur c-Jun. TAK1 va dans un premier temps permettre la phosphorylation de MKK4 (pour *MAPK kinase 4*) et de MKK7 (pour *MAPK kinase 7*) [104, 105]. Une fois activés, les JNKs vont à leur tour phosphoryler un nombre important de substrats, incluant c-Jun [106] qui va pouvoir migrer jusqu'au noyau et former, en se fixant à c-Fos, le facteur de transcription AP-1.

Comme pour les JNKs, TAK1 va permettre l'activation des p38 MAPK entraînant la phosphorylation de MKK3 (pour *MAPK kinase 3*) et de MKK6 (pour *MAPK kinase 6*). Les p38 MAPK vont ensuite induire la phosphorylation et la libération de c-Jun [106].

TAK1 est également impliqué dans l'activation et la libération du facteur de transcription NFκB via l'activation du complexe IKK [101, 107].

Chez l'homme, le complexe IKK est connu comme le régulateur majeur de l'activation de NFκB. Il est composé de trois sous-unités qui sont NEMO (également appelée IKKγ), IKKα and IKKβ [108, 109]. La phosphorylation par TAK1 de IKKβ enclenche l'activité kinase du complexe IKK, qui va phosphoryler IκBα et conduire à la libération du facteur de transcription NFκB [108, 109]. IκBα peut être considérée comme une protéine inhibitrice qui séquestre NFκB dans le cytoplasme sous une forme inactive.

NFκB représente en réalité un groupe de facteurs de transcription jouant un rôle central dans les réponses immunitaires et inflammatoires. On dénombre aujourd'hui cinq membres dans la famille des NFκB : p65 (également appelé RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (également appelé NF-κB1) et p52/p100 (portant aussi le nom de NF-κB2).

Une fois phosphorylée, IκBα est dégradée dans le lysosome pendant que le facteur de transcription NFκB, libéré, migre jusqu'au noyau où, en association avec d'autres facteurs de transcription comme AP-1, va induire la transcription et la traduction de

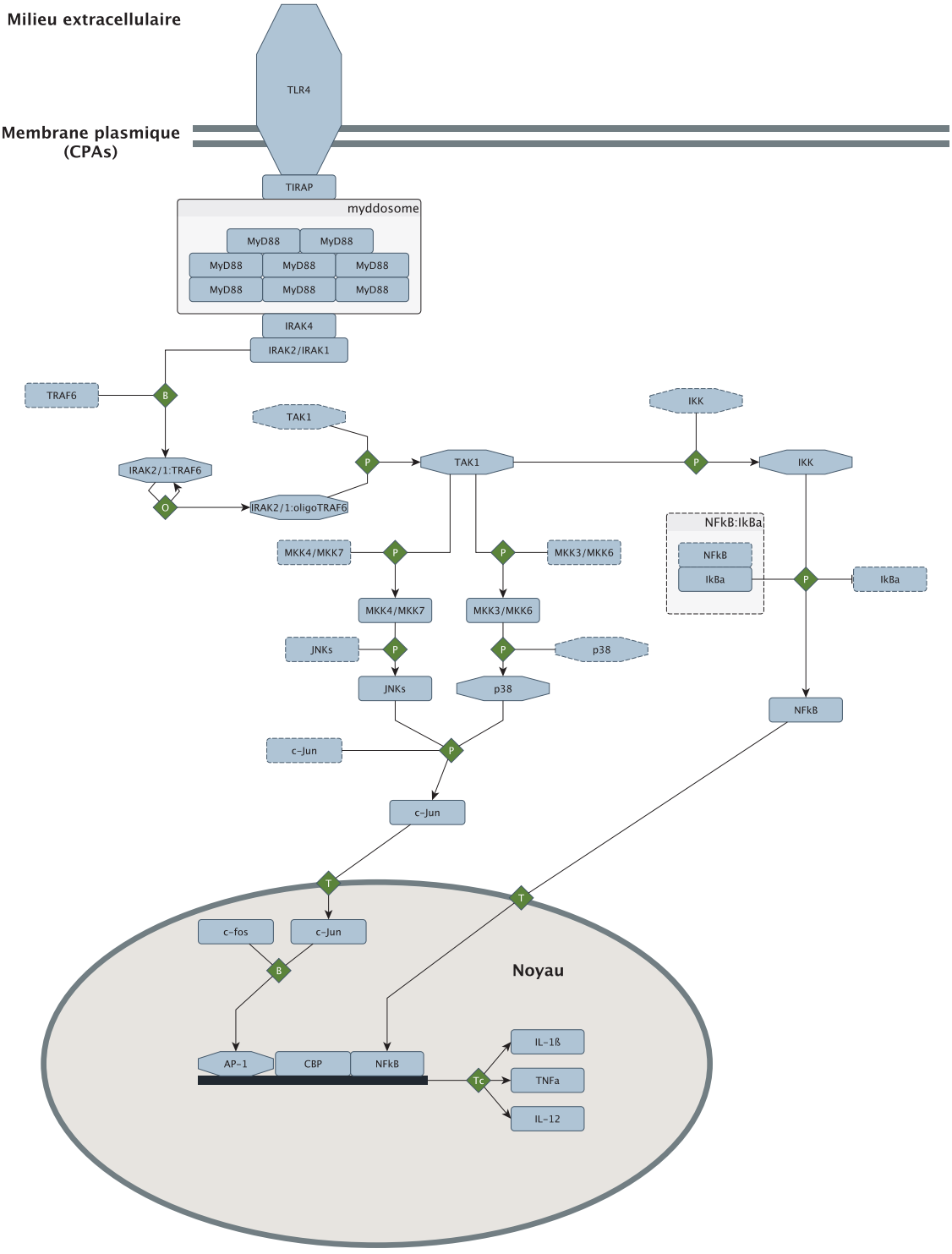


Figure 3.7 – Suite de la transduction du signal de la voie MyD88-dépendante. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1.

cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα et l'IL-1β.

3.3.1 IL-1β

L'interleukine 1β est l'une des cytokines pro-inflammatoires les plus étudiées et les mieux connues. Elle est sécrétée par des macrophages, les cellules endothéliales, les lymphocytes et les fibroblastes. IL-1β participe à l'activation d'un spectre large de réponses immunitaires et inflammatoires [110]. L'IL-1β est produite sous la forme d'un précurseur inactif (pro-IL-1β) avant d'être clivée par ICE (pour *IL-1Beta converting enzyme*).

Une fois sécrétée par les cellules, la cytokine Il-1β peut induire une réponse cellulaire de façon autocrine et/ou paracrine via le recepteur IL-1R1 (figure 3.8). La fixation de la cytokine sur son récepteur est suivie par l'activation du facteur de transcription NFκB via la voie MyD88-dépendante [111].

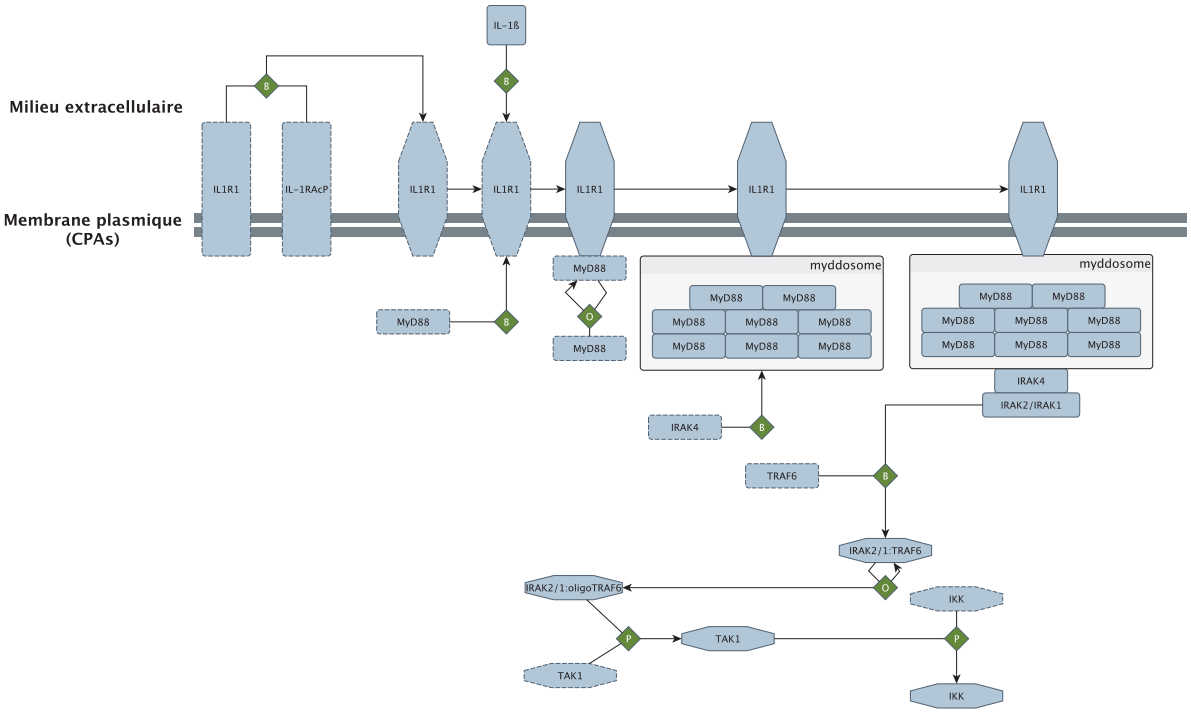


Figure 3.8 – Voie paracrine de IL-1β. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1.

3.3.2 TNFα

TNFα fait également partie des principales cytokines pro-inflammatoires. Cette cytokine agit aussi de façon autocrine et paracrine en se fixant au domaine extracellulaire du récepteur TNFR1 [112].

La fixation de la cytokine TNFα provoque la libération de la protéine inhibitrice SODD (pour *silencer of death domains*) qui va permettre l'activation du récepteur TNFR1 et l'oligomérisation de son domaine intracellulaire [111].

Une fois oligomérisé, le domaine intracellulaire de TNFR1 va pouvoir accueillir la protéine adaptatrice TRADD (pour *TNF receptor-associated death domain*) [113], suivie par TRAF2 (pour *TNFR-associated factor 2*) puis RIP-1 (pour *receptor interacting protein-1*). RIP-1 va ensuite permettre de recruter et d'activer TAK1, qui va initier la voie IKK jusqu'au facteur de transcription NFκB, et la transcription d'autres cytokines pro-inflammatoires (figure 3.9).

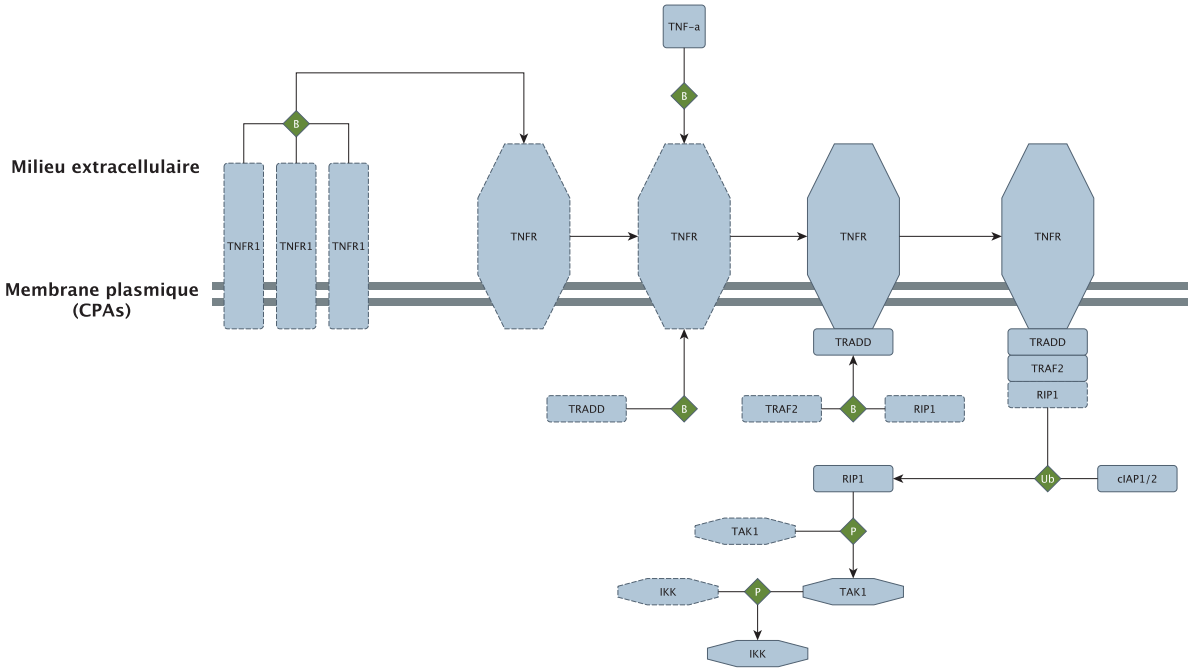


Figure 3.9 – Voie paracrine de TNFα. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1.

3.4 Voie PI3K-AKT-mTOR

Le système immunitaire inné joue un rôle essentiel dans la reconnaissance et la réponse à une présence étrangère microbienne, notamment via le récepteur TLR4 en ce qui concerne les bactéries à Gram négatif. Comme vu précédemment, la voie TLR4 a longtemps été définie comme l'association des voies MyD88-dépendantes et MyD88-indépendantes [65].

Ces dernières années, les recherches menées sur la voie de signalisation TLR4 ont permis de déterminer que l'activation de ce récepteur conduit également à l'activation de la voie PI3K (pour *phosphoinositide 3-kinase*) [114], connue pour son implication

dans de nombreux aspects de la réponse cellulaire, dont la régulation de la réponse pro-inflammatoire [115–124].

Conformément à ces précédentes études, Troutman *et al.* ont identifié BCAP (pour B-cell adaptor for PI3K, portant également le nom de PIK3AP1) comme une potentielle nouvelle protéine adaptatrice pour les récepteurs TLRs [125]. Le rôle joué par BCAP en tant que protéine adaptatrice est présenté dans la figure 3.10.

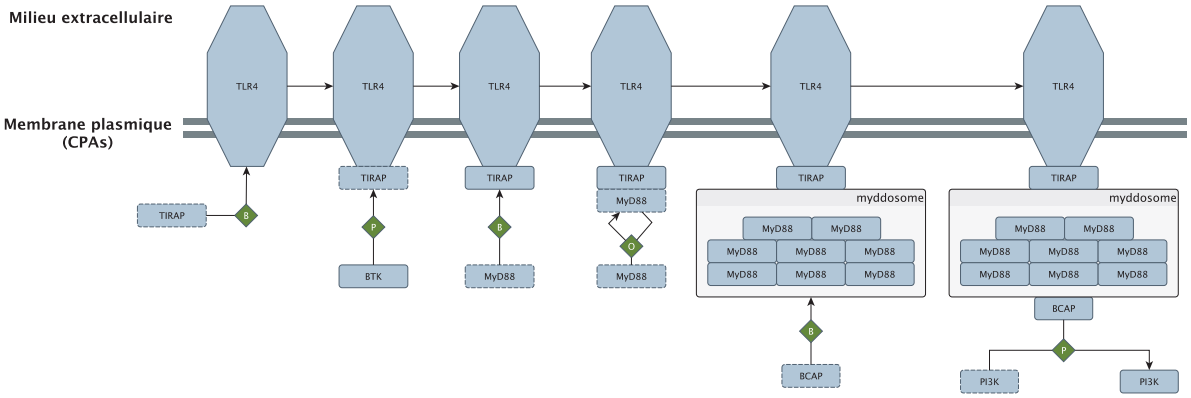


Figure 3.10 – Initiation de la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR suite à l'activation du récepteur TLR4. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1.

Suite à l'activation du récepteur TLR4, son domaine intracellulaire change de conformation et permet de recruter TIRAP, qui à son tour facilite la fixation et l'oligomérisation de MyD88. Le recrutement consécutif de BCAP au niveau du récepteur permet la phosphorylation et l'activation de PI3K [116].

PI3K va ensuite pouvoir phosphoryler la partie D3 des phospho-inositols membranaires conduisant à la formation de plusieurs composés dont le PI3,4-biphosphate (PIP2) et le PI3,4,5 triphosphate (PIP3). L'accumulation de PIP3 va favoriser le recrutement de la protéine AKT au niveau de la membrane intracellulaire. AKT y sera ensuite phosphorylée et activée par l'action combinée de la sérine/thréonine kinase PDK1 (pour *phosphatidylinositol- 3-dependent kinase 1*) et du complexe mTORC2 (pour mammalian target of rapamycin complex 2) [126–128].

Une fois activé par double phosphorylation, AKT va à son tour phosphoryler TSC2 (pour *Tuberous Sclerosis Complex 2*) et l'inhiber. TSC2 est un inhibiteur de la voie canonique mTOR dont le rôle est de mesurer les niveaux de nutriments dans l'environnement cellulaire. À l'état basal, TSC2 forme un complexe avec une autre protéine, TSC1. Ce complexe joue le rôle de GAP (pour *GTPase activating protein*) de la protéine G, RHEB (pour *RAS homolog enriched in brain*). Cette protéine existe sous deux formes : RHEB :GDP (forme inactive) et RHEB :GTP (forme active, liée à GTP). En phosphorylant TSC2, AKT inactive le complexe TSC1/TSC2, ce qui permet à RHEB :GTP de se retrouver en excès et d'activer mTORC1 (pour *mammalian target of rapamycin complex 1*).

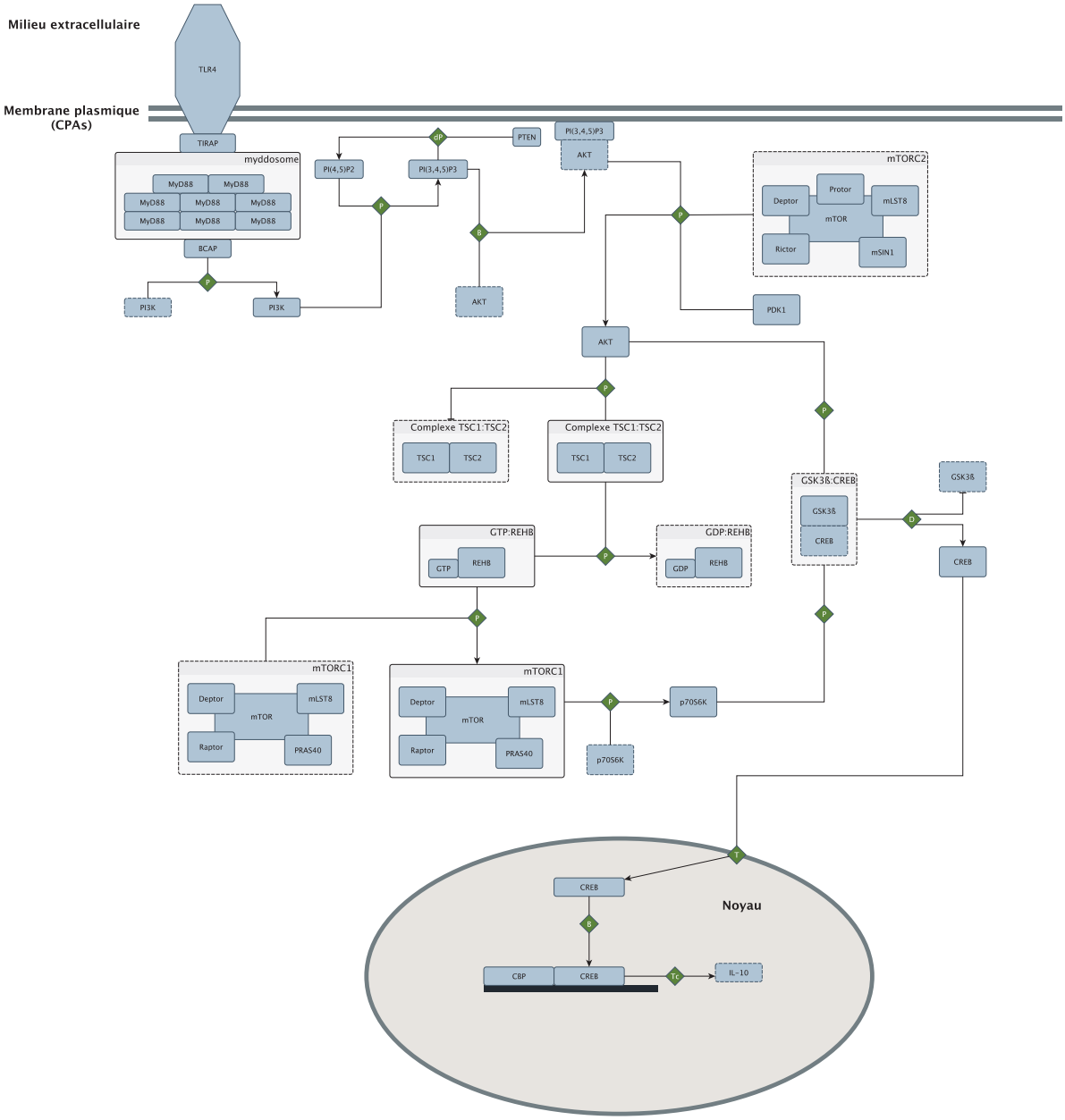


Figure 3.11 – Suite de la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1.

Comme on peut le voir dans la figure 3.11, le complexe mTORC1 est ensuite en mesure de phosphoryler et d'activer S6K1 (pour *ribosomal protein S6 kinase β-1*) [129–131]. S6K1 va ensuite phosphoryler et inhiber GSK3β, ce qui va permettre la libération du facteur de transcription CREB (pour *C-AMP response element-binding protein*) qui pourra migrer vers le noyau [129, 132–137].

AKT peut également phosphoryler et inactiver GSK3β (pour *glycogen synthase kinase 3 β*) [138–143]. Son inactivation entraîne également la libération de CREB [144],

qui peut migrer vers le noyau.

En raison de sa plus grande affinité, CREB va progressivement prendre la place du facteur de transcription NFκB auprès du co-activateur de transcription CBP (pour *CREB binding protein*) [145]. L'augmentation de l'activité de CREB par rapport à NFκB va induire une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires, et une augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires telles que IL-10 [145].

3.5 Rétro-contrôles négatifs

Les signaux pro-inflammatoires délivrés aux cellules immunitaires par le biais des voies de signalisation liées aux récepteurs TLRs, BCR (récepteurs des cellules B), TCR (récepteurs des cellules T) et les récepteurs de cytokines ont chacun leurs propres systèmes de rétroaction négative [146–149]. Cette contrebalance est essentielle pour assurer l'homéostasie d'une réponse immunitaire et éviter les effets délétères d'une réponse exacerbée, comme observé durant des syndromes septiques.

3.5.1 IL-10

L'interleukine 10 est sans doute la cytokine immunorégulatrice la mieux connue. Celle-ci permet la modulation de l'activité d'un nombre important de cellules du système immunitaire, incluant les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) [150]. IL-10 possède des propriétés anti-inflammatoires lui permettant de réprimer l'expression et la production des cytokines pro-inflammatoires telles que TNFα, IL-1β ou IL-12 par les monocytes et les cellules dendritiques [151].

Les récepteurs cellulaires de l'interleukine 10 (IL-10R) sont des complexes composés de quatre sous-unités. Les deux premières sous-unités vont permettre la liaison avec l'interleukine 10 (IL-10R1), et les deux suivantes vont favoriser la transduction du signal (IL-10R2).

Comme présenté dans la figure 3.12, la fixation de l'interleukine 10 sur son récepteur provoque la phosphorylation de deux kinases constitutivement reliées à IL-10R1 et IL-10R2 : JAK1 (pour *janus kinase-1*) et TYK2 (pour *tyrosine kinase 2*).

Une fois phosphorylées, ces deux kinases vont recruter STAT3 (pour *signal transducer and activator of transcription 3*) au niveau du récepteur. STAT3 est à son tour phosphorylé, ce qui entraîne son homodimérisation. Il migre alors vers le noyau pour se fixer sur le SBE (pour *STAT-binding elements*) et promeut la transcription des gènes en réponse à IL-10 [152].

Parmi ces gènes, on compte celui codant pour SOCS3 (pour *suppressor of cytokine signaling-3*) qui fait partie d'une famille de protéines provoquant l'inhibition de la voie JAK/STAT-dependante [153, 154].

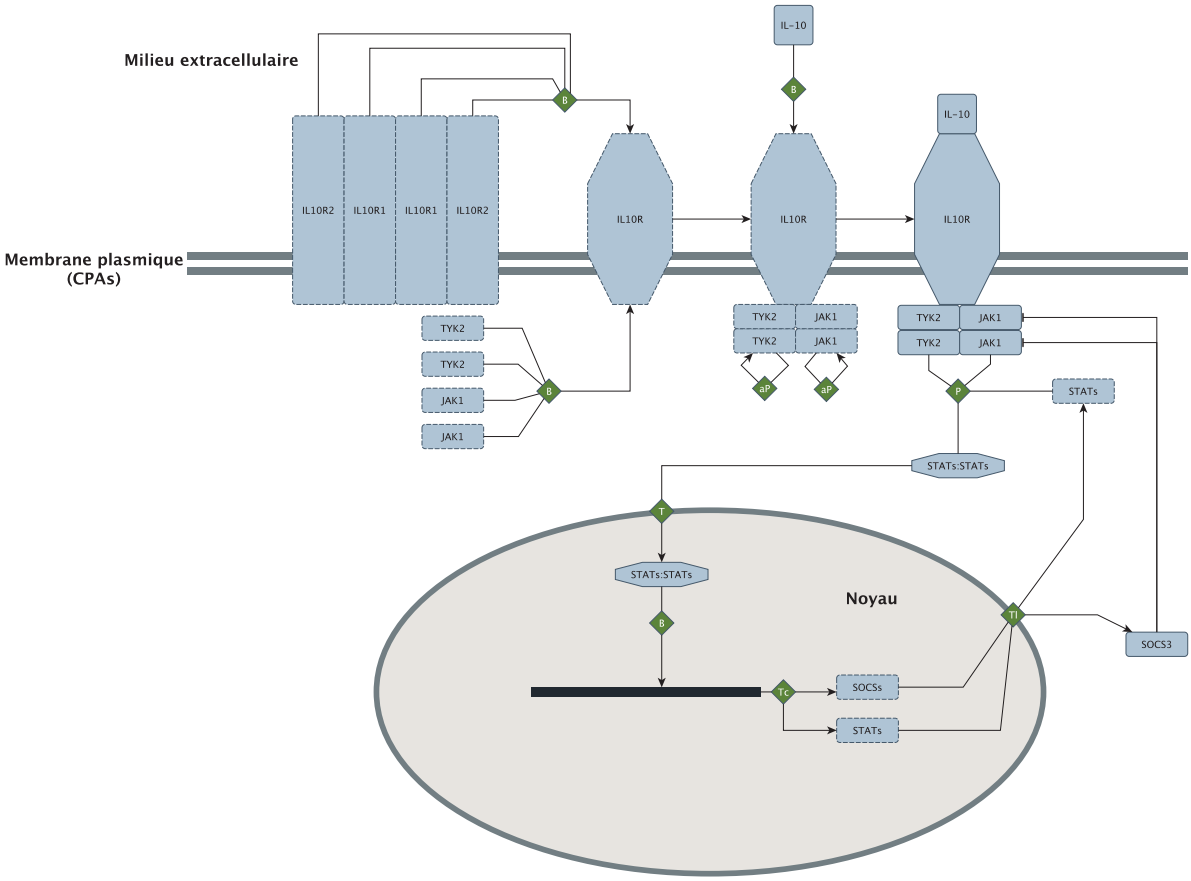


Figure 3.12 – Voie paracrine de IL-10. L'ontologie graphique utilisée pour la création de ce graphe est présentée en annexe A.1.

La capacité qu'ont les cytokines IL-10 à induire la synthèse de SOCS3 par les monocytes est corrélée avec leur habileté à inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNFα et IL-1β suite à une stimulation par LPS [155].

3.5.2 Les protéines SOCS

Les cytokines jouent un rôle essentiel dans le développement, la différenciation et la promotion des fonctions des cellules du système immunitaire. Les cytokines, qui incluent les interleukines et les interférons, ont toutes en commun leur mode d'action : elles se fixent sur leurs récepteurs respectifs et conduisent à l'activation de la voie de signalisation intracellulaire JAK-STAT.

Comme leur nom l'indique, les SOCS (pour *suppressor of cytokine signaling*) sont une famille de protéines inhibitrices des voies de signalisations liées aux cytokines [156–159]. Elles sont sept au total (SOCS1-7) et partagent toutes une structure composée d'un domaine SH2 et d'un module connu sous le nom de *SOCS box*.

Les ligands des récepteurs TLRs, en particulier le LPS, sont de puissants inducteurs des protéines SOCS1 et SOCS3 [160].

3.5.2.1 SOCS1

À la suite de l'activation des TLRs, SOCS1 va intervenir dans plusieurs mécanismes intracellulaires régulateurs de la production de cytokines. Des expérimentations sur des souris incapables de produire la protéine SOCS1 ont permis de montrer une augmentation de la sensibilité au LPS et une production exacerbée des cytokines pro-inflammatoires TNFα et IL-12 [161, 162].

Un certain nombre de mécanismes ont été mis en avant pour expliquer l'implication de SOCS1 dans la suppression de la production de cytokines. Il a été montré que SOCS1 se fixe à NFκB, ce qui conduit à son ubiquitination et sa destruction [163]. SOCS1 va également se fixer à TIRAP, empêchant son interaction avec BTK, et bloquant par conséquent la voie descendante menant jusqu'au facteur de transcription NFκB [164].

3.5.2.2 SOCS3

SOCS3 fait partie des protéines intracellulaires les plus produites par les macrophages suite à une stimulation par LPS. SOCS3 semble jouer un rôle clé dans la régulation de la production de cytokines en inhibant l'activation de TRAF6 et TAK1 [160, 165].

3.5.3 Autres inhibiteurs de la voie TLR4

Les protéines SOCS ne sont pas les seules à être impliquées dans la régulation de la réponse inflammatoire. Nous en décrivons ici trois autres parmis les plus connues dans la régulation de la production de médiateurs inflammatoires.

3.5.3.1 A20

A20 (également connue sous le nom de TNFAIP3 pour *tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3*) est une protéine intracellulaire jouant un rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire [166]. Son expression est fortement induite suite à une stimulation par LPS ou par des cytokines pro-inflammatoires telles que TNFα ou IL-1β. Son rôle n'a pour l'instant pas été parfaitement identifié, mais on sait que cette protéine perturbe les interactions entre les enzymes E2 et E3 et empêchant la polyubiquitination de certaines autres protéines telles que TRAF6 et TRAF3. [167–169].

3.5.4 IRAK-M

IRAK-M (également connue sous le nom de IRAK3) est une enzyme de la famille des IRAK dont l'expression est induite après une stimulation du récepteur TLR4

par du LPS [170–172]. IRAK-M empêche la phosphorylation de IRAK4 au niveau du récepteur, ce qui a pour résultat de bloquer la voie descendante passant par TRAF6, et empêchant par conséquent la libération du facteur de transcription NFκB [173, 174].

3.5.5 IκBs

Le rôle des protéines IκB est d'inhiber le facteur de transcription lorsque son activation n'est pas nécessaire. Cette inhibition se produit via une interaction de type protéine-protéine entre les membres de la famille IκB (IκBa et IκBb) et NFκB dans le cytoplasme [175, 176].

Afin d'éviter une sur-activation de NFκB, et une production excessive de cytokines pro-inflammatoires, il est important de noter que NFκB est lui même un facteur de transcription permettant l'induction rapide d'IκBa et IκBb.

CHAPITRE 4

PARTIE III : MODÉLISATION LOGIQUE DE LA VOIE TLR4

Les précédents chapitres ont permis de mettre en évidence la complexité des mécanismes opérant lors d'une réponse inflammatoire systémique. Les résultats obtenus nous ont conduit à nous focaliser sur la voie de signalisation TLR4 et sur sa régulation.

Alors que la voie TLR4 ne représente qu'une infime partie des processus menant à la genèse de syndromes septiques graves, celle-ci apparaît déjà comme complexe à étudier puisque contrôlée par de nombreux réseaux de régulation eux mêmes composés d'un nombre élevé d'entités biologiques. Toutes ces entités sont reliées par différents types d'interactions moléculaires agissant sur plusieurs échelles spatiales et temporelles.

Ces arguments expliquent la difficulté pour un cerveau humain à prendre en compte l'ensemble des dimensions de ce processus et font de la modélisation numérique un outil privilégié pour l'exploration des réseaux biologiques et la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques. La voie de signalisation TLR4 étant intracellulaire, il est aujourd'hui difficile d'obtenir dans la littérature les connaissances quantitatives nécessaires à la modélisation mécaniste de ce réseau biologique. Nous avons par conséquent opté pour un formalisme et des méthodes de modélisation qualitative.

Dans cette dernière partie de thèse, nous avons cherché à explorer, via des techniques de modélisation logique, le comportement de la voie de signalisation TLR4 suite à une stimulation par LPS.

Dans un premier temps, nous avons repris une approche de modélisation logique, développé un outil modélisation et de simulation pour permettre l'exploration *in silico* de processus biologiques [177].

Nous avons ensuite réalisé un graphe logique de la voie TLR4 et de ses principales boucles de rétro-contrôle. Nous nous sommes basés pour cela sur le modèle

de connaissances présenté dans le chapitre précédent et sur l'ontologie graphique présentée en annexe A.1.

Enfin, nous avons utilisé l'outil de simulation et le graphe logique de la voie TLR4 pour explorer qualitativement le rôle joué par la voie mTOR dans la régulation d'une réponse inflammatoire.

4.1 Introduction

Au cours des dernières décennies, les disciplines des sciences de la vie telles que la génétique, la biochimie ou la biologie moléculaire ont contribué à faire des progrès considérables dans la compréhension des mécanismes régissant le fonctionnement du corps humain. L'expérimentation dans le domaine de la biologie a notamment contribué à la caractérisation précise des composants des tissus, des cellules, des protéines et des gènes. L'essor de l'informatique a par la suite facilité l'acquisition et l'interprétation des données "omiques", incluant les domaines de la génomique, de la transcriptomique, de la protéomique et de la métabolomique.

Toutefois, l'accumulation des données et des connaissances nous confronte à l'impossibilité pour les approches traditionnelles de prendre en compte toute la complexité d'un système biologique, puisque celles-ci ne permettent pas de considérer le système dans son ensemble. Ce constat a donné naissance à la biologie systémique, qui peut se définir comme l'étude des interactions entre les composants d'un système biologique. Les processus biologiques sont contrôlés par des réseaux de régulations dont la complexité est telle que le recours aux méthodes mathématiques et le développement d'outils informatiques s'avèrent aujourd'hui indispensables pour analyser leur comportement dans son ensemble.

La modélisation en biologie systémique offre la possibilité aux scientifiques de reproduire des phénomènes biologiques sous la forme de modèles formels. Leur implémentation en modèles numériques permet l'intégration d'une grande quantité de connaissances qui peuvent ainsi être manipulées et testées par simulation. Ces expérimentations *in silico* sont moins coûteuses en terme de temps et de ressources que les expérimentations faites *in vivo*, mais ont néanmoins l'inconvénient d'être dépendantes des connaissances disponibles dans la littérature.

Un grand nombre de méthodologies a vu le jour depuis la fin du vingtième siècle pour analyser et comprendre les systèmes biologiques. Ces méthodologies vont des plus abstraites, comme les approches statistiques, visant à déterminer le comportement des composants d'un système dans les grandes lignes, aux plus mécanistes, comme l'utilisation de systèmes d'équations différentielles afin de modéliser explicitement et quantitativement des mécanismes biologiques.

Cependant, ces modèles formels nécessitent des connaissances détaillées très rarement accessibles, en particulier pour les phénomènes intracellulaires, tels que la voie de signalisation TLR4 étudiée dans cette thèse. Il est alors possible de recourir à des

approches qualitatives qui permettent de travailler avec des modèles mathématiques plus simples tels que ceux utilisés en modélisation logique. Un nombre croissant d'approches qualitatives ont été développées au cours des dernières décennies en se basant sur les réseaux booléens [178] et qui, comme leur nom l'indique, s'appuient sur la logique booléenne [179].

Dans ce travail, nous sommes partis du formalisme des réseaux booléens [180, 181] que nous avons adapté pour qu'il corresponde le mieux à nos besoins. Le principe de base a par conséquent été gardé : les entités biologiques incluses dans le modèle sont représentées par des variables, et les relations reliant ces entités sont modélisées en utilisant des fonctions dépendantes, non pas du temps, mais des itérations.

Dans un premier temps, le choix de l'adaptation de ce formalisme s'est fait au niveau des opérateurs de type booléens que nous avons choisi de remplacer par des opérateurs de logique floue (pour *fuzzy logic*) [182], le but étant de pouvoir définir les variables entre 0 et 1, et non pas par 0 ou par 1. Nous avons considéré que dans la transduction d'un signal, en particulier dans le domaine de la biologie, les entités n'ont que très rarement un comportement binaire (soit inactives, soit actives). Un récepteur membranaire, par exemple, peut être plus ou moins activé en fonction de l'affinité de son ligand.

Afin de modéliser au mieux le comportement des réseaux biologiques, nous avons par la suite introduit les notions de réactivité et d'affaiblissement de la transmission du signal, intégrant la possibilité d'une quantification "qualitative" des réseaux biologiques. L'intégration de la notion de réactivité peut s'expliquer par le fait que certains processus, tels que la transcription et la traduction d'un gène, sont plus longs que l'activation d'une protéine intracellulaire suite à sa phosphorylation. La notion d'affaiblissement du signal peut se justifier en reprenant l'exemple du récepteur membranaire, qui peut avoir plusieurs degrés d'activation en fonction de l'affinité du ligand avec lequel il est relié.

4.2 Matériel et méthodes

Dans cette section, nous allons revenir sur les concepts de la modélisation logique. Nous détaillerons ensuite la méthodologie qui a été développée dans le cadre des travaux de l'équipe de NovaDiscovery [1], et qui a fait l'objet de la soumission d'un article méthodologique [183]. Nous reviendrons ensuite sur son implémentation, et la présentation de l'outil Logml. Enfin, nous définirons les étapes qui ont été nécessaires à la création du modèle logique de la voie TLR4, et les scénarios qui ont été utilisés pour les étapes de simulation.

1. www.novadiscovery.com

4.2.1 Introduction à la modélisation logique

Les biologistes utilisent différents types de réseaux pour représenter des phénomènes observés, allant des réseaux de régulation aux réseaux de signalisation (ou *signalling pathways*), en passant par les réseaux métaboliques et d'interaction protéine/protéine. Tous ces réseaux ont en commun l'utilisation d'entités biologiques, conceptualisées sous la forme de noeuds et dont les relations sont symbolisées par des arêtes. Les réseaux biologiques s'appuient sur la théorie des graphes pour définir les systèmes biologiques et leur typologie [184].

Un réseau se définit comme un graphe orienté $G = (V, E)$ où $V = \{v_1, \ldots, v_n\}$ est un ensemble fini de n noeuds et où E est un ensemble de fonctions booléennes qui définit une topologie d'arêtes. n est appelé la taille ou la dimension du réseau.

Dans la pratique, les noeuds représentent des entités et les arêtes représentent les relations binaires $R \subseteq V^2$ les reliant : $v_i \; R \; v_j$. Si nous prenons l'exemple des réseaux de régulation, un noeud représente un gène ou un stimulus biologique. Pour chaque noeud v, est associée une valeur booléenne $x(v)$ qui représente le niveau d'expression du stimulus correspondant. Pour chaque gène, sa valeur x sera de 1 si celui-ci est transcrit, et 0 dans le cas contraire.

4.2.1.1 Réseaux booléens

Dans la modélisation booléenne, il faut mettre de côté les notions de concentrations et de réactions chimiques. Une entité est définie comme présente (*vraie*) ou absente (*fausse*). Les équations différentielles employées dans des approches de modélisation mécaniste sont remplacées par des fonctions de transition booléennes.

Les premiers travaux sur les réseaux booléens remontent aux années 1970 avec Kauffman [185], Glass [186], Ostrander *et al.* [187] et Thomas [188].

Bien que n'utilisant pas une approche formelle, l'utilisation des réseaux booléens a permis de prédire et d'expliquer un bon nombre de phénomènes biologiques observés [189–192].

Un réseau booléen se définit comme un réseau où les noeuds sont des variables booléennes x_i et où les arêtes (x_i, x_j) définissent la fonction permettant la mise à jour de ce noeud.

L'ensemble E, est un ensemble de fonctions booléennes, également appelées règles. Chacune d'entre elles étant associée à un noeud tel que : $E = \{f_v | v \in V\}$ avec,

$$\begin{aligned} \forall v \in V, f_v : \quad \{0,1\}^b &\to \{0,1\} \\ (x_1, \ldots, x_b) &\to f_v(x) \end{aligned}$$

Chaque x_i a une valeur $b_i \in [\![0, n]\!]$ définissant les entrées $x_{i,1}, \ldots, x_{i,b_i}$. L'ensemble de ces entrées définit la connectivité de x_i. Dans le cas de figure où $b_i = 0$, alors x_i est un paramètre qui ne dépend pas d'autres variables.

Le fonctionnement d'un réseau booléen se fait en temps discret. À chaque itération $k \in [\![k_0, k_m]\!]$, la valeur $x_i(k) \in \{0,1\}$ de chaque x_i est actualisée par la valeur $x_i(k+1)$ en utilisant f_i et les valeurs $x_{i,1}(k), \ldots, x_{i,b_i}(k)$ des variables connectées. L'ensemble E définit pour chaque noeud la valeur de la variable $x(v)$ tel que :

$$\forall v \in V, x(v)^{k+1} = f_v\left(x(v_{i,1})^k, \ldots, (x(v_{i,b})^k\right)$$

On définit l'état d'un réseau à un temps discret k par le vecteur $(x_1^k, \ldots, x_n^k)$ des niveaux d'activation à l'instant k.

On différencie deux types de réseaux booléens en fonction du schéma d'actualisation des noeuds : si les valeurs des noeuds x_i sont actualisées simultanément, comme dans ce travail, on parle alors de réseau synchrone, autrement, il s'agit d'un réseau asynchrone [193]. Le grand avantage des réseaux synchrones est qu'ils sont déterministes, puisque à chaque itération k, $x(k)$ n'a qu'un seul successeur qui est $x(k+1)$.

4.2.1.2 Définition des opérateurs de logique floue

La principale différence entre la logique booléenne et la logique floue vient du fait que la première est discrète et définie sur $[\![0;1]\!] \subset \mathbb{N}$, alors que la seconde est continue et définie sur $[0;1] \subset \mathbb{R}$.

La logique floue peut être considérée comme une généralisation de la logique booléenne puisque les opérateurs de logique floue se comportent comme les opérateurs booléens sur $[\![0;1]\!]$ alors qu'ils sont définis sur $[0;1]$.

Les opérateurs booléens AND, NOT, et OR deviennent alors le *t-norm*, le *complement* et le *s-norm* respectivement. Ils sont définis de la façon suivante :

$$\begin{aligned} t\text{-}norm &: [0;1]^2 \to [0;1] : (x,y) \mapsto t\text{-}norm(x,y) \\ complement &: [0;1] \to [0;1] : x \mapsto complement(x) \\ s\text{-}norm &: [0;1]^2 \to [0;1] : (x,y) \mapsto s\text{-}norm(x,y) \end{aligned}$$

avec $x, y \in [0;1]$.

Il existe plusieurs formulations mathématiques pour exprimer *t-norm*, le *complement* et *s-norm*, toutes respectant les lois de l'algèbre booléen [194] mais définies sur $[0;1]$.

Par commodité, les opérateurs booléens et de logique floue seront tous deux nommés AND, NOT et OR et sont définis algébriquement de la façon suivante :

$$\begin{aligned} AND(x,y) &= x \cdot y \\ NOT(x) &= 1 - x \\ OR(x,y) &= 1 - (1-x)(1-y) \\ &= x + y - x \cdot y \end{aligned}$$

Cela permet, via l'utilisation des opérateurs de logique floue, d'avoir des variables continues et dont les valeurs sont comprises entre $[0;1]$. Ces variables peuvent prendre la valeur de 1 (vraies), 0 (fausses) et l'ensemble des autres valeurs de l'intervalle $[0;1]$ (plus ou moins vraies).

C'est une façon plus réaliste de modéliser la biologie puisqu'une entité, qu'il s'agisse d'un récepteur membranaire ou une enzyme intracellulaire, est très rarement complètement activée ou complètement inhibée. L'utilisation d'opérateurs de logique floue permet de prendre en compte tous les états d'activation intermédiaires.

4.2.2 Définition de l'approche

Comme énnoncé précédemment, les opérateurs booléens AND, OR et NOT ont été remplacés par les opérateurs de logique floue *t-norm*, *s-norm* et *complement*.

Les états initiaux $x_i(k_0)$ des x_i appartenant à $[0;1]$, la valeur des x_i doit être définie sur $[0;1] : x_i(k) \in [0;1]$, de telle manière que la fonction f_i soit définie entre $[0;1]^n$ et $[0;1]$:

$$f_i \colon [0;1]^n \to [0;1] \colon \boldsymbol{x} \mapsto f_i(\boldsymbol{x})$$

avec les valeurs de $\boldsymbol{x}$ et $\boldsymbol{x}_0$ appartenant à $[0;1]^n : \boldsymbol{x}(k), \boldsymbol{x}_0 \in [0;1]^n$, $\boldsymbol{f}$ se retrouve définie entre $[0;1]^n$ et elle-même :

$$\boldsymbol{f} \colon [0;1]^n \to [0;1]^n \colon \boldsymbol{x} \mapsto \boldsymbol{f}(\boldsymbol{x})$$

Les autres fonctionnalités qui ont été ajoutées à la modélisation logique booléenne classique concernent la transmission du signal via les arêtes. Ces fonctionnalités sont présentées séparées dans les paragraphes suivants.

4.2.2.1 Définition des arêtes

Comme pour les noeuds, les états des arêtes sont calculés. Par commodité, les arêtes seront notées e_{ij} au lieu de (x_i, x_j). Une arête e_{ij} se définit comme un canal transmettant un signal depuis sa source x_i jusqu'à sa cible x_j, ce qui lui permet de calculer son état grâce à la fonction f_j.

Concrètement, e_{ij} transmet la valeur $x_i(k)$ de x_i à x_j, utilisée par f_j pour calculer $x_j(k+1)$. Cette étape est normalement faite de façon implicite dans les réseaux booléens où $x_j(k+1) = f_j(\dots, x_i(k), \dots)$. Cependant, dans ce travail, il a été nécessaire de rendre cette étape explicite afin de moduler le signal transmis par les arêtes. Ainsi, f_j n'accepte plus $x_i(k)$ en tant qu'argument, mais bien $e_{ij}(k)$. Puisque e_{ij} transmet le signal de $x_i(k)$, sa valeur $e_{ij}(k)$ est égale à $x_i(k)$. La fonction f_{ij}^{edge} est alors appliquée à chaque e_{ij} de la façon suivante :

$$e_{ij}(k+1) = f_{ij}^{edge}(x_i(k), e_{ij}(k))$$

Il est important de noter que f_{ij}^{edge} prend en argument la valeur $e_{ij}(k)$ en plus de $x_i(k)$. Ceci permet l'ajout de la fonctionnalité de *réactivité* des arêtes décrite plus bas. f_j prend donc en argument $e_{ij}(k)$ au lieu de $x_i(k)$. Par commodité, f_j sera renommée pour la suite en f_j^{node} :

$$x_j(k+1) = f_j^{node}(\boldsymbol{e}(k))$$

avec $\boldsymbol{e} = (\dots, e_{ij}, \dots)$ l'homologue de $\boldsymbol{x} = (\dots, x_i, \dots)$, qui est le vecteur d'états des arêtes, avec sa valeur à l'itération k : $\boldsymbol{e}(k) = (\dots, e_{ij}(k), \dots)$. Par conséquent, $\boldsymbol{f}$ devient $\boldsymbol{f}^{node} = (\dots, f_i^{node}, \dots)$:

$$\boldsymbol{x}(k+1) = \boldsymbol{f}^{node}(\boldsymbol{e}(k))$$

La fonction de transition des arêtes $\boldsymbol{f}^{edge} = (\dots, f_{ij}^{edge}, \dots)$ est introduite de la façon suivante :

$$\boldsymbol{e}(k+1) = \boldsymbol{f}^{edge}(\boldsymbol{x}(k), \boldsymbol{e}(k))$$

4.2.2.2 Réactivité des arêtes

La *réactivité* des arêtes est prise en compte via le paramètre qualitatif $p_{ij} \in [0;1]$ qui est attribué à chaque e_{ij}. p_{ij} représente la portion du signal qui est transmise par e_{ij} pour chaque itération k. En résumé, il s'agit de la portion de la valeur de $e_{ij}(k)$ qui est transmise à $x_i(k)$:

$$e_{ij}(k+1) = (1 - p_{ij}) \cdot e_{ij}(k) + p_{ij} \cdot x_i(k)$$

Plus le paramètre p_{ij} aura une valeur élevée, plus grande sera la portion de $e_{ij}(k)$ transmise. Une arête très *réactive* aura une valeur associée pour le paramètre p_{ij} proche de 1 alors qu'une arête de faible *réactivité* aura un paramètre associé p_{ij} proche de 0.

D'un point de vue biologique, la *réactivité* des arêtes permet de prendre en compte le fait que certaines fonctions biologiques sont plus lentes que d'autres. Par exemple, une arête décrivant un processus de transcription de gène aura un p_{ij} associé plus faible qu'une arête décrivant une étape de phosphorylation d'une protéine par une autre.

4.2.2.3 Atténuation des arêtes

L'*atténuation* des arêtes est prise en compte via le paramètre qualitatif $q_{ij} \in [0;1]$ qui est attribué à chaque e_{ij}. q_{ij} peut être considéré comme un coefficient k limitant le signal transmis par e_{ij}, et défini de la façon suivante :

$$e_{ij}(k+1) = q_{ij} \cdot x_i(k)$$

Plus le paramètre q_{ij} aura une valeur élevée, moins le signal $x_i(k)$ transmis par e_{ij} sera affaibli : une arête dont le signal sera peu affaibli aura une valeur de paramètre q_{ij} proche de 1 alors qu'une arête avec un paramètre associé q_{ij} proche de 0 aura un signal transmis très atténué.

D'un point de vue biologique, l'*atténuation* des arêtes permet de transcrire le fait que certaines interactions biologiques sont moins efficaces que d'autres. Si nous reprenons l'exemple du récepteur membranaire, certains agonistes vont permettre de l'activer complètement, et la valeur du paramètre q_{ij} associé sera alors de 1. Alors que dans le cas d'agonistes partiels, l'activation de ce récepteur ne serait pas complète. La valeur du paramètre q_{ij} serait alors comprise entre 0 et 1.

4.2.2.4 Combinaison des deux paramètres

La *réactivité* et l'*atténuation* des arêtes sont calculés de la façon suivante pour chaque itération :

$$e_{ij}(k+1) = (1 - p_{ij}) \cdot e_{ij}(k) + p_{ij} \cdot q_{ij} \cdot x_i(k)$$

Ce qui donne pour f_{ij}^{edge} :

$$f_{ij}^{edge}(x_i, e_{ij}) = (1 - p_{ij}) \cdot e_{ij} + p_{ij} \cdot q_{ij} \cdot x_i$$

4.2.2.5 Définition des perturbations

Pour les besoins de simulations, certains noeuds x_i peuvent être soumis à des perturbations pendant un intervalle d'itérations k et avec une intensité donnée. L'objectif pouvant être, par exemple, de simuler l'injection d'un principe actif influant sur le

niveau d'activation d'un ou de plusieurs noeuds du modèle logique. Les perturbations sont appliquées via le paramètre $pwd \in [0,1]$, définissant l'intensité de la perturbation. Ce paramètre est associé à $int_k \in [0:100]$ définissant l'intervalle d'itérations k pendant lequel ces perturbations sont appliquées.

4.2.3 Implémentaion : l'outil *Logml*

L'outil *Logml* a été développé dans le cadre des travaux de cette thèse et en collaboration avec les membres de l'équipe de Novadiscovery [2]. L'objectif a été de se baser sur la méthodologie présentée dans les paragraphes précédents pour mettre au point une solution intégrée de calculs et de simulations pour les modèles logiques.

Cet outil de modélisation logique et de simulation, qui est publiquement disponible sur GitHub [3] (distribué sous une licence MIT), a été pensé de manière à pouvoir prendre en entrée un modèle logique graphique pour donner en sortie les résultats des simulations correspondantes. Les avantages majeurs de cette approche sont d'éviter l'insertion malencontreuse d'erreurs pendant les phases de traduction du graphe logique en code, et de permettre l'accès à cet outil à des biologistes n'ayant aucune notion de programmation.

Dans un premier temps, un modèle logique graphique doit être réalisé via le logiciel d'édition de graphes yED [4] et en se basant sur l'ontologie graphique qui est présentée en Annexe A.1. Le graphe logique se crée à partir des connaissances extraites de la littérature scientifique et/ou via l'utilisation de bases de connaissances de telles que KEGG (figure 4.1) [195] ou Reactome [196]. Richement annoté, ce graphe se compose de :

— l'ensemble des noeuds (entités biologiques)
— l'ensemble des relations logiques reliant ces noeuds (arêtes)
— l'ensemble des valeurs initiales des noeuds
— l'ensemble des paramètres d'arêtes (p_{ij} et q_{ij})
— l'ensemble des noeuds perturbés (définis grâce au paramètre pwd)

L'ensemble de ces annotations sont faites directement dans le graphe via l'utilisation de l'outil yED. Les paramètres p_{ij}, q_{ij}, pwd et $x_i(k_0)$ sont qualitativement quantifiés selon six niveaux d'activation. L'intervalle $[0,1]$ ayant été divisé en six niveaux d'activation pour chaque paramètre (tableau 4.1).

Dans un second temps, le graphe logique est donné en entrée de l'outil Logml qui va permettre son analyse syntaxique (*parsing*) via l'utilisation de bibliothèques JavaScript (plateforme NodeJs [5]). L'ensemble des informations intégrées dans le graphe sont alors automatiquement extraites par l'outil et sont utilisées pour la génération des équations logiques et du code Fortran 95 correspondant. La méthodologie décrite

2. www.novadiscovery.com
3. https://github.com/nodys/logml
4. https://www.yworks.com/
5. https://nodejs.org/en/

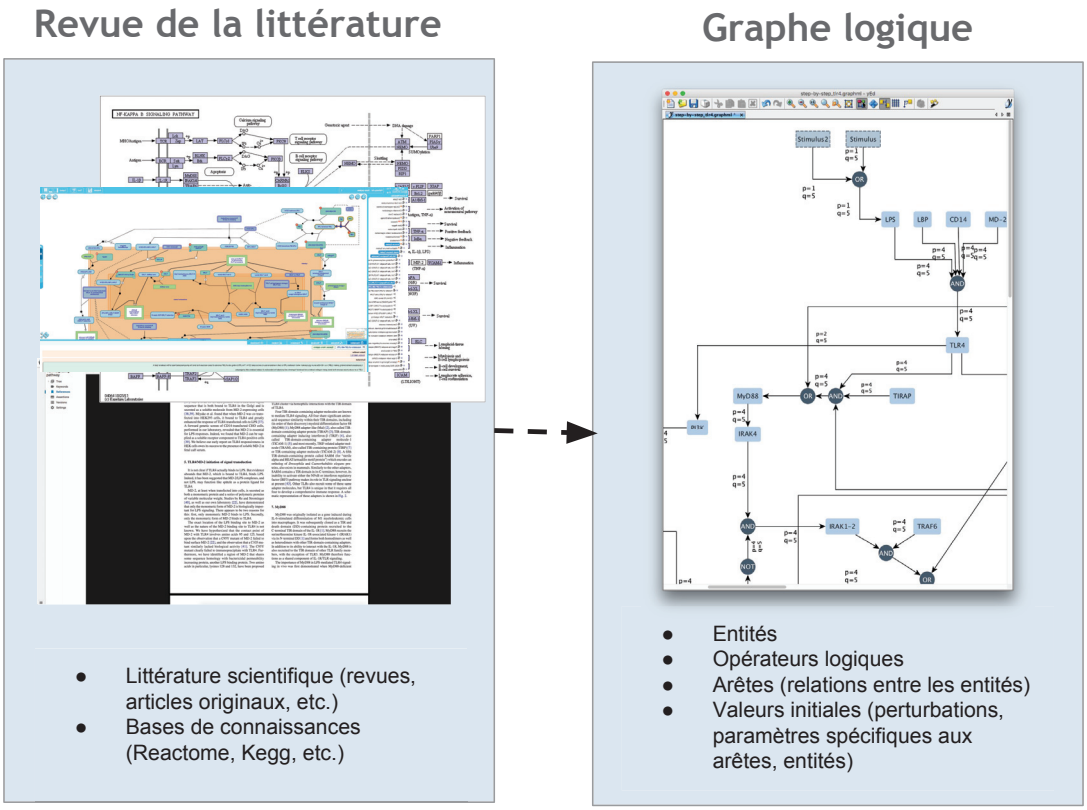


Figure 4.1 – Processus de construction d'un graphe logique. La première étape consiste en une revue de la littérature. La seconde étape consiste en la réalisation d'un graphe logique grâce à l'outil yED et à l'utilisation de l'ontologie graphique présentée en annexe A.1.

Valeur qualitative du paramètre	$x_i(k_0)$	pwd	p_{ij}	q_{ij}	Valeur quantitative du paramètre
5	maximum	maximum	instantané	maximum	1
4	élevé	élevé	très rapide	très efficace	0.8
3	moyen	moyen	rapide	efficace	0.6
2	bas	bas	lent	affaibli	0.4
1	minimum	minimum	très lent	très affaibli	0.2
0	nul	nul	nul	nul	0

Tableau 4.1 – Définition des paramètres qualitatifs utilisés lors de la création des graphes logiques et de leurs valeurs quantitatives correspondantes.

dans les précédents paragraphes a également été implémentée sous forme de librairies codées en Fortran 95.

Enfin, le code qui a été généré est compilé et exécuté. Les résultats des simulations sont automatiquement générés dans un navigateur internet, où un environnement dynamique a été créé pour faciliter leur visualisation (figure 4.2).

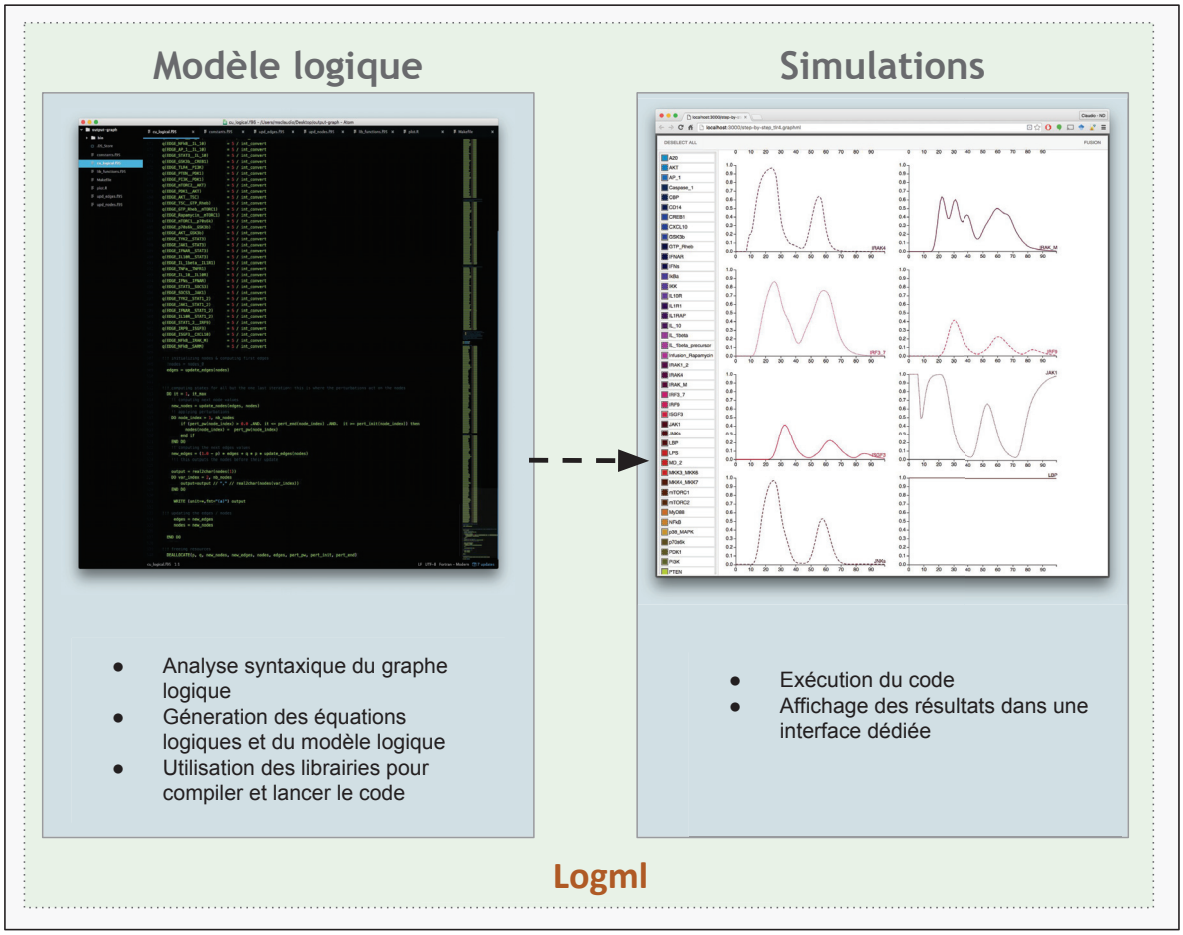


Figure 4.2 – Description du fonctionnement de l'outil *Logml*. Le graphe logique donné en entrée est d'abord analysé syntaxiquement par l'outil, avant d'être transformé en équations logiques, puis en code exécutable. Les résultats sont ensuite affichés dans une interface dédiée.

4.2.4 Construction du modèle logique de la voie TLR4

Dans le but d'explorer le comportement de la voie de signalisation TLR4 et de ses principales boucles de rétro-contrôle, nous avons réalisé un graphe logique. Nous nous sommes pour cela basés sur le modèle de connaissances présenté dans le chapitre précédent où chaque relation entre les entités de la voie de signalisation TLR4 ont été redéfinies en relations logiques via l'utilisation des opérateurs *AND*, *OR* et *NOT*. Comme on peut le voir sur la figure 4.3, les paramètres p_{ij} et q_{ij}, définissant respectivement la *réactivité* et l'*atténuation* des arêtes, ont été évalués sur la base des connaissances intégrées dans le modèle de connaissances.

Le graphe logique complet de la voie de signalisation TLR4 est présenté en Annexe B.1. Celui-ci se compose de 61 noeuds et de 86 arêtes.

Comme pour les paramètres p_{ij} et q_{ij}, les valeurs initiales des noeuds $x_i(k_0)$ ont été déterminées sur la base des connaissances intégrées dans le modèle de connais-

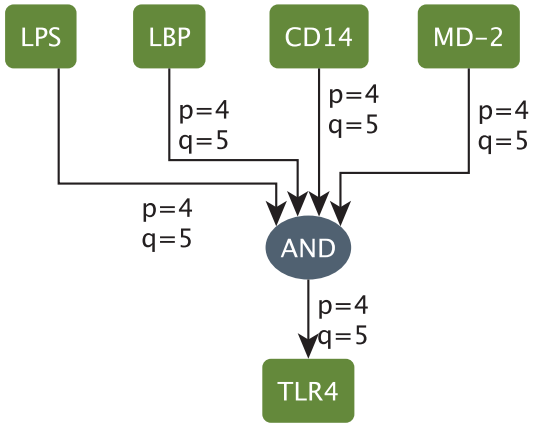


Figure 4.3 – Exemple extrait du graphe logique de la voie TLR4 montrant l'activation du récepteur TLR4 par le LPS.

sances. L'ensemble des valeurs initiales ainsi que les équations logiques générées sont présentés en Annexe C.1 et D.1 respectivement.

4.2.5 Plan d'expérience *in silico*

Nous avons utilisé le graphe logique (annexe B.1) et l'outil *Logml* pour réaliser des expérimentations *in silico* dans le but d'explorer le modèle et les observations biologiques identifiées dans la littérature. Trois scénarios ont ainsi été établis.

Dans un premier temps, nous avons étudié le comportement du modèle suite à différents types d'injections de LPS. Nous avons ainsi simulé l'injection de différentes doses de LPS, en faisant évoluer non seulement la quantité de LPS administrée, mais également la durée pendant laquelle cette dose a été administrée.

Nous avons ensuite cherché à étudier le comportement du modèle suite à des doses successives de LPS. L'objectif a été de vérifier si le modèle est capable de reproduire le phénomène de tolérance à l'endotoxine tel qu'il est observé dans la littérature.

Enfin, nous avons cherché à comprendre le rôle joué par mTOR dans la régulation de la réponse cellulaire après un contact avec du LPS. Nous avons pour cela simulé l'utilisation de Ramamycine, un inhibiteur connu du complexe mTOR.

Pour chacun des scénarios, nous nous sommes focalisés sur la balance de la production des cytokines pro- et anti-inflammatoires. La réalisation de ces expérimentations *in silico* a nécessité la création de noeuds spéciaux définissant des processus expérimentaux tels que "Infusion de LPS", ou "Infusion de Rapamycine". Ces noeuds sont alors perturbés en fonction du design du scénario. Comme on peut le voir sur la figure 4.4, le signal est transmis aux noeuds cibles (LPS et Rapamycine) avec une valeur de réactivité minimale ($p = 1$) afin de prendre en compte la cinétique des infusions

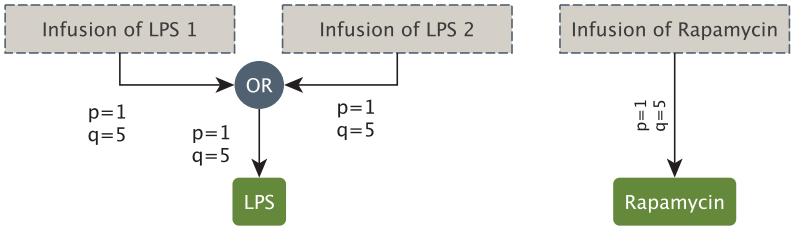


Figure 4.4 – Présentation des noeuds logiques utilisés pour définir les processus expérimentaux.

de LPS et de Rapamycine, qui sont des processus généralement plus longs que ceux observés dans la voie intracellulaire.

4.3 Article : *In silico simulation of mTOR signalling pathway in Toll like receptor 4 via a logical modelling approach*

L'ensemble des résultats de cette étude sont présentés dans un second article qui a été soumis dans le journal BMC Systems Biology en Avril 2016.

RESEARCH

In silico simulation of mTOR signalling pathway in Toll like receptor 4 via a logical modelling approach

Claudio Monteiro Sousa[1,2*], Jean Ponchon[1], Julien Wan[1], Michel Tod[3], François Gueyffier[2] and Jean-Pierre Boissel[1]

*Correspondence: claudio.monteiro@novadiscovery.com
[1]Novadiscovery, (http://www.novadiscovery.com), 60 avenue Rockefeller, 69008 Lyon, France
Full list of author information is available at the end of the article

Abstract

Background: Toll like receptor 4, which senses the presence of gram-negative bacterial ligands, is one of the most characterized pattern recognition receptors. Activation of TLR4 by lypopolysaccharides leads to the release of inflammatory response mediators including pro- and anti-inflammatory cytokines. Although the inflammation is an essential process to fight against infections, it may lead to a disruption of immune homeostasis in case of an uncontrolled release of inflammatory mediators. Fortunately, our immune system has its own regulatory pathways. Among them, the mTOR signalling pathway emerges as playing a central role during the inflammatory response resolution. We modelled the inflammatory response using an enhanced Boolean approach and the *Logml* framework to explore by *in silico* experiments the role played by the mTOR complex.

Results: Three different experimental scenarios were simulated, exploring the different aspects of the inflammatory response after endotoxin infusions and mTOR inhibition. We illustrated that the response of the model is affected according to the intensity, the magnitude and the schedule of endotoxin dose administrations. Our work provides insights into the central role played by the mTOR signalling pathway in the regulation of the CBP, CREB and NFκB transcription factors. Inhibition of mTOR during an inflammatory response results in a drastic reduction of IL-10 production and a significant increase of IL-1β release, suggesting that dysregulation of the mTOR pathway may lead to a disruption of immune homeostasis.

Conclusion: We propose in this work the first *in silico* analysis of the role played by mTOR signalling in the regulation of the TLR4 response. These results open perspectives for novel therapeutic applications by targeting mTOR immune regulatory functions.

Keywords: Logical modelling; TLR4; mTOR; inflammation; inflammatory response; Boolean networks; fuzzy logic operators

Background

During the past decades, considerable progress has been made in our understanding of how host cells recognize and eliminate invading microorganisms. Recognition of pathogens is determined by germline-encoded Pattern Recognition Receptors (PRRs) [1, 2]. Toll-Like Receptors (TLRs) are the most characterized PRRs [3, 4, 5, 6] and play central roles in the activation of innate and adaptive immu-

nity [7]. However, excessive TLRs activation can disrupt immune homoeostasis, and may be responsible for the development of autoimmune and inflammatory diseases [8]. Although inflammatory responses are essential processes to fight against infections, uncontrolled release of inflammatory mediators and clotting factors, such as what can be observed during a "cytokine storm", can be followed by severe septic syndromes, synonymous with a high mortality rate [9].

In this paper, we focused on Toll-Like Receptor 4 (TLR4), which senses the presence of Gram-negative bacterial ligands which are implicated in almost 30% of septic syndromes [10, 11]. Activation of TLR4 by lipopolysaccharides (LPS), a major component of the outer membrane of Gram-negative bacteria, leads to the biosynthesis of a substantial number of mediators of inflammation including pro-inflammatory cytokines (e.g. TNF-α, IL-1β, etc.) and anti-inflammatory cytokines (e.g. IL-10, etc.). Signals delivered to immune cells through TLR4 activated signalling pathways have their own negative-feedback signals [12, 13, 14]. These counterbalancing signals are essential for the proper homoeostasis of an immunological response. The study of these signals led us to identify in a previous work the mTOR signalling pathway as a potential key regulator of systemic inflammatory response [15].

Despite important progress made over the past decades in the understanding of mTOR and TLR4 intracellular transduction pathways, it remains uncertain how they interact with one another. We used LPS as stimulator and *in silico* approaches to emulate the system functioning and explore the role played by mTOR signalling pathway in the regulation of TLR4. Due to the high number of entities involved, and the lack of quantitative data describing intracellular signals, logical modelling appeared as the best choice to simulate the different counterbalancing signals which take place during TLR4 signal transduction.

An enhanced Boolean modelling approach was developed from a previous work [16] and implemented as an integrated simulation framework. Different scenarios, such as the infusion of multiple doses of LPS or pretreatments with rapamycin (an inhibitor of mTOR complex), was then simulated in order to explore the consistency of the produced logical graph.

Material and methods

In this paper, we applied Boolean modelling methods extended with fuzzy logic operators to provide insights into the dynamics of TLR4 and its selected downstream signalling pathways. Taking into account the high number of entities involved and the lack of quantitative parameters describing intracellular signalling pathways, we created a logical model to emulate the system functioning. While remaining relevant for knowledge-based reasoning and checking [17], this formalism is not dependent on the availability of quantitative data such as kinetic rate parameters of reactions.

Based on scientific literature and pathway databases such as Reactome [18] or KEGG [19], we created a richly annotated logical graph.

The logical modelling and simulation tool that we developed takes the logical graph as the input and generates the corresponding logical equations (Figure 1). Each node and each edge of the graph is previously annotated with its initial values. In this way, nodes names and their initial values are automatically extracted from the graph by the *Logml* tool. Nodes where perturbations are applied, are identified

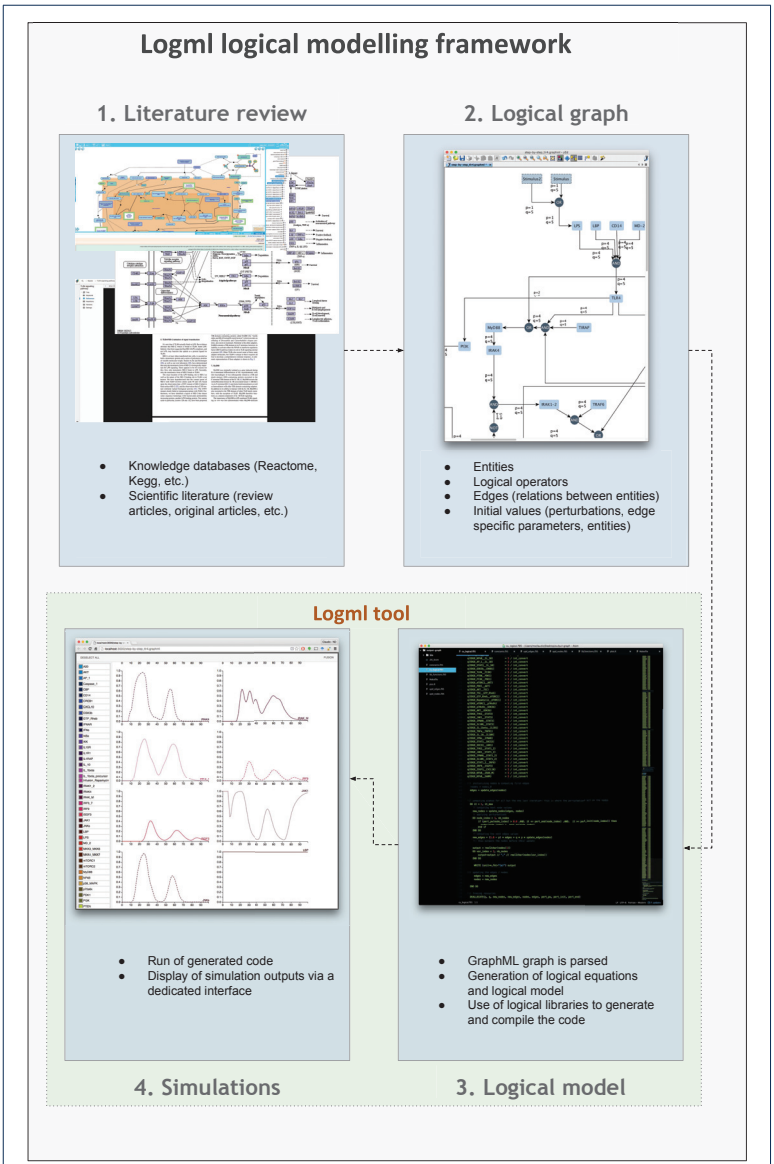


Figure 1 Logml logical modelling framework. Overview of the logical modelling framework which consists of four stages: (i) Literature review, principally based on scientific papers and knowledge databases such as KEGG or Reactome; (ii) Build of the logical graph regrouping all the extracted knowledge from the literature regarding nodes and relations between nodes; (iii) Use of *Logml* to parse the logical graph and generate the executable code; (iv) Run of the generated code and plot of the results

as well as the intensity and the intervals featuring the perturbations. Edges defining relations between nodes and their associated qualitative parameters values are also automatically determined by parsing the logical graph. Logical equations are then used by the *Logml* tool to automatically generate, execute corresponding code and plot the results of simulations.

An extended Boolean modelling approach

The proposed logical modelling framework is based on the Boolean network theory where classic Boolean operators are replaced with fuzzy operators and where edges are tuned in order to adapt the speed and the strength of the signal that they transmit [16].

A network is commonly described as a graph $G = (V, E)$ where $V = \{v_1, \ldots, v_n\}$ is the set of size containing exactly all the nodes v_i of the network and where $E = \{(v_{i,1}, v_{j,1}), \ldots, (v_{i,m}, v_{j,m})\}$ is the set of size m containing exactly all the edges (v_i, v_j) of the network. In practice, nodes represent biological entities and edges represent causal relations between them.

A Boolean network is a network where nodes are considered as Boolean variables x_i and where edges (x_i, x_j) characterize the binary relation: x_i *is input of* x_j. The main difference between Boolean and fuzzy logic is that the former is discrete, valued in $[\![0, 1]\!]$, whereas the latter is continuous, valued in $[0, 1]$.

The classic Boolean operators AND, OR and NOT have then been replaced by the fuzzy operators *t-norm*, *s-norm* and *complement*, respectively. These operators are algebraically defined as following:

$$\begin{aligned} AND(x, y) &= x \cdot y \\ OR(x, y) &= 1 - (1 - x)(1 - y) \\ &= x + y - x \cdot y \\ NOT(x) &= 1 - x \end{aligned}$$

For convenience, both the Boolean and fuzzy operators are named AND, OR and NOT.

In addition to fuzzy logic operators, the features of edge reactivity and edge weakening have been introduced in order to modulate the signal conveyed through edges. Both "weakness" and "reactivity" parameters can be considered as qualitative scale parameters which are valued in order to prioritize (in time and intensity) relationships between entities. Edge reactivity takes into account that some biological processes, such as gene expression, may take longer than other ones customarily considered fast, such as an enzyme phosphorylation. Edge reactivity is implemented by the qualitative parameter $p_{ij} \in [0, 1]$ attributed to each edge, named e_{ij} for convenience. p_{ij} is the portion of the signal transmitted by e_{ij} and updated at each iteration k. The portion of the value $e_{ij}(k)$ which is updated to $x_i(k)$ is defined as following:

$$e_{ij}(k + 1) = (1 - p_{ij}) \cdot e_{ij}(k) + p_{ij} \cdot x_i(k)$$

Edge weakening takes into account the fact that some biological interactions, such as activation of a receptor by a partial agonist, may be weaker than other ones. Edge weakening is implemented by the qualitative parameter $q_{ij} \in [0, 1]$ attributed to each edge e_{ij}. q_{ij} is a weakening coefficient applied at each iteration k and is defined as following:

$$e_{ij}(k+1) = q_{ij} \cdot x_i(k)$$

Finally, some entities may be subjected to perturbations, for instance to simulate an infusion of an active substance. Disturbances are applied to nodes via a strength of disturbance parameter $pwd \in [0, 1]$ associated with an interval of iterations $int_k \in [0, 100]$ during which disturbances are supposed to take place (Appendix 3).

p_{ij}, q_{ij}, pwd and $x_i(k_0) \in [0, 1]$ are qualitatively valued as "degrees of truth". $[0, 1]$ was split into six degrees of truth for each parameter, defined in table 1.

Table 1 Definition of qualitative parameters.

Truth degrees	Parameter value	$x_i(k_0)$ / pwd	p_{ij}	q_{ij}
5	1	full	instantaneous	strong
4	0.8	much more	faster	weaker
3	0.6	more	fast	weak
2	0.4	few	slow	faint
1	0.2	fewer	slower	fainter
0	0	none	down	down

In this work, it is important to note that k represents the iterations performed during simulations, not the time. Here the goal is to visualize sequences of events linked by causal connections without time.

Construction of the TLR4 signalling pathway logical graph

Based on scientific literature and according to well-known pathway databases such as Reactome [18] and KEGG [19], we constructed a directed graph of TLR4 and its principal associated signalling pathways (including MyD88 dependent and independent signalling pathways, PI3K-AKT-mTOR pathway, and the associated principal crosstalks). The complete logical graph (Appendix 1) is composed of 61 nodes and 86 edges defining the signal transduction relations between nodes. Initial values of entities as well as tuned edges associated p_{ij} and q_{ij} parameters are deducted from underlying mechanisms described in scientific papers. Logical graphs are produced in GraphML (XML-based file format for graphs) file format via the graph editor yEd (https://www.yworks.com/products/yed, version 3.14.14) and with the support of the graphical ontology presented in Appendix 2.

The tool developped for the computing and the simulations of the logical model is publicly available on GitHub (`https://github.com/nodys/logml`, distributed under the MIT License).

Engagement of TLR4

The induction of inflammatory response by LPS begins with the combined action of four endotoxin binding proteins: LPS-binding protein (LBP), CD14, myeloid

differentiation protein 2 (MD-2) and TLR4 (Figure 2)[20]. First, LBP interacts with bacterial membranes and leads to the transfer of monomers to CD14, which in turn transmit LPS monomers to MD-2:TLR4 heterodimers [21]. The binding of LPS to TLR4 is followed by the dimerization of the receptor and promotes the recruitment of different TIR domains-containing adapter proteins, on which will depend downstream signalling pathways [22].

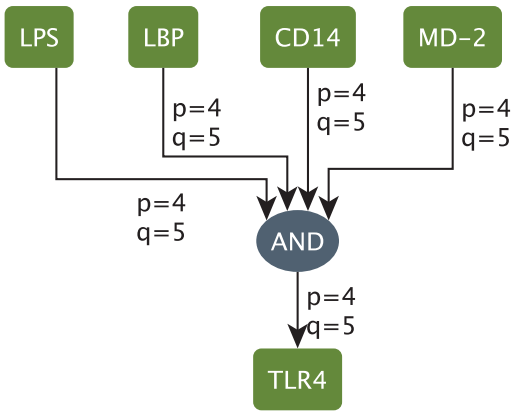


Figure 2 Engagement of TLR4. Overview of TLR4 signalling engagement by LPS. Green nodes represent the entities introduced in the logical graph. The dark blue node represent the logical operator defining the relation established between nodes. Nodes are annotated with the corresponding initial conditions. Edges are annotated with the corresponding reactivity (p) and weakening (q) parameters initial values.

Historically, TLR4 signalling is split in two different pathways depending if the protein MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) is recruited by the receptor [23]: TLR4 MyD88-dependent and MyD88-independent pathway. Recently, the research concerning the TLR4 signalling pathway suggest that TLR signals lead to activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) [24], affecting many aspects of the cellular response, including regulation of the inflammatory response.

MyD88-dependent signalling pathway

Following engagement of TLR4, the intracellular Toll-Interleukin 1 Receptor (TIR) domain associates with TIRAP at the cytoplasmic side of the plasma membrane (Figure 3)[25].

The phosphorylation of TIRAP (mediated by Bruton's tyrosine kinase (BTK)) leads to MyD88 binding to the activated receptor and the formation of a myddosome. This myddosome results in association and activation by autophosphorylation of IRAK4 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 4) [26, 27].

IRAK1 and IRAK2 are then recruited to the myddosome through binding with IRAK4 [28, 29] and are responsible for TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6)

oligomerization [30]. TRAF6 is then subjected to an auto-ubiquitination after its oligomerization and associates with ubiquitin receptors of TAK1 (TGF-β-Activated Kinase-1) [31, 32], leading to activation of the TAK1 kinase complex [33].

Activation of JNKs (c-Jun N-terminal kinases) is mediated by TAK1 which phosphorylates two dual specificity enzymes MKK4 (MAPK kinase 4) and MKK7 (MAPK kinase 7) [34]. Phosphorylation of MKK4 and MKK7 by TAK1 [35] leads to multiple phosphorylations of each JNK. Once activated, JNK phosphorylates a range of nuclear substrates, including transcription factor c-Jun which is translocated to the nucleus and participate with c-Fos to the formation of AP-1 complex [36]. TAK1 is also responsible for the activation of p38 complexes by phosphorylating two dual specificity enzymes MKK3 (MAPK kinase 3) and MKK6 (MAPK kinase 6). In turn, p38 enzymes phosphorylates a range of nuclear substrates, including c-Jun [36]. Additionally, TAK1 also recruit and activate the IκB kinase (IKK) complex. IKK complex is considered as the master regulator for the activation of NF-κB [37]. Activation of the IKK leads to the IκBα (NF-kappa-B inhibitor alpha) phosphorylation and degradation by the proteasome [37]. NF-κB, which under physiological conditions is maintained in an inactive state in the cytosol by IκBα, is then released and can translocate to the nucleus to induce, in conjuction with AP-1, the expression of target genes including TNFα or pro-IL-1β.

MyD88-independent signalling pathway

MyD88-independent signalling pathway (also named TRIF-dependent) needs TRIF-related adaptor molecule (TRAM) and TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β (TRIF) [38]. Following CD14-induced TLR4 internalization into endosomes [39], TRAM is thought to bridge between activated TLR4 and TRIF [40]. These two adapters favor the binding of TRAF3 to the receptor and its activation [41]. It is followed by the activation of TANK-binding kinase 1 (TBK1) and IκB kinase-ϵ (IKKϵ) [42], which induces phosphorylation of interferon regulatory factor 3 and 7 (IRF3 and IRF7) [43]. Phosphorylated IRF3/IRF7 binds the interferon sensitive response element (ISRE) and induces the production of type 1 interferons such as IFNβ (Figure 4).

PI3K-Akt-mTOR signalling pathway

Although the exact mechanism remains unclear, an increasing number of studies indicate that TLR4 signals lead to activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) [24, 44, 45, 46]. Once activated and phosphorylated, PI3K leads to increased concentrations of phosphatidylinositol-4,5-trisphosphate to the membrane, contributing to recruitment of PDK1 (phosphoinositide dependent protein kinase-1) (Figure 6). AKT is then recruited to the cell membrane and is followed by its double phosphorylation by PDK1 and by the mTORC2 complex [47]. Once fully activated, AKT phosphorylates and inhibits TSC2, a suppressor of the mTOR kinase pathway. Inhibition of TSC2 by AKT leads to an accumulation of GTP:RHEB instead of GDP:RHEB complex, which in turn, activates the mTORC1 complex [47, 48]. Full activated AKT can also phosphorylate and partially inactivate GSK3-β [49, 50]. Inactivation of GSK3-β promotes increased nuclear levels of CREB [51] which takes the place of NF-κB from the co-activator of transcription CBP. CBP

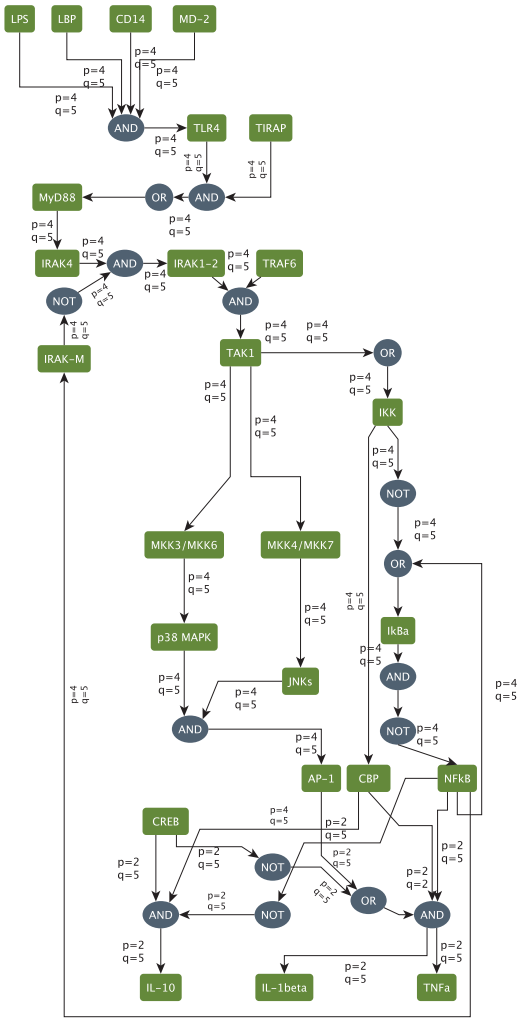


Figure 3 MyD88-dependent TLR4 signalling pathway. Overview of the MyD88-dependent TLR4 signalling pathway. Green nodes represent the entities introduced in the logical graph. The dark blue nodes represent the logical operators defining the relation established between nodes. Nodes are annotated with the corresponding initial conditions. Edges are annotated with the corresponding reactivity (p) and weakening (q) parameters initial values. Edges identifying processes considered fast, such as protein phosphorylation, have a reactivity parameter value $p = 4$. Others edges, on the contrary, represent processes considered slow, such as transcription and translation of a protein, and have a reactivity parameter value $p = 2$.

plays the role of limiting factor (Figure 5). The enhanced transcriptional activity of CREB and reduced transcriptional activity of NF-κB result in increased IL-10

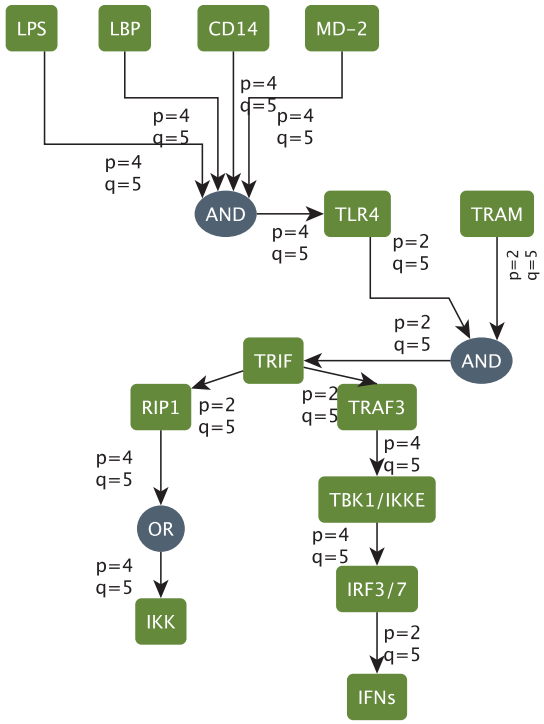


Figure 4 MyD88-independent TLR4 signalling pathway. Overview of the MyD88-independent TLR4 signalling pathway. Green nodes represent the entities introduced in the logical graph. The dark blue nodes represent the logical operators defining the relation established between nodes. Nodes are annotated with the corresponding initial conditions. Edges are annotated with the corresponding reactivity (p) and weakening (q) parameters initial values. Edges identifying processes considered fast, such as protein phosphorylation, have a reactivity parameter value $p = 4$. Others edges, on the contrary, represent processes considered slow, such as internalization of a receptor, and have a reactivity parameter value $p = 2$.

production while concurrently suppressing the levels of pro-inflammatory cytokines [52].

As discussed previously, AKT can inhibit GSK3-β activity indirectly through mTORC1. However activated mTORC1 phosphorylates and activates S6K [53, 54], leading to the phosphorylation and inhibition of GSK3 [55], which promotes increased nuclear levels of CREB. Inhibition of mTORC1 with rapamycin is known to attenuate phosphorylation of GSK3 [53, 56, 57], increasing NF-κB activation, and consequently pro-inflammatory cytokines production.

Cytokines signalling loops

Once secreted, cytokines operate by an autocrine (when a cell secretes a chemical messenger that binds to receptors on the same cell, leading to changes in the cell)

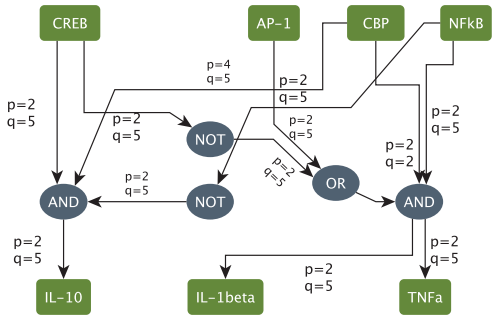


Figure 5 CREB, CBP and NFκB transcription regulators. Overview of the principal TLR4 signalling pathway transcription regulators. Green nodes represent the entities introduced in the logical graph. The dark blue nodes represent the logical operators defining the relation established between nodes. Nodes are annotated with the corresponding initial conditions. Edges are annotated with the corresponding reactivity (p) and weakening (q) parameters initial values.

and a paracrine (when a cell produces a signal to induce changes in nearby cells) signalling pathway [58].

Type-I IFN signalling loop Once secreted, type-I IFNs binds to type-I receptors, inducing their activation and the corresponding intracellular transduction signal. The type-I IFN receptor is composed of two distinct subunits: IFNAR1 and IFNAR2 [59]. IFNAR1 subunit is associated with TYK2 (Tyrosine Kinase-2) and IFNAR2 is associated with JAK1 [60]. The binding of type-I IFNs to the Type-I IFN receptor results in the rapid autophosphorylation and activation of the receptor associated JAKs. In turn, activated TYK2 and JAK1 regulate the phosphorylation and activation of STATs proteins. After phosphorylation by JAKs, activated STATs form homodimers (or heterodimers) and migrate to the nucleus in order to initiate transcription and release of STATs and SOCS proteins (SOCS1 and SOCS3) [61].

IL-1β signalling loop IL-1β is an important pro-inflammatory cytokine produced as a precursor (pro-IL-1β) that is cleaved by ICE (IL-1β Converting Enzyme) to the active IL-1β form that is secreted [62]. Once secreted by activated immune cells such as macrophages, IL-1β induces cellular response through its receptor [59]. Binding of IL-1 to respective receptor leads to the activation of the transcription factor NF-κB through a classical MyD88-dependent signalling pathway [63].

TNFα signalling loop TNFα is probably one of the best known and studied pro-inflammatory cytokines secreted by immune cells following LPS stimulation. TNFα is known to bind to the extracellular domain of TNFR1 [64, 65]. TNF receptor-associated death domain (TRADD) is then recruited to the intracellular domain of TNFR1, followed by two additional adaptor proteins: Receptor Interacting Protein-1 (RIP1) and TNFR-Associated Factor 2 (TRAF2). RIP1 leads to recruitment of TAK1 and the consecutive activation of the IKK downstream.

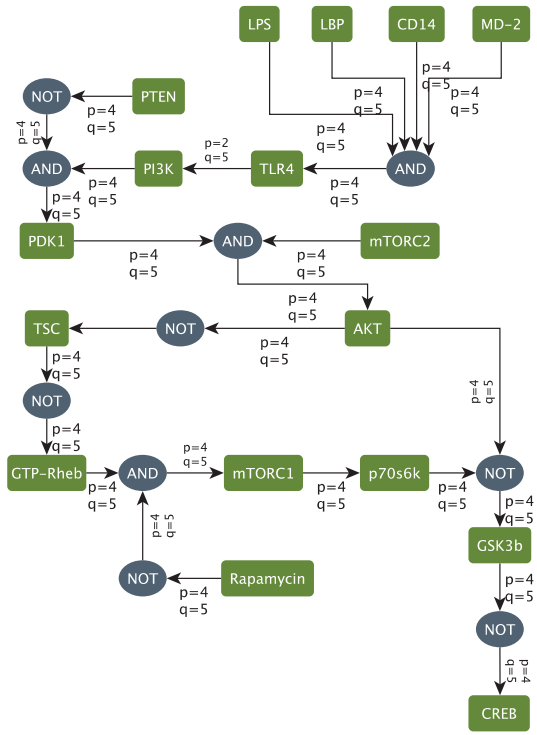


Figure 6 PI3K-Akt-mTOR signalling pathway. Overview of the PI3K-Akt-mTOR signalling pathway. Green nodes represent the entities introduced in the logical graph. The dark blue nodes represent the logical operators defining the relation established between nodes. Nodes are annotated with the corresponding initial conditions. Edges are annotated with the corresponding reactivity (p) and weakening (q) parameters initial values. Edges identifying processes considered fast, such as protein phosphorylation, have a reactivity parameter value $p = 4$. Others edges, on the contrary, represent processes considered slow, such as transcription and translation of a protein, and have a reactivity parameter value $p = 2$.

IL-10 signalling loop Interleukin 10 (IL-10) is a cytokine with important immunoregulatory functions [66], principally known for its potent anti-inflammatory properties [67]. Production of IL-10 leads to the repression of the expression of pro-inflammatory cytokines such as TNFα, IL-1β or IL-12 by activated macrophages or dendritic cells. Binding of IL-10 to its receptor activates phosphorylation of the receptor-associated JAK1 and TYK2. Once phosphorylated, these kinases act as temporary docking sites for STAT3. In turn, STAT3 is phosphorylated by the receptor associated JAKs and migrates to the nucleus leading to the transcription of IL-10-responsive genes [68]. Among IL-10 responsive genes, SOCS3 is a member of a newly identified family of genes that inhibit JAK/STAT-dependent signalling [69].

Negative regulators of TLR4 signalling pathway introduced in this paper

SOCS proteins As their name suggests, suppressor of cytokine signalling (SOCS) proteins are inhibitors of cytokine signalling pathways [70, 71]. Principal role of SOCS proteins is to inhibit JAK/STAT-dependent signalling. TLR ligands, such as LPS, are potent inducers of SOCS1 and SOCS3 [72, 73]. Once secreted, SOCS1 binds to NF-κB and facilitates its ubiquitination [74]. SOCS1 can also binds to TIRAP, through its interaction with BTK and induces its ubiquitination, thereby leading to the suppression of Myd88-dependent transactivation of NF-κB [75].

SOCS3 is a key regulator of Il-10 signalling following TLR stimulation [72] and is one of the most abundantly induced proteins in macrophages following stimulation with LPS. SOCS3 inhibits TLR4 signal transduction by preventing ubiquitination of TRAF6, thus impeding association and activation of TAK1 [76].

IRAK-M The kinase-inactive IRAK family member (IRAK-M) [77] is an inactive IRAK homologue whose expression is induced after TLR4 stimulation by microbial products such as LPS [78, 79]. IRAK-M inhibits the dissociation of IRAK4 from the TLR [80], thus stopping downstream of TRAF6 and inhibiting the release of NF-κB.

IκBs proteins IκB proteins main function is to inhibit NF-κB activity when it is not required. This inhibition happens via protein-protein interaction taking place between IκB proteins and NF-κB in the cytosol [81], preventing NF-κB from migration to the nucleus. Thus NF-κB is kept in an inactive form in the cytosol [82]. It should be noted that NF-κB activation is rapidly followed by an induction of IκBs proteins.

Experimental design

To investigate biological observations identified in literature, we used the logical graph (presented in annexe 1) and the *Logml* framework to simulate *in silico* experiments.

We first studied how the model behaves according to different single doses of LPS stimuli. In a second phase, we simulated the effect of repeated doses of LPS. Finally, we focused on the role played by the mTOR signalling pathway in the regulation of the cellular response following LPS infusion via the use of rapamycin, a well known mTOR complex inhibitor.

For each scenario, we focused on the resulting balance between pro- and anti-inflammatory cytokines in response to LPS. To perform these *in silico* experiments, we introduced a different type of nodes representative of experimental processes such as "Infusion of LPS", or "Infusion of Rapamycin". These special nodes were then perturbed according to the experimental design of each scenario. As can be seen from the figure 7, the signal is transmitted to the target nodes (LPS and Rapamycin) with the minimal reactivity parameter value ($p = 1$) in order to take into account LPS and Rapamycin infusion kinetics, that are slower processes compared with intracellular transduction signals.

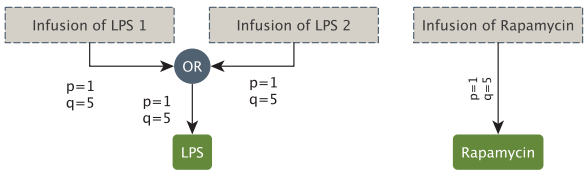


Figure 7 Experimental processes nodes. Overview of the experimental processes nodes: infusion of LPS (1 & 2) and infusion of Ramapycin. Green nodes represent the targeted entities. Experimental processes nodes (in grey) are annotated with the initial conditions (v_0) and the perturbation informations (pwd and int). Edges are annotated with reactivity ($p = 1$) and weakening ($q = 5$) parameters values according to drug kinetics.

Results

Stimulation of TLR4 with single doses of LPS

We started by the study of the model behavior by varying the intensity and the duration of exposure to LPS. In a first scenario, we simulated the infusion of an intermediate dose of LPS (with $pwd = 3$) for a short time exposition ($int = 0, 20$). The dose was then increased to the maximum level ($pwd = 5$) with the same duration of exposure ($int = 0, 20$). We then increased the duration of LPS infusion to fifty iterations ($int = 0, 50$). Finally, we simulated a continuous infusion of LPS ($int = 0, 100$). The corresponding results are presented in figure 8. We focused on the activation level of four entities: IL-10, IL-1β, LPS and NFκB.

In the first simulation, we can observe an increase of LPS to the value of 0.6 until the twentieth iteration before rapidly declining to zero. Increase of LPS is followed by a quick activation of NFκB and the successive production of the cytokines IL-1β and IL-10. Decrease of LPS is followed by a slow decrease of NFκB activity and a contrasting quick decrease of cytokines levels. All entities return to their initial value before the end of the run. The results obtained with the second simulation are similar to the first one except the maximal reached values: we can observe an increase of LPS to the value of 1.0, with higher peaks levels for NFκB, IL-1β and IL-10. For the third run, we simulated a longer infusion of LPS (until fiftieth iteration). Although the maximum reached value is the same, NFκB and IL-10 entities remain activated longer than in previous simulation. Regarding IL-1β, two different phases can be observed. We can see a first important increase of IL-1β following LPS stimulus, comparable to what can be observed in the precedent run, and a consecutive decrease of IL-1β production until lower levels before returning to a value of zero. We finally simulated a continuous infusion of LPS. We can see in the graph that all the entities have the same behavior than in simulation three, except than instead returning to a initial value of zero, they reach a steady state leading to a continuous activation of NFκB, and a continuous release of IL-10 and IL-1β cytokines.

Multiple doses of LPS

We studied the response of the logical model of TLR4 to repeated doses of LPS by simulating the administration of two identical doses of LPS ($pwd = 5$) while varying

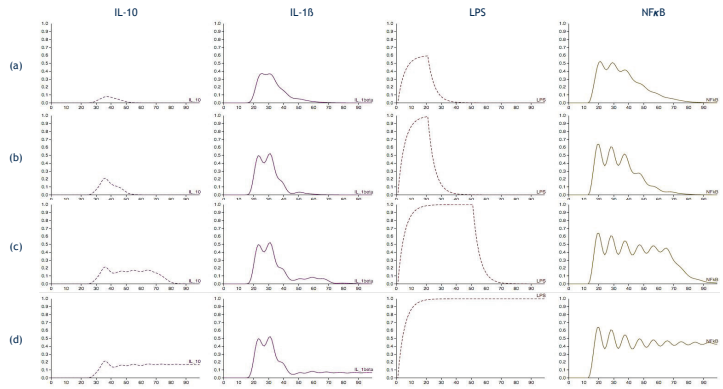


Figure 8 Response of TLR4 signalling cascade following intensities and durations of LPS doses. IL-10 and IL-1β cytokine production and NF-κB activation according to different doses of LPS: (a) single infusion of LPS with intermediate intensity ($pwd = 3$) and from the 0 to the twentieth iteration ($int = 0, 20$); (b) single infusion of LPS with maximum intensity ($pwd = 5$) and from the 0 to the twentieth iteration ($int = 0, 20$); (c) single infusion of LPS with maximum intensity ($pwd = 5$) and from the 0 to the fiftieth iteration ($int = 0, 50$); (d) continuous infusion of LPS ($int = 0, 100$) with maximum intensity ($pwd = 5$).

time intervals between infusions. For the first run, we simulated two successive doses of endotoxin. For the other three runs, we left successively ten, twenty and thirty iterations between doses. The corresponding results are presented in figure 9. As for the previous scenario, we focused on four entities: IL-10, IL-1β, LPS and NFκB.

In the first simulation, results are very similar to those observed during the third run of the first scenario. NFκB and IL-10 entities remain activated longer than for a single infusion. Regarding IL-1β, we can distinguish two phases: a first important increase of IL-1β and a consecutive decrease of IL-1β production until lower levels before returning to a value of zero. For the second run, two phases can be distinguished for each entity. Whereas the two LPS stimuli are identical, we obtained two different responses signals for each entity. The first signal is similar to the response observed after a single dose of LPS while the second signal, in response to the second stimulus, seems weakened. The results of the third and the fourth runs show that the more we increase the intervals between doses, the more the second response is approaching those expected for a single injection.

Additional analyses were conducted to identify the role played by IRAK-M in the reduction of pro-inflammatory response. As presented in figure 10, we displayed the activation levels of IRAK-M and IRAK1/2 during the first and the third run of the present scenario. The results show that a short interval between doses contributes in maintaining high levels of IRAK-M, thus reducing IRAK1/2 activity and the consecutive MyD88 dependent downstream.

Single dose of LPS and treatment with Rapamycin

In this section, we studied the impact of an inhibition of mTOR onto the logical model response to a same LPS infusion ($pwd = 5$, $int = 20, 40$). We simulated first

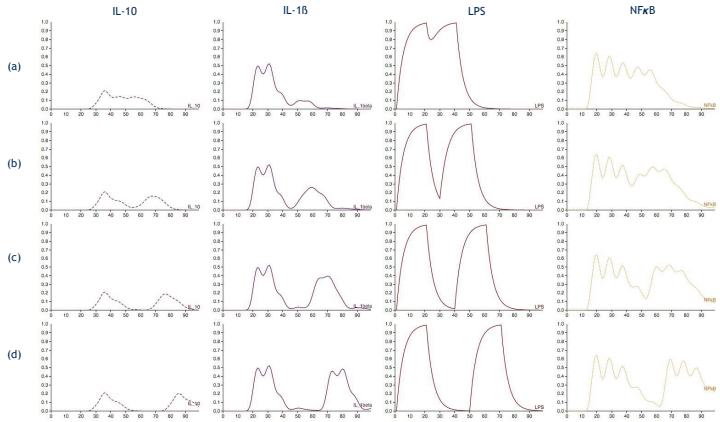


Figure 9 Response of TLR4 following repeated doses of LPS. IL-10 and IL-1β cytokine production and NF-κB activation depending on intervals between two identical doses of LPS: (a) two infusions of LPS with maximum intensity ($pwd = 5$), from the 0 to the twentieth iteration ($int = 0, 20$) for the first dose, and from the twentieth to the fortieth ($int = 20, 40$) for the second dose; (b) two infusions of LPS with maximum intensity ($pwd = 5$), from the 0 to the twentieth iteration ($int = 0, 20$) for the first dose, and from the thirtieth to the fiftieth ($int = 30, 50$) for the second dose; (c) two infusions of LPS with maximum intensity ($pwd = 5$), from the 0 to the twentieth iteration ($int = 0, 20$) for the first dose, and from the fortieth to the sixtieth ($int = 40, 60$) for the second dose; (d) two infusions of LPS with maximum intensity ($pwd = 5$), from the 0 to the twentieth iteration ($int = 0, 20$) for the first dose, and from the fiftieth to the seventieth ($int = 50, 70$) for the second dose.

the administration of a single dose of LPS and without infusion of Rapamycin, a mTOR inhibitor. For the second run, an infusion of Rapamycin ($pwd = 5$) was introduced between the zero and the twentieth iteration. For the third simulation, an infusion of Rapamycin was introduced between the thirtieth and the sixtieth iteration. For the fourth run, we proceeded to an infusion of Rapamycin between the fiftieth and the hundredth iteration. For the last run, we simulated a continuous infusion of Ramapycin. The corresponding results are presented in figure 11. We focused on five entities: IL-10, IL-1β, LPS, Rapamycin and NFκB.

For the first simulation, results are identical to those observed during the second run of the first scenario except for the start of LPS infusion, and consequently for the start of observed responses. For the second run, we can see that the pre-treatment with Rapamycin do not have any impact on the response of the logical model to the LPS stimulus. For the third run, important changes can be observed in response to the LPS stimulus. We can see significant increase of the activation of NFκb, as well as an important production of IL1β while levels of IL-10 are almost undetectable. For the fourth run, we have the response levels observed for each entity during the first two runs. Infusion of Rapamycin between the fiftieth and the hundredth iteration do not seem to affect the response to endotoxin. For the last run, the results observed are the same than for the third simulation. We have high levels of NFκB activation, with associated high levels of produced IL-1β, and undetectable amounts of IL-10.

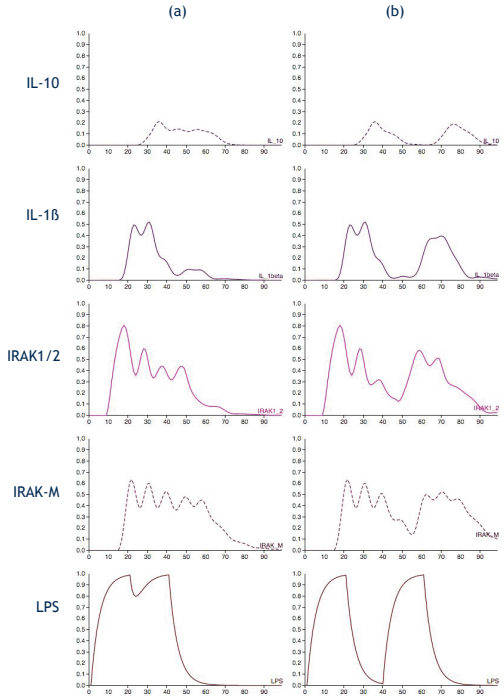


Figure 10 Inactivation of IRAK1/2 after multiple doses of LPS. IL-10 and IL-1β cytokine production, IRAK1/2 and IRAK-M activation depending on intervals between two identical doses of LPS: (a) two infusions of LPS with maximum intensity ($pwd = 5$), from the 0 to the twentieth iteration ($int = 0, 20$) for the first dose, and from the twentieth to the fortieth ($int = 20, 40$) for the second dose; (b) two infusions of LPS with maximum intensity ($pwd = 5$), from the 0 to the twentieth iteration ($int = 0, 20$) for the first dose, and from the fortieth to the sixtieth ($int = 40, 60$) for the second dose.

As presented in figure 12, we conducted additional analyses to observe responses of CREB, NFκB and CBP transcription factors following an inhibition of mTOR signalling pathway. We displayed the activation levels of CREB, NFκB and CBP during the first and the third run of the present scenario. The results show that the inhibition of mTOR pathway by Rapamycin results in a important reduction of CREB, and consequently, an inhibition of IL-10. We also note a rise of CBP and NFκB nuclear levels after mTOR inhibition, and an increase of IL-1β production.

Discussion

Single dose of LPS

In the first scenario, we reproduced *in silico* different types of infections by varying the intensity and the duration of exposure to a single dose of LPS. The results obtained for the first two runs (figure 8) show that the amount of released cytokines is related to the amount of injected LPS. The higher the dose of LPS is injected, the more important levels of IL-1β and IL-10 cytokines are produced. For the third

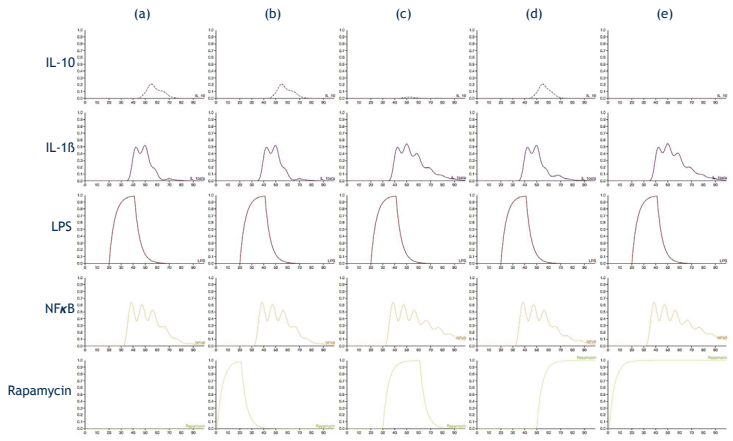


Figure 11 Response of TLR4 following inhibition of mTOR signalling pathway. IL-10 and IL-1β cytokine production and activation of NF-κB in response to an unique LPS stimulus ($pwd = 5$, $int = 20, 40$) and to different infusions of Rapamycin: (a) without infusion of Rapamycin; (b) infusion of Rapamycin from the 0 to the twentieth iteration ($int = 0, 20$); (c) infusion of Rapamycin from the thirtieth to the sixtieth iteration ($int = 30, 60$); (d) infusion of Rapamycin from the fiftieth to the hundredth iteration ($int = 50, 100$) ;(e) continuous infusion of Rapamycin ($int = 0, 100$). All the perturbations are made with the maximum intensity ($pwd = 5$).

run, we kept a maximal dose infusion while multiplying by 2.5 the duration of LPS infusion. As expected, the transcription factor NFκB remains activated longer than in the two previous runs. Similarly, and while having identical peak levels, the production of IL-10 extends over an protracted period of time (about 2.5 times that of the previous run). Interestingly, although the duration of the release of IL-1β is similar to that of IL-10, its peak describes two distinct phases. A first acute phase, similar to that observed in the second run and an attenuated second phase continuing until the end of the stimulus. This biphasic response can be explained by the "ménage à trois" occuring between the co-activator CBP and the transcription factors CREB and NFκB (Figure 5). As explained previously, the enhanced activity of nuclear levels of CREB [51] following LPS stimulation move NF-κB from the co-activator of transcription CBP. The enhanced transcriptional activity of CREB result in an increased IL-10 production while concomitantly reducing consequently the levels of pro-inflammatory cytokines [83]. For the first three runs, all entities return to their original state at the end of the stimulus. Finally, for the last run, we analyzed the response of the model to a continuous infusion of LPS such as under an unresolved infection to gram negative bacterias. The transcription factor NFκB remains activated at elevated levels throughout LPS infusion. Despite being produced at lower levels, IL-1β and IL-10 are secreted continuously. The system is out of control, and we discern what is commonly described in the literature as a "citokine storm".

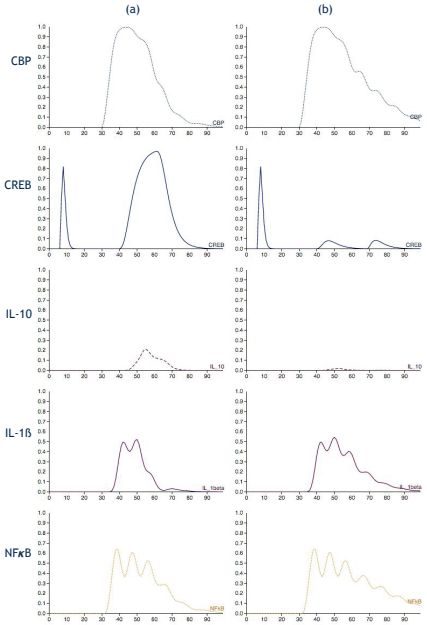


Figure 12 Activation of CREB, NFκB and CBP transcription factors to an inhibition of mTOR signalling pathway. IL-10, IL-1β cytokines production and CREB, NF-κB and CBP activation in response to an unique LPS stimulus ($pwd = 5$, $int = 20, 40$) and to different infusions of Rapamycin: (a) without infusion of Rapamycin; (b) infusion of Rapamycin from the thirtieth to the sixtieth iteration ($int = 30, 60$). All the perturbations are made with the maximum intensity ($pwd = 5$).

Multiple doses of LPS

The aim of the second scenario was to mimic multiple infections by using repeated infusions of LPS. We explored the response of the logical model following two identical doses of LPS separated by different intervals. The simulation results presented in figure 9 show a significant reduction in the pro-inflammatory capacity of innate immune cells to a second endotoxin challenge. It can be observed that more the injected doses are spaced, the less the effect of the attenuation of the pro-inflammatory response is observable. This phenomenon, called endotoxin tolerance, was well described and analysed in numerous papers during the two past decades [84]. In our model, the crosstalk responsible for endotoxin tolerance is IRAK-M. As presented in the figure 10, this negative regulator participates in the reduction of the TLR4 pro-inflammatory response by partially inactivating IRAK1/2, a principal component of MyD88 dependent pathway. These results are consistent with those observed in literature [78, 85, 86].

mTOR inhibition during LPS challenge

In the last scenario, we investigated the role of mTOR signalling in the regulation of TLR4 response to a LPS challenge. Results shown on figure 11 depict the balance

between pro- and anti-inflammatory cytokines depending on how Rapamycin was administrated. Interestingly, we can first note that contrary to what is presented in literature [87], a pre-treatment with Rapamycin (before LPS injection) do not produce any effect on cytokines production in response to LPS challenge. The differences observed between *in silico* and *in vivo* experiments can be explained by a possible delay due to the penetration of the Rapamycin molecule into the body, which is not taken into account in the model. Another possible explanation is that there may remain knowledge gaps concerning the interactions between mTOR and the rest of the TLR4 canonical pathway.

In contrast, when Rapamycin is injected during the inflammatory response, we can observe a quasi inhibition of IL-10 production, and an increase of excreted pro-inflammatory cytokines, suggesting the occurrence of a disproportionate inflammatory response.

As presented in figures 11 and 12, the inhibition of mTOR pathway by Rapamycin results in a drastic reduction of CREB nuclear levels, and consequently, an inhibition of IL-10. Although it does not directly influence the production of pro-inflammatory cytokines, the inhibition of the mTOR pathway is followed by a significant increase in production of IL-1β that can be explained by the replacement of CREB by NFκB from the co-activator of transcription CBP.

These results, concurring with current research [83, 88, 89], suggest that dysregulation of the mTOR pathway may lead to an imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines, and precipitate the disruption of immune homeostasis.

Conclusion

We used extended Boolean approaches to explore *in silico* the different facets of the regulation of the inflammatory response following the activation of TLR4 by LPS. The response of the model is therefore affected according to the intensity, the magnitude and the schedule of endotoxin dose administration.

Our work provides insight into the central role played by the mTOR signalling pathway in the regulation of the "ménage à trois" composed by the CBP, CREB and NFκB transcription factors. As emerging in scientific literature in the past decade, the combined activity of mTOR complex and GSK3β play a central role in the modulation of the inflammatory response, notably by regulating IL-10 production.

Together, these results suggest that the logical modelling framework developed during this study and the logical model presented in this work can be used to reproduce most of the observations presented in scientific literature. Since the logical model of TLR4 signalling is based on the knowledge extracted from scientific papers and knowledge databases, it can easily be completed according to new scientific discoveries. Although the obtained curves are continuous due to the use of fuzzy operators, they are not quantitative. Account must be taken of the fact that k represents the iterations performed during simulations, not the time. The goal of this logical modelling approach was to visualize sequences of events linked by causal connections.

These results open perspectives for novel therapeutic applications by targeting mTOR immune regulatory functions. Ultimately, only further research including multidisciplinary studies and wet lab experiments will clarify the significance of these *in silico* observations.

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests regarding this study.

Author's contributions
CMS, MT, FG, and JPB designed the study. CMS and JPB developed the methodology. CMS, JP and JW developed the logical modelling framework. CMS performed the analysis. CMS wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements
The authors thank the reviewers for their valuable comments and suggestions. This study has been funded by Novadiscovery SAS.

Author details
[1]Novadiscovery, (http://www.novadiscovery.com), 60 avenue Rockefeller, 69008 Lyon, France. [2]UMR CNRS 5558 Biometry and Evolutionary Biology Laboratory, (https://lbbe.univ-lyon1.fr/), Villeurbanne, France. [3] EMR UCBL/HCL 3738, Faculté de médecine Lyon Sud, Université Lyon 1, Lyon, France.

References

1. Mogensen, T.H.: Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. Clin. Microbiol. Rev. **22**(2), 240–273 (2009)
2. Kawai, T., Akira, S.: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat. Immunol. **11**(5), 373–384 (2010)
3. Kawai, T., Akira, S.: Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity **34**(5), 637–650 (2011)
4. Moresco, E.M., LaVine, D., Beutler, B.: Toll-like receptors. Curr. Biol. **21**(13), 488–493 (2011)
5. Konner, A.C., Bruning, J.C.: Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. Trends Endocrinol. Metab. **22**(1), 16–23 (2011)
6. Lim, K.H., Staudt, L.M.: Toll-like receptor signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(1), 011247 (2013)
7. Takeda, K., Akira, S.: Toll-like receptors in innate immunity. Int. Immunol. **17**(1), 1–14 (2005)
8. Hotchkiss, R.S., Karl, I.E.: The pathophysiology and treatment of sepsis. N. Engl. J. Med. **348**(2), 138–150 (2003)
9. Nduka, O.O., Parrillo, J.E.: The pathophysiology of septic shock. Crit Care Nurs Clin North Am **23**(1), 41–66 (2011)
10. Annane, D., Bellissant, E., Cavaillon, J.M.: Septic shock. Lancet **365**(9453), 63–78 (2005)
11. Martin, G.S., Mannino, D.M., Eaton, S., Moss, M.: The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N. Engl. J. Med. **348**(16), 1546–1554 (2003)
12. Liew, F.Y., Xu, D., Brint, E.K., O'Neill, L.A.: Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. Nat. Rev. Immunol. **5**(6), 446–458 (2005)
13. Kondo, T., Kawai, T., Akira, S.: Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. Trends Immunol. **33**(9), 449–458 (2012)
14. Miggin, S.M., O'Neill, L.A.: New insights into the regulation of TLR signaling. J. Leukoc. Biol. **80**(2), 220–226 (2006)
15. Monteiro Sousa, C., Boissel, J.P., Gueyffier, F., Olivera-Botello, G.: Comparative transcriptomic analysis between an artificially induced SIRS in healthy individuals and spontaneous sepsis. C. R. Biol. **338**(10), 635–642 (2015)
16. Poret, A., Sousa, C.M., Boissel, J.-P.: Enhancing boolean networks with fuzzy operators and edge tuning. arXiv:1407.1135 (2014)
17. Thomas, R., D'Ari, R.: Biological Feedback. Taylor & Francis, CRC Press, Inc., 2000 Corporate Blvd., N.W., Boca Raton, Florida 33431. (1990)
18. Croft, D., Mundo, A.F., Haw, R., Milacic, M., Weiser, J., Wu, G., Caudy, M., Garapati, P., Gillespie, M., Kamdar, M.R., Jassal, B., Jupe, S., Matthews, L., May, B., Palatnik, S., Rothfels, K., Shamovsky, V., Song, H., Williams, M., Birney, E., Hermjakob, H., Stein, L., D'Eustachio, P.: The Reactome pathway knowledgebase. Nucleic Acids Res. **42**(Database issue), 472–477 (2014)
19. Tanabe, M., Kanehisa, M.: Using the KEGG database resource. Curr Protoc Bioinformatics **Chapter 1**, 1–12 (2012)
20. Lonez, C., Lensink, M.F., Vandenbranden, M., Ruysschaert, J.M.: Cationic lipids activate cellular cascades. Which receptors are involved? Biochim. Biophys. Acta **1790**(6), 425–430 (2009)
21. Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C., Golenbock, D.T.: Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. Microbes Infect. **6**(15), 1361–1367 (2004)
22. Lu, Y.C., Yeh, W.C., Ohashi, P.S.: LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine **42**(2), 145–151 (2008)
23. Akira, S.: Toll-like receptor signaling. J. Biol. Chem. **278**(40), 38105–38108 (2003)
24. Siegemund, S., Sauer, K.: Balancing pro- and anti-inflammatory TLR4 signaling. Nat. Immunol. **13**(11), 1031–1033 (2012)
25. Nunez Miguel, R., Wong, J., Westoll, J.F., Brooks, H.J., O'Neill, L.A., Gay, N.J., Bryant, C.E., Monie, T.P.: A dimer of the Toll-like receptor 4 cytoplasmic domain provides a specific scaffold for the recruitment of signalling adaptor proteins. PLoS ONE **2**(8), 788 (2007)
26. Motshwene, P.G., Moncrieffe, M.C., Grossmann, J.G., Kao, C., Ayaluru, M., Sandercock, A.M., Robinson, C.V., Latz, E., Gay, N.J.: An oligomeric signaling platform formed by the Toll-like receptor signal transducers MyD88 and IRAK-4. J. Biol. Chem. **284**(37), 25404–25411 (2009)
27. Gay, N.J., Gangloff, M., O'Neill, L.A.: What the Myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity. Trends Immunol. **32**(3), 104–109 (2011)
28. Lin, S.C., Lo, Y.C., Wu, H.: Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. Nature **465**(7300), 885–890 (2010)

29. Kawagoe, T., Sato, S., Matsushita, K., Kato, H., Matsui, K., Kumagai, Y., Saitoh, T., Kawai, T., Takeuchi, O., Akira, S.: Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. Nat. Immunol. **9**(6), 684–691 (2008)
30. Keating, S.E., Maloney, G.M., Moran, E.M., Bowie, A.G.: IRAK-2 participates in multiple toll-like receptor signaling pathways to NFkappaB via activation of TRAF6 ubiquitination. J. Biol. Chem. **282**(46), 33435–33443 (2007)
31. Xia, Z.P., Sun, L., Chen, X., Pineda, G., Jiang, X., Adhikari, A., Zeng, W., Chen, Z.J.: Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. Nature **461**(7260), 114–119 (2009)
32. Kulathu, Y., Akutsu, M., Bremm, A., Hofmann, K., Komander, D.: Two-sided ubiquitin binding explains specificity of the TAB2 NZF domain. Nat. Struct. Mol. Biol. **16**(12), 1328–1330 (2009)
33. Lamothe, B., Besse, A., Campos, A.D., Webster, W.K., Wu, H., Darnay, B.G.: Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I kappa B kinase activation. J. Biol. Chem. **282**(6), 4102–4112 (2007)
34. Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J., Chen, Z.J.: TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. Nature **412**(6844), 346–351 (2001)
35. Fleming, Y., Armstrong, C.G., Morrice, N., Paterson, A., Goedert, M., Cohen, P.: Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7. Biochem. J. **352 Pt 1**, 145–154 (2000)
36. Banerjee, A., Gerondakis, S.: Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system. Immunol. Cell Biol. **85**(6), 420–424 (2007)
37. Solt, L.A., Madge, L.A., May, M.J.: NEMO-binding domains of both IKKalpha and IKKbeta regulate IkappaB kinase complex assembly and classical NF-kappaB activation. J. Biol. Chem. **284**(40), 27596–27608 (2009)
38. Kagan, J.C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., Medzhitov, R.: TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. Nat. Immunol. **9**(4), 361–368 (2008)
39. Zanoni, I., Ostuni, R., Marek, L.R., Barresi, S., Barbalat, R., Barton, G.M., Granucci, F., Kagan, J.C.: CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. Cell **147**(4), 868–880 (2011)
40. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S.: TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. Nat. Immunol. **4**(11), 1144–1150 (2003)
41. Tseng, P.H., Matsuzawa, A., Zhang, W., Mino, T., Vignali, D.A., Karin, M.: Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. Nat. Immunol. **11**(1), 70–75 (2010)
42. Hacker, H., Tseng, P.H., Karin, M.: Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator. Nat. Rev. Immunol. **11**(7), 457–468 (2011)
43. Moynagh, P.N.: TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. Trends Immunol. **26**(9), 469–476 (2005)
44. Laird, M.H., Rhee, S.H., Perkins, D.J., Medvedev, A.E., Piao, W., Fenton, M.J., Vogel, S.N.: TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling. J. Leukoc. Biol. **85**(6), 966–977 (2009)
45. Troutman, T.D., Bazan, J.F., Pasare, C.: Toll-like receptors, signaling adapters and regulation of the pro-inflammatory response by PI3K. Cell Cycle **11**(19), 3559–3567 (2012)
46. Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., Bilanges, B.: The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **11**(5), 329–341 (2010)
47. Weichhart, T., Costantino, G., Poglitsch, M., Rosner, M., Zeyda, M., Stuhlmeier, K.M., Kolbe, T., Stulnig, T.M., Horl, W.H., Hengstschlager, M., Muller, M., Saemann, M.D.: The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. Immunity **29**(4), 565–577 (2008)
48. Laplante, M., Sabatini, D.M.: mTOR signaling at a glance. J. Cell. Sci. **122**(Pt 20), 3589–3594 (2009)
49. Woodgett, J.R., Ohashi, P.S.: GSK3: an in-Toll-erant protein kinase? Nat. Immunol. **6**(8), 751–752 (2005)
50. Cortes-Vieyra, R., Bravo-Patino, A., Valdez-Alarcon, J.J., Juarez, M.C., Finlay, B.B., Baizabal-Aguirre, V.M.: Role of glycogen synthase kinase-3 beta in the inflammatory response caused by bacterial pathogens. J Inflamm (Lond) **9**(1), 23 (2012)
51. Wen, A.Y., Sakamoto, K.M., Miller, L.S.: The role of the transcription factor CREB in immune function. J. Immunol. **185**(11), 6413–6419 (2010)
52. Ohtani, M., Nagai, S., Kondo, S., Mizuno, S., Nakamura, K., Tanabe, M., Takeuchi, T., Matsuda, S., Koyasu, S.: Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. Blood **112**(3), 635–643 (2008)
53. Powell, J.D., Pollizzi, K.N., Heikamp, E.B., Horton, M.R.: Regulation of immune responses by mTOR. Annu. Rev. Immunol. **30**, 39–68 (2012)
54. Wang, H., Brown, J., Gu, Z., Garcia, C.A., Liang, R., Alard, P., Beurel, E., Jope, R.S., Greenway, T., Martin, M.: Convergence of the mammalian target of rapamycin complex 1- and glycogen synthase kinase 3-signaling pathways regulates the innate inflammatory response. J. Immunol. **186**(9), 5217–5226 (2011)
55. Lee, P.S., Wilhelmson, A.S., Hubner, A.P., Reynolds, S.B., Gallacchi, D.A., Chiou, T.T., Kwiatkowski, D.J.: mTORC1-S6K activation by endotoxin contributes to cytokine up-regulation and early lethality in animals. PLoS ONE **5**(12), 14399 (2010)
56. Thomson, A.W., Turnquist, H.R., Raimondi, G.: Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. Nat. Rev. Immunol. **9**(5), 324–337 (2009)
57. Baker, A.K., Wang, R., Mackman, N., Luyendyk, J.P.: Rapamycin enhances LPS induction of tissue factor and tumor necrosis factor-alpha expression in macrophages by reducing IL-10 expression. Mol. Immunol. **46**(11-12), 2249–2255 (2009)
58. Shuai, K., Liu, B.: Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. Nat. Rev. Immunol. **3**(11), 900–911 (2003)
59. Kotenko, S.V., Langer, J.A.: Full house: 12 receptors for 27 cytokines. Int. Immunopharmacol. **4**(5), 593–608 (2004)

60. Murray, P.J.: The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. J. Immunol. **178**(5), 2623–2629 (2007)
61. Piganis, R.A., De Weerd, N.A., Gould, J.A., Schindler, C.W., Mansell, A., Nicholson, S.E., Hertzog, P.J.: Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 inhibits type I interferon (IFN) signaling via the interferon alpha receptor (IFNAR1)-associated tyrosine kinase Tyk2. J. Biol. Chem. **286**(39), 33811–33818 (2011)
62. Weber, A., Wasiliew, P., Kracht, M.: Interleukin-1 (IL-1) pathway. Sci Signal **3**(105), 1 (2010)
63. Verstrepen, L., Bekaert, T., Chau, T.L., Tavernier, J., Chariot, A., Beyaert, R.: TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. Cell. Mol. Life Sci. **65**(19), 2964–2978 (2008)
64. Workman, L.M., Habelhah, H.: TNFR1 signaling kinetics: spatiotemporal control of three phases of IKK activation by posttranslational modification. Cell. Signal. **25**(8), 1654–1664 (2013)
65. Chu, W.M.: Tumor necrosis factor. Cancer Lett. **328**(2), 222–225 (2013)
66. Saraiva, M., O'Garra, A.: The regulation of IL-10 production by immune cells. Nat. Rev. Immunol. **10**(3), 170–181 (2010)
67. Murray, P.J.: Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. Curr Opin Pharmacol **6**(4), 379–386 (2006)
68. Staples, K.J., Smallie, T., Williams, L.M., Foey, A., Burke, B., Foxwell, B.M., Ziegler-Heitbrock, L.: IL-10 induces IL-10 in primary human monocyte-derived macrophages via the transcription factor Stat3. J. Immunol. **178**(8), 4779–4785 (2007)
69. Pattison, M.J., Mackenzie, K.F., Arthur, J.S.: Inhibition of JAKs in macrophages increases lipopolysaccharide-induced cytokine production by blocking IL-10-mediated feedback. J. Immunol. **189**(6), 2784–2792 (2012)
70. Yoshimura, A., Naka, T., Kubo, M.: SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. Nat. Rev. Immunol. **7**(6), 454–465 (2007)
71. Yoshimura, A., Suzuki, M., Sakaguchi, R., Hanada, T., Yasukawa, H.: SOCS, Inflammation, and Autoimmunity. Front Immunol **3**, 20 (2012)
72. Babon, J.J., Kershaw, N.J., Murphy, J.M., Varghese, L.N., Laktyushin, A., Young, S.N., Lucet, I.S., Norton, R.S., Nicola, N.A.: Suppression of cytokine signaling by SOCS3: characterization of the mode of inhibition and the basis of its specificity. Immunity **36**(2), 239–250 (2012)
73. Nakagawa, R., Naka, T., Tsutsui, H., Fujimoto, M., Kimura, A., Abe, T., Seki, E., Sato, S., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S., Yamanishi, K., Kawase, I., Nakanishi, K., Kishimoto, T.: SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. Immunity **17**(5), 677–687 (2002)
74. Ryo, A., Suizu, F., Yoshida, Y., Perrem, K., Liou, Y.C., Wulf, G., Rottapel, R., Yamaoka, S., Lu, K.P.: Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. Mol. Cell **12**(6), 1413–1426 (2003)
75. Mansell, A., Smith, R., Doyle, S.L., Gray, P., Fenner, J.E., Crack, P.J., Nicholson, S.E., Hilton, D.J., O'Neill, L.A., Hertzog, P.J.: Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. Nat. Immunol. **7**(2), 148–155 (2006)
76. Frobose, H., Ronn, S.G., Heding, P.E., Mendoza, H., Cohen, P., Mandrup-Poulsen, T., Billestrup, N.: Suppressor of cytokine Signaling-3 inhibits interleukin-1 signaling by targeting the TRAF-6/TAK1 complex. Mol. Endocrinol. **20**(7), 1587–1596 (2006)
77. Ruland, J.: Return to homeostasis: downregulation of NF-Î°B responses. Nat. Immunol. **12**(8), 709–714 (2011)
78. van 't Veer, C., van den Pangaart, P.S., van Zoelen, M.A., de Kruif, M., Birjmohun, R.S., Stroes, E.S., de Vos, A.F., van der Poll, T.: Induction of IRAK-M is associated with lipopolysaccharide tolerance in a human endotoxemia model. J. Immunol. **179**(10), 7110–7120 (2007)
79. Escoll, P., del Fresno, C., Garcia, L., Valles, G., Lendinez, M.J., Arnalich, F., Lopez-Collazo, E.: Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. Biochem. Biophys. Res. Commun. **311**(2), 465–472 (2003)
80. Kobayashi, K., Hernandez, L.D., Galan, J.E., Janeway, C.A., Medzhitov, R., Flavell, R.A.: IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. Cell **110**(2), 191–202 (2002)
81. Ferreiro, D.U., Komives, E.A.: Molecular mechanisms of system control of NF-kappaB signaling by IkappaBalpha. Biochemistry **49**(8), 1560–1567 (2010)
82. Majdalawieh, A., Ro, H.S.: Regulation of IkappaBalpha function and NF-kappaB signaling: AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages. Mediators Inflamm. **2010**, 823821 (2010)
83. Brown, J., Wang, H., Hajishengallis, G.N., Martin, M.: TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. J. Dent. Res. **90**(4), 417–427 (2011)
84. Biswas, S.K., Lopez-Collazo, E.: Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. Trends Immunol. **30**(10), 475–487 (2009)
85. Piao, W., Song, C., Chen, H., Diaz, M.A., Wahl, L.M., Fitzgerald, K.A., Li, L., Medvedev, A.E.: Endotoxin tolerance dysregulates MyD88- and Toll/IL-1R domain-containing adapter inducing IFN-beta-dependent pathways and increases expression of negative regulators of TLR signaling. J. Leukoc. Biol. **86**(4), 863–875 (2009)
86. Cole, T.S., Zhang, M., Standiford, T.J., Newstead, M., Luther, J., Zhang, J., Chen, C.C., Kao, J.Y.: IRAK-M modulates expression of IL-10 and cell surface markers CD80 and MHC II after bacterial re-stimulation of tolerized dendritic cells. Immunol. Lett. **144**(1-2), 49–59 (2012)
87. Schmitz, F., Heit, A., Dreher, S., Eisenacher, K., Mages, J., Haas, T., Krug, A., Janssen, K.P., Kirschning, C.J., Wagner, H.: Mammalian target of rapamycin (mTOR) orchestrates the defense program of innate immune cells. Eur. J. Immunol. **38**(11), 2981–2992 (2008)
88. Wang, H., Brown, J., Martin, M.: Glycogen synthase kinase 3: a point of convergence for the host inflammatory response. Cytokine **53**(2), 130–140 (2011)
89. Martin, M., Rehani, K., Jope, R.S., Michalek, S.M.: Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. Nat. Immunol. **6**(8), 777–784 (2005)

Additional Files
Additional file 1 — Complete TLR4 signalling pathway logical graph
Additional file 2 — Graphical ontology
Additional file 3 — Employed methodology & *Logml*

4.4 Conclusion

Dans cette dernière partie de thèse, nous avons utilisé des approches booléennes étendues avec des opérateurs de logique floue afin d'explorer *in silico* les différentes facettes de la régulation de la voie TLR4 suite à un contact avec du LPS. Notre approche s'est basée sur l'analyse de trois scénarios.

Dans le premier scénario, nous avons cherché à reproduire différents types d'infections aux bactéries à Gram négatif en faisant varier l'intensité et la durée de l'exposition à une unique dose de LPS. Les simulations nous ont permis de montrer que les quantités de cytokines pro- et anti-inflammatoires, produites suite à une injection de LPS, sont reliées à l'intensité du stimulus. Plus la quantité de LPS injectée est importante, et plus forte sera la réponse de la cellule en termes de production d'IL-1β et de IL-10. L'augmentation de la durée d'exposition au LPS a ensuite permis de faire apparaître deux phases dans la réponse pro-inflammatoire. Une première phase sous la forme d'une réponse aiguë, semblable à celle observée dans le cadre d'une injection unique, et une seconde phase sous la forme d'une réponse atténuée. Cette réponse biphasique peut s'expliquer par la compétition opérant entre les facteurs de transcription CREB et NFκB vis à vis du co-activateur CBP. L'augmentation de l'activation du facteur de transcription CREB provoque un déplacement du facteur de transcription NFκB qui libère sa place auprès du co-activateur CBP. Une augmentation de l'activité de CREB entraine une augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires, et une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires. Pour clôturer ce premier scénario, nous avons cherché à reproduire le cas pathologique d'une infection ne pouvant être résolue en simulant une infusion continue de LPS. Il a été observé que le facteur de transcription NFκB reste activé à des niveaux très élevés. Alors qu'elles sont produites à des niveaux relativement faibles, les cytokines pro- et anti-inflammatoires sont relarguées en continu par la cellule. Le système est alors hors de contrôle et on peut discerner ce qui est communément qualifié dans la littérature comme une "tempête cytokinique".

Dans le second scénario, nous avons cherché à reproduire l'effet provoqué par des infections répétées. Nous avons ainsi exploré la réponse du modèle suite à deux doses identiques de LPS séparées par des intervalles de temps que nous avons fait varier. Les résultats des expériences menées nous conduisent à deux constats. Lorsque les doses de LPS sont rapprochées, la réponse au second stimulus est affaiblie par rapport au premier. Le second constat est que plus on espace les doses de LPS, et moins cette atténuation se fait sentir en terme de production de cytokines. Ce phénomène, connu sous le nom de "tolérance à l'endotoxine", a été longuement décrit et analysé dans la littérature depuis les deux dernières décennies [148]. Dans le modèle, la boucle de rétro-contrôle qui a été identifiée comme responsable de ce phénomène est celle de IRAK-M. Comme présenté dans le modèle de connaissances, IRAK-M participe à la réduction de la réponse pro-inflammatoire en inhibant partiellement IRAK1/2, un composant essentiel de la voie MyD88 dépendante. Ces résultats concordent avec ceux

présentés dans la littérature [171, 197, 198].

Dans le dernier scénario, nous nous sommes intéressés au rôle de mTOR dans la régulation de la réponse de TLR4 suite à une injection de LPS. Tout en gardant le même stimulus de LPS pour chaque expérience, nous avons fait varier la durée et les intervalles d'administration de la Rapamycine, une molécule inhibitrice de mTOR. Tout d'abord, et contrairement à ce qui est présenté dans certains articles [199], un pré-traitement à la Rapamycine (injection de Rapamycine avant le stimulus de LPS) ne semble pas produire d'effet sur la production de cytokines pro-inflammatoires suite à une injection de LPS. Ces différences observées entre les résultats de simulation *in silico* et ceux observés *in vivo* peuvent être expliqués par un possible délai du à un temps de pénétration de la Rapamycine dans le corps, et qui n'est pas pris en compte dans le modèle. Une autre explication possible est qu'il existe toujours des trous de connaissances concernant l'interaction entre mTOR et le reste de la voie de signalisation TLR4. En revanche, lorsque la Rapamycine est administrée pendant la réponse inflammatoire, on observe une quasi inhibition de la production de IL-10, et une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires, suggérant une réponse inflammatoire disproportionnée. L'inhibition du *pathway* mTOR par l'administration de Rapamycine entraîne une réduction drastique du niveau intracellulaire du facteur de transcription CREB et par conséquent une inhibition de la production de IL-10. Bien que ça n'influence pas directement la production de cytokines pro-inflammatoires, l'inhibition du complexe mTOR est suivie d'une augmentation de la production de IL-1β qui peut être expliquée par le remplacement de CREB par NFκB au niveau du co-activateur de transcription CBP. Ces résultats, en accord avec ce qui est observé dans la littérature [65, 123, 124], suggèrent que la dérégulation du *pathway* mTOR peut provoquer un déséquilibre entre la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires, conduisant à la perturbation de l'homéostasie immunitaire.

Pour conclure, les activités combinées de GSK3β et du complexe mTOR semblent jouer un rôle important dans la régulation du "ménage à trois" entre CBP, NFκB et CREB. Ces résultats ouvrent des perspectives pour de nouveaux champs de recherche en ciblant la voie de signalisation mTOR.

Mis bout à bout, les résultats obtenus de cette dernière partie suggèrent que les approches de modélisation logique employées dans cette étude peuvent être utilisées pour l'exploration d'hypothèses à travers la simulation des réseaux biologiques. En attendant, et puisque le modèle logique de la voie TLR4 a été réalisé en se basant sur les connaissances extraites d'articles scientifiques, celui-ci pourra aisément être complété si de nouvelles découvertes étaient faites prochainement.

CHAPITRE 5

CONCLUSION

Les syndromes septiques sont des états pathologiques particulièrement difficiles à appréhender et à traiter en raison du caractère multidisciplinaire et de la complexité des processus mis en jeux. En raison d'un nombre élevé d'entités biologiques et des relations quantitatives les reliant entre elles, de la différence d'échelles spatiales et temporelles et des nombreuses rétroactions mises en place lors d'une réponse inflammatoire, il est presque impossible de prendre en compte cette pathologie dans son ensemble pour un esprit humain. Ces arguments font de la modélisation numérique un outil de choix dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans cette thèse, nous sommes partis de l'hypothèse que l'évolution vers des syndromes septiques graves était la conséquence d'une perte de contrôle précoce de la réponse inflammatoire du système immunitaire face à l'infection. L'objectif de ce travail a été d'identifier et de simuler *in silico* un ou plusieurs des mécanismes physiologiques impliqués dans la régulation de la réponse inflammatoire précoce.

Nous nous sommes tout d'abord appuyés sur des approches d'analyse en bioinformatique pour explorer la cinétique d'une réponse inflammatoire d'un point de vue transcriptomique et identifier les mécanismes biologiques mis en jeu tout au long de la résolution d'une réponse inflammatoire. Le croisement des mécanismes biologiques exprimés chez des sujets sains et des sujets malades a permis d'identifier la voie de signalisation mTOR comme discriminante entre les cas non pathologiques de SIRS et les cas de syndromes septiques.

Nous avons ensuite mis au point des approches de modélisation logique et développé un outil de simulation pour explorer *in silico* la réponse de la voie de signalisation TLR4 suite à différents *stimuli*. En nous basant sur les connaissances disponibles dans la littérature, nous avons produit un modèle logique de la voie TLR4. Ce modèle a été utilisé pour explorer qualitativement le rôle joué par la voie mTOR dans la régulation

d'une réponse inflammatoire.

5.1 Analyse transcriptomique

Nous avons décidé de comparer transcriptomiquement les mécanismes mis en jeu lors d'une réaction inflammatoire systémique contrôlée chez des sujets sains à ceux observés lors d'un sepsis. Nous sommes pour cela partis de deux bases de données d'expression de gènes auxquelles nous avons appliqué des méthodes de traitement et d'analyse identiques. Ce travail a consisté en deux parties.

La première partie de cette étude a porté sur l'analyse de la dynamique de la résolution d'une réponse inflammatoire systémique induite. L'objectif était double : (i) identifier les intervalles de temps pendant lesquels une régulation de la réponse inflammatoire pouvait être observée ; (ii) vérifier que les résultats obtenus soient concordants avec ceux obtenus par Calvano *et al.* [46] en 2005, alors que les outils utilisés sont différents. Cette partie nous a permis d'observer deux phases de la réponse inflammatoire très distinctes d'un point de vue transcriptomique. Tout d'abord un première phase, très majoritairement pro-inflammatoire, apparaît 2 heures après l'injection d'endotoxine. S'en suit une seconde phase, cette fois ci majoritairement anti-inflammatoire, qui commence vers 6 heures après l'injection et dure jusqu'à la résolution de l'épisode inflammatoire.

La seconde partie de cette étude nous a conduits à nous servir des bases de données issues des études de Calvano *et al.* [46] et de Sutherland *et al.* [51], pour identifier les gènes différemment exprimés chez des sujets sains où un SIRS a été induit, et chez des sujets souffrant de syndromes septiques. Une analyse fonctionnelle réalisée sur ces gènes nous a ensuite permis d'identifier la voie de signalisation mTOR comme potentiellement impliquée dans la perte de contrôle dans la réaction inflammatoire observée dans un cas de sepsis.

Ces résultats nous ont conduits à nous focaliser sur la voie de signalisation TLR4 et à nous intéresser au rôle joué par mTOR dans la perte de contrôle de la réponse inflammatoire lors d'un épisode septique.

5.2 Modélisation logique

Nous avons utilisé des approches booléennes étendues afin d'explorer *in silico* les différentes facettes de la régulation de la voie TLR4 suite à un contact avec du LPS. L'utilisation de la modélisation logique a non seulement contribué à valider les connaissances intégrées dans la revue de la littérature, mais a également permis d'explorer des hypothèses biologiques difficilement vérifiables sans l'utilisation d'approches numériques intégratives. Nous nous sommes pour cela appuyés sur un plan expérimental divisé en trois scénarios.

Dans un premier scénario, nous avons simulé l'exposition d'un sujet à plusieurs types de doses uniques de LPS. Les résultats de simulations nous ont permis de montrer que les quantités de cytokines pro- et anti-inflammatoires, produites suite à une injection de LPS, sont reliées à l'intensité du stimulus. Nous avons également pu mettre en évidence la présence d'une réponse inflammatoire biphasique en cas d'exposition prolongée au LPS. Cette réponse pouvant s'expliquer par la compétition opérant entre les facteurs de transcription CREB et NFκB vis à vis du co-activateur CBP. Enfin, nous avons modélisé une infection ne pouvant être résolue en simulant une infusion continue de LPS. Le système était alors hors de contrôle et et nous avons vu apparaître ce qui est défini dans la littérature comme une "tempête cytokinique".

Dans le second scénario, nous avons cherché à reproduire l'effet provoqué par deux injections répétées de LPS séparées par des intervalles de temps que nous avons fait varier. Les résultats de ces expériences nous ont conduit à la simulation de la "tolérance à l'endotoxine", phénomène qui a été décrit et analysé dans la littérature ces dernières décennies. La boucle de rétro-contrôle qui a été identifiée comme responsable de ce phénomène est celle de IRAK-M.

Dans le dernier scénario, nous nous sommes intéressés au rôle de mTOR dans la régulation de la réponse de TLR4. Les résultats obtenus nous ont montré qu'une inactivation de la voie mTOR pendant une réponse inflammatoire provoque la quasi inhibition de la production de IL-10, et une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires, suggérant une réponse inflammatoire disproportionnée. Il a été observé que l'inhibition du complexe mTOR est suivie d'une augmentation de la production de IL-1β qui peut être expliquée par le remplacement de CREB par NFκB au niveau du co-activateur de transcription CBP. Ces résultats, en accord avec ce qui est observé dans la littérature [65, 123, 124], suggèrent que la dérégulation du *pathway* mTOR peut provoquer un déséquilibre entre la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires, conduisant à la perturbation de l'homéostasie immunitaire.

5.3 Perspectives

Avant tout, il est important de garder à l'esprit qu'il serait trop réducteur de lier le dysfonctionnement de la voie mTOR à la pathogénèse du sepsis, puisque nous nous sommes focalisés dans cette thèse sur la voie TLR4. Par conséquent, d'autres voies liées à l'initiation de la réponse inflammatoire devront être étudiées.

Les résultats obtenus via l'analyse transcriptomique comparative sont à prendre avec précaution, compte tenu du faible nombre de sujets inclus. Ces résultats pourraient être confirmés par une étude temporelle complémentaire de grande envergure menée en services de réanimation sur des sujets atteints de sepsis. Une telle étude fournirait des informations précises sur la cinétique des mécanismes mis en jeu lors d'un sepsis.

L'utilisation de *Logml* a facilité l'exploration de la voie de signalisation TLR4. Pour

faciliter sa prise en main, il est prévu de doter cet outil d'une interface d'édition de graphes. *Logml* pourrait ainsi être utilisé pour la création, l'édition et la simulation de réseaux biologiques.

Ces résultats encourageants ouvrent des perspectives pour une nouvelle fenêtre de recherche dans le domaine du sepsis. Au vu de sa probable implication dans la régulation de la réponse inflammatoire, la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR devrait être intégrée à la voie TLR4 au même titre que les voies MyD88-dépendantes et indépendantes.

ANNEXE A

ONTOLOGIE GRAPHIQUE

Cette ontologie graphique a été utilisée dans le cadre de cette thèse afin de définir :
— les types d'entités
— les types de statuts d'activation de ces entitées
— les relations entre les entités
— les compartiments biologiques
— les processus biologiques
— les opérateurs logiques

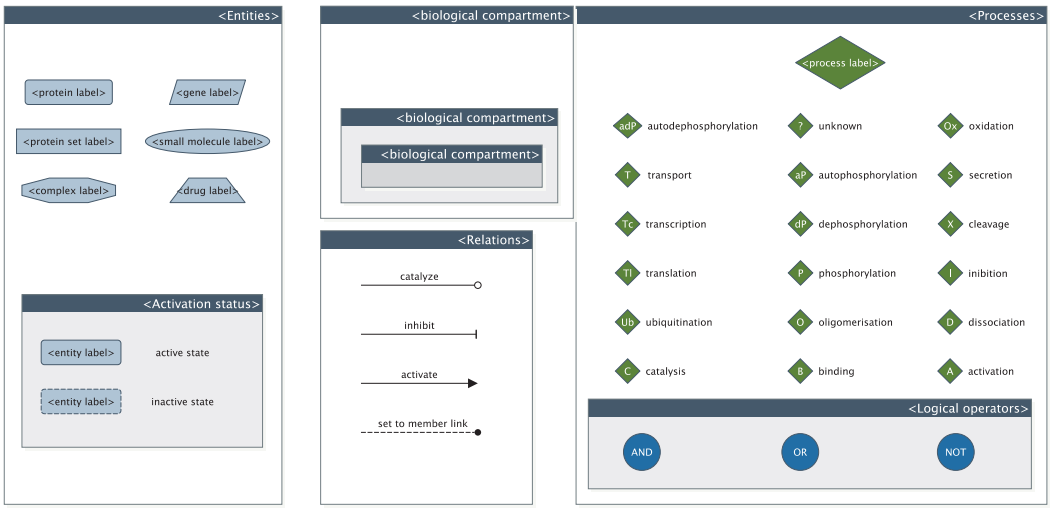


Figure A.1 – Ontologie graphique utilisée dans le cadre de cette thèse.

ANNEXE B

GRAPHE LOGIQUE DE LA VOIE TLR4 ET DE SES BOUCLES DE RÉTRO-CONTRÔLE

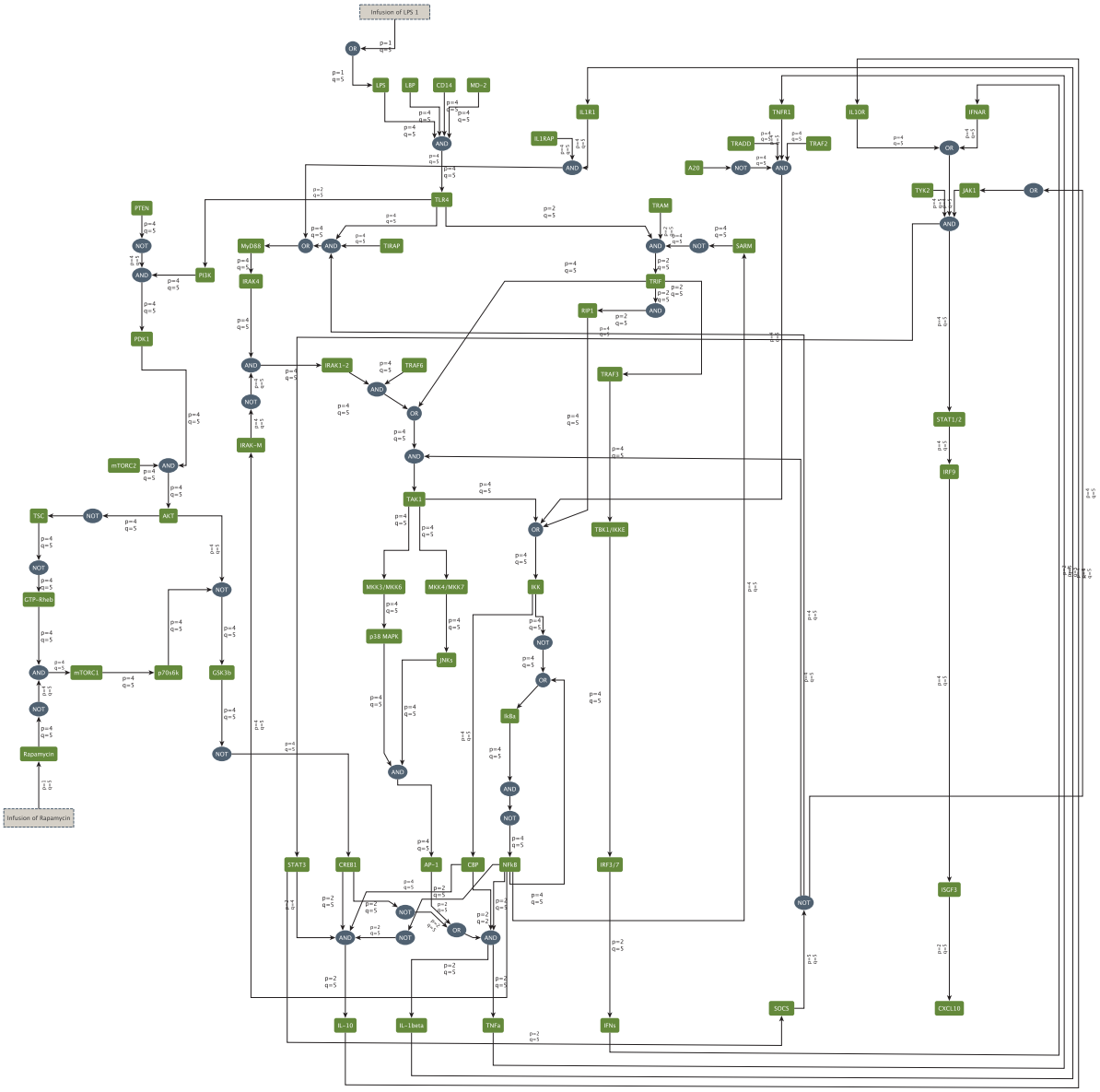


Figure B.1 – Graphe logique de la voie TLR4 et de ses boucles de rétro-contrôle.

ANNEXE C

VALEURS INITIALES DU MODÈLE LOGIQUE

Entités	Valeur qualitative initiale ($x_i(k_0)$)
LPS	0
TLR4	0
TIRAP	5
MyD88	0
IRAK4	0
IRAK1/2	0
TRAF6	5
TAK1	0
MKK3/MKK6	0
MKK4/MKK7	0
p38/MAPK	0
JNKs	0
AP-1	0
IKK	0
IkBa	5
NFkB	0
CBP	0
TNFα	0
IL-1β	0
LBP	5
MD-2	5
CD14	5
TRAM	5
TRIF	0
TRAF3	0
...	...

Suite du tableau C.1	
Entités	Valeur qualitative initiale ($x_i(k_0)$)
TBK1/IKKE	0
IRF3/7	0
RIP1	0
IFNs	0
IL-10	0
CREB1	0
PI3K	0
PTEN	0
PDK1	0
mTORC2	5
AKT	0
TSC	5
GTP :Rheb	5
mTORC1	0
S6k	0
GSK3β	5
STAT3	0
Rapamycin	0
IL1R1	0
TNFR1	0
TRADD	5
TRAF2	5
IL10R	0
IFNAR	0
TYK2	5
SOCS	0
JAK1	5
STAT1/2	0
IRF9	0
ISGF3	0
IL1RAP	5
A20	0
CXCL10	0
IRAK-M	0
SARM	0

Tableau C.1 – Valeurs initiales attribuées pour chaque entité du modèle logique.

ANNEXE D

EQUATIONS LOGIQUES DE LA VOIE TLR4

Entités biologiques (x_i)	Équations logiques (f_{ij}^{node})
LPS $(k+1)$	OR((Infusion of LPS 1, LPS)(k), (Infusion of LPS 2, LPS)(k))
TLR4 $(k+1)$	AND((LPS, TLR4)(k), (CD14, TLR4)(k), (MD-2, TLR4)(k), (LBP, TLR4)(k))
TIRAP $(k+1)$	Constante
MyD88 $(k+1)$	OR(AND((TIRAP, MyD88)(k), (TLR4, MyD88)(k), NOT((SOCS, MyD88)(k))), AND((IL1R1,MyD88)(k), (IL1RAP,MyD88)(k)))
IRAK4 $(k+1)$	(MyD88,IRAK4)(k)
IRAK1/2 $(k+1)$	AND((IRAK4,IRAK1/2)(k), NOT((IRAK-M,IRAK1/2)(k)))
TRAF6 $(k+1)$	Constante
TAK1 $(k+1)$	AND(OR(AND((IRAK1/2,TAK1)(k), (TRAF6,TAK1)(k)), (TRIF,TAK1)(k)), NOT((SOCS,TAK1)(k)))
MKK3/MKK6 $(k+1)$	(TAK1,MKK3/MKK6)(k)
MKK4/MKK7 $(k+1)$	(TAK1,MKK4/MKK7)(k)
p38/MAPK $(k+1)$	(MKK3/MKK6,p38/MAPK)(k)
JNKs $(k+1)$	(MKK4/MKK7,JNKs)(k)
AP-1 $(k+1)$	AND((p38/MAPK,AP-1)(k), (JNKs,AP-1)(k))
IKK $(k+1)$	OR((TAK1,IKK)(k), (RIP1,IKK)(k), AND((TNFR1,IKK)(k), (TRAF2,IKK)(k), (TRADD,IKK)(k), NOT((A20,IKK)(k))))
IkBa $(k+1)$	OR(NOT((IKK,IkBa)(k)), (NFkB,IkBa)(k))
NFkB $(k+1)$	NOT(AND((IkBa,NFkB)(k)))
CBP $(k+1)$	(IKK,CBP)(k)
TNFa $(k+1)$	AND((NFkB, TNFa)(k), (CBP, TNFa)(k), OR((AP-1, TNFa)(k), NOT((CREB1, TNFa))))
...	...

Suite du tableau D.1	
Entités biologiques (x_i)	Équations logiques (f_{ij}^{node})
IL-1b $(k+1)$	AND((NFkB, IL-1b)(k), (CBP, IL-1b)(k), OR((AP-1, IL-1b)(k), NOT((CREB1, IL-1b)(k))))
LBP $(k+1)$	Constante
MD-2 $(k+1)$	Constante
CD14 $(k+1)$	Constante
TRAM $(k+1)$	Constante
TRIF $(k+1)$	AND((TRAM, TRIF)(k), (TLR4, TRIF)(k), NOT((SARM, TRIF)(k)))
TRAF3 $(k+1)$	(TRIF, TRAF3)(k)
TBK1/IKKE $(k+1)$	(TRAF3, TBK1/IKKE)(k)
IRF3/7 $(k+1)$	(TBK1/IKKE, IRF3/7)(k)
RIP1 $(k+1)$	AND((TRIF, RIP1)(k))
IFNs $(k+1)$	(IRF3/7, IFNs)(k)
IL-10 $(k+1)$	AND((CREB1, IL-10)(k), NOT((NFkB, IL-10)(k)), (STAT3, IL-10)(k), (CBP, IL-10)(k))
CREB1 $(k+1)$	NOT((GSK3b, CREB1)(k))
PI3K $(k+1)$	(TLR4, PI3K)(k)
PTEN $(k+1)$	Constante
PDK1 $(k+1)$	AND(NOT((PTEN, PDK1)(k)), (PI3K, PDK1)(k))
mTORC2 $(k+1)$	Constante
AKT $(k+1)$	AND((mTORC2, AKT)(k), (PDK1, AKT)(k))
TSC $(k+1)$	NOT((AKT, TSC)(k))
GTP :Rheb $(k+1)$	NOT((TSC, GTP :Rheb)(k))
mTORC1 $(k+1)$	AND((GTP :Rheb, mTORC1)(k), NOT((Rapamycin, mTORC1)(k)))
p70s6k $(k+1)$	(mTORC1, p70s6k)(k)
GSK3b $(k+1)$	NOT((p70s6k, GSK3b)(k), (AKT, GSK3b)(k))
STAT3 $(k+1)$	AND((TYK2, STAT3)(k), (JAK1, STAT3)(k), OR((IFNAR, STAT3)(k), (IL10R, STAT3)(k)))
Rapamycin $(k+1)$	Constante
Infusion of LPS 1 $(k+1)$	Perturbation
IL1R1 $(k+1)$	(IL-1b, IL1R1)(k)
TNFR1 $(k+1)$	(TNFa, TNFR1)(k)
TRADD $(k+1)$	Constante
TRAF2 $(k+1)$	Constante
IL10R $(k+1)$	(IL-10, IL10R)(k)
IFNAR $(k+1)$	(IFNs, IFNAR)(k)
TYK2 $(k+1)$	Constante
SOCS $(k+1)$	(STAT3, SOCS)(k)
...	...

Suite du tableau D.1	
Entités biologiques (x_i)	Équations logiques (f_{ij}^{node})
JAK1 $(k+1)$	$OR(NOT((\text{SOCS, JAK1})(k)))$
STAT1/2 $(k+1)$	$AND((\text{TYK2, STAT1/2})(k), (\text{JAK1, STAT1/2})(k), OR((\text{IFNAR, STAT1/2})(k), (\text{IL10R, STAT1/2})(k)))$
IRF9 $(k+1)$	$(\text{STAT1/2, IRF9})(k)$
ISGF3 $(k+1)$	$(\text{IRF9, ISGF3})(k)$
IL1RAP $(k+1)$	Constante
A20 $(k+1)$	Constante
CXCL10 $(k+1)$	$(\text{ISGF3, CXCL10})(k)$
IRAK-M $(k+1)$	$(\text{NFkB, IRAK-M})(k)$
SARM $(k+1)$	$(\text{NFkB, SARM})(k)$
Infusion of LPS 2 $(k+1)$	Perturbation

Tableau D.1 – Équations logiques générées par *Logml* définissant chaque entité du modèle logique.

Bibliographie

[1] S. M. Opal.
The evolution of the understanding of sepsis, infection, and the host response : a brief history.
Crit Care Clin, 25(4) :637–663, Oct 2009.

[2] D. J. Funk, J. E. Parrillo, and A. Kumar.
Sepsis and septic shock : a history.
Crit Care Clin, 25(1) :83–101, Jan 2009.

[3] G. R. Bernard, B. Francois, J. P. Mira, J. L. Vincent, R. P. Dellinger, J. A. Russell, S. P. Larosa, P. F. Laterre, M. M. Levy, W. Dankner, N. Schmitt, J. Lindemann, and X. Wittebole.
Evaluating the efficacy and safety of two doses of the polyclonal anti-tumor necrosis factor-Î± fragment antibody AZD9773 in adult patients with severe sepsis and/or septic shock : randomized, double-blind, placebo-controlled phase IIb study*.
Crit. Care Med., 42(3) :504–511, Mar 2014.

[4] E. J. Giamarellos-Bourboulis.
The failure of biologics in sepsis : where do we stand ?
Int. J. Antimicrob. Agents, 42 Suppl :S45–47, Jun 2013.

[5] R C Bone, R A Balk, F B Cerra, R P Dellinger, A M Fein, W A Knaus, R M Schein, and W J Sibbald.
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, 136(5 Suppl) :e28, 1992.
ISSN 1931-3543.
URL http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mnh&AN=20162763&lang=fr&site=ehost-live.

[6] M. M. Levy, M. P. Fink, J. C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S. M. Opal, J. L. Vincent, and G. Ramsay.
2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference.
Crit. Care Med., 31(4) :1250–1256, Apr 2003.

[7] M. Singer, C. S. Deutschman, C. W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G. R. Bernard, J. D. Chiche, C. M. Coopersmith, R. S. Hotchkiss, M. M. Levy, J. C. Marshall, G. S. Martin, S. M. Opal, G. D. Rubenfeld, T. van der Poll, J. L. Vincent, and D. C. Angus.
The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3).
JAMA, 315(8) :801–810, Feb 2016.

[8] C Brun-Buisson, F Doyon, and J Carlet.
Bacteremia and severe sepsis in adults : a multicenter prospective survey in icus and wards of 24 hospitals. french bacteremia-sepsis study group.
American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine, 154(3 Pt 1) :617 – 624, 1996.
ISSN 1073-449X.
URL http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mnh&AN=8810595&lang=fr&site=ehost-live.

[9] Corinne Alberti, Christian Brun-Buisson, Hilmar Burchardi, Claudio Martin, Sergey Goodman, Antonio Artigas, Alberto Sicignano, Mark Palazzo, Rui Moreno, Ronan Boulme, Eric Lepage, and Roger Le Gall.
Epidemiology of sepsis and infection in icu patients from an international multicentre cohort study.
Intensive Care Medicine, 28(2) :108 – 121, 2002.
ISSN 0342-4642.
URL http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mnh&AN=11907653&lang=fr&site=ehost-live.

[10] Andrew Padkin, Caroline Goldfrad, Anthony R Brady, Duncan Young, Nick Black, and Kathy Rowan.
Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in england, wales, and northern ireland.
Critical Care Medicine, 31(9) :2332 – 2338, 2003.
ISSN 0090-3493.
URL http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mnh&AN=14501964&lang=fr&site=ehost-live.

[11] C. Brun-Buisson, P. Meshaka, P. Pinton, and B. Vallet.
EPISEPSIS : a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units.
Intensive Care Med, 30 :580–588, Apr 2004.

[12] Simon Finfer, Rinaldo Bellomo, Jeffrey Lipman, Craig French, Geoffrey Dobb, and John Myburgh.
Adult-population incidence of severe sepsis in australian and new zealand intensive care units.

Intensive Care Medicine, 30(4) :589 – 596, 2004.
ISSN 0342-4642.
URL http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mnh&AN=14963646&lang=fr&site=ehost-live.

[13] C. Brun-Buisson.
Epidémiologie des états septiques graves : Choc septique : Une course contre la montre.
La Presse médicale, 35(3) :513 – 520, 2006.
URL http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=pcl&AN=17581402&lang=fr&site=ehost-live.

[14] D. F. Gaieski, J. M. Edwards, M. J. Kallan, and B. G. Carr.
Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States.
Crit. Care Med., 41(5) :1167–1174, May 2013.

[15] T. J. Iwashyna, C. R. Cooke, H. Wunsch, and J. M. Kahn.
Population burden of long-term survivorship after severe sepsis in older Americans.
J Am Geriatr Soc, 60(6) :1070–1077, Jun 2012.

[16] S. B. Wilhelms, F. R. Huss, G. Granath, and F. Sjoberg.
Assessment of incidence of severe sepsis in Sweden using different ways of abstracting International Classification of Diseases codes : difficulties with methods and interpretation of results.
Crit. Care Med., 38(6) :1442–1449, Jun 2010.

[17] G. S. Martin, D. M. Mannino, S. Eaton, and M. Moss.
The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000.
N. Engl. J. Med., 348 :1546–1554, Apr 2003.

[18] CM Torio and RM Andrews.
National inpatient hospital costs : The most expensive conditions by payer, 2011 : Statistical brief 160.
In *Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs*. Agency for Health Care Policy and Research (US), Rockville (MD), 2006.

[19] D. Annane, P. Aegerter, M. C. Jars-Guincestre, and B. Guidet.
Current epidemiology of septic shock : the CUB-Rea Network.
Am. J. Respir. Crit. Care Med., 168 :165–172, Jul 2003.

[20] R. P. Dellinger, J. M. Carlet, H. Masur, H. Gerlach, T. Calandra, J. Cohen, J. Gea-Banacloche, D. Keh, J. C. Marshall, M. M. Parker, G. Ramsay, J. L. Zimmerman, J. L. Vincent, and M. M. Levy.
Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock.
Intensive Care Med, 30 :536–555, Apr 2004.

[21] N. Joram, E. Lopez, J. Texereau, and J. P. Mira.
[Genetic polymorphisms and infections].
Med Mal Infect, 36 :314–321, Jun 2006.

[22] P. J. Delves and I. M. Roitt.
The immune system. First of two parts.
N. Engl. J. Med., 343 :37–49, Jul 2000.

[23] R C Bone, C J Grodzin, and R A Balk.
Sepsis : a new hypothesis for pathogenesis of the disease process.
Chest, 112(1) :235 – 243, 1997.
ISSN 0012-3692.
URL http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mnh&AN=9228382&lang=fr&site=ehost-live.

[24] Y. Delneste, C. Beauvillain, and P. Jeannin.
[Innate immunity : structure and function of TLRs].
Med Sci (Paris), 23 :67–73, Jan 2007.

[25] Tom van der Poll and Steven M Opal.
Host-pathogen interactions in sepsis.
The Lancet Infectious Diseases, 8(1) :32 – 43, 2008.
ISSN 1473-3099.
URL http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mnh&AN=18063412&lang=fr&site=ehost-live.

[26] S. Akira and K. Takeda.
Toll-like receptor signalling.
Nat. Rev. Immunol., 4 :499–511, Jul 2004.

[27] Naohiro Inohara and Gabriel Nunez.
Cell death and immunity : Nods : intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis.
Nature Reviews Immunology, 3(5) :371, 2003.
ISSN 14741733.
URL http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=9873095&lang=fr&site=ehost-live.

[28] S. E. Girardin, I. G. Boneca, L. A. Carneiro, A. Antignac, M. Jehanno, J. Viala, K. Tedin, M. K. Taha, A. Labigne, U. Zahringer, A. J. Coyle, P. S. DiStefano, J. Bertin, P. J. Sansonetti, and D. J. Philpott.
Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan.
Science, 300 :1584–1587, Jun 2003.

[29] S. E. Girardin, L. H. Travassos, M. Herve, D. Blanot, I. G. Boneca, D. J. Philpott, P. J. Sansonetti, and D. Mengin-Lecreulx.

Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2.
J. Biol. Chem., 278 :41702–41708, Oct 2003.

[30] M. Levi, T. van der Poll, and H. R. Buller.
Bidirectional relation between inflammation and coagulation.
Circulation, 109 :2698–2704, Jun 2004.

[31] J. Cohen.
The immunopathogenesis of sepsis.
Nature, 420 :885–891, 2002.

[32] Ruslan Medzhitov and Charles Janeway.
Innate immunity.
New England Journal of Medicine, 343(5) :338–344, 2000.
URL http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200008033430506.

[33] Didier Fradelizi.
Cytokines : médiateurs de la réponse immunitaire, de la réaction inflammatoire et de l'hématopoïèse.
EMC Hématologie, 13-000-M-84, 1999.

[34] K. Tschaikowsky, M. Hedwig-Geissing, A. Schiele, F. Bremer, M. Schywalsky, and J. Schuttler.
Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis : Longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes in T-cell subsets in septic and postoperative patients.
Crit. Care Med., 30 :1015–1023, May 2002.

[35] H. Schreuder, C. Tardif, S. Trump-Kallmeyer, A. Soffientini, E. Sarubbi, A. Akeson, T. Bowlin, S. Yanofsky, and R. W. Barrett.
A new cytokine-receptor binding mode revealed by the crystal structure of the IL-1 receptor with an antagonist.
Nature, 386 :194–200, Mar 1997.

[36] C. A. Dinarello.
Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist.
Int. Rev. Immunol., 16 :457–499, 1998.

[37] S. M. Opal, J. C. Wherry, and P. Grint.
Interleukin-10 : potential benefits and possible risks in clinical infectious diseases.
Clin. Infect. Dis., 27 :1497–1507, Dec 1998.

[38] C. J. Clarke, A. Hales, A. Hunt, and B. M. Foxwell.

IL-10-mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity.
Eur. J. Immunol., 28 :1719–1726, May 1998.

[39] T. Fumeaux and J. Pugin.
Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock.
Am. J. Respir. Crit. Care Med., 166 :1475–1482, Dec 2002.

[40] M. A. Brown and J. Hural.
Functions of IL-4 and control of its expression.
Crit. Rev. Immunol., 17 :1–32, 1997.

[41] A. J. Brady, P. A. Poole-Wilson, S. E. Harding, and J. B. Warren.
Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia.
Am. J. Physiol., 263 :H1963–1966, Dec 1992.

[42] J. F. Dhainaut, M. F. Huyghebaert, J. F. Monsallier, G. Lefevre, J. Dall'Ava-Santucci, F. Brunet, D. Villemant, A. Carli, and D. Raichvarg.
Coronary hemodynamics and myocardial metabolism of lactate, free fatty acids, glucose, and ketones in patients with septic shock.
Circulation, 75 :533–541, Mar 1987.

[43] D. Annane, V. Sebille, G. Troche, J. C. Raphael, P. Gajdos, and E. Bellissant.
A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotropin.
JAMA, 283 :1038–1045, Feb 2000.

[44] D. W. Landry, H. R. Levin, E. M. Gallant, R. C. Ashton, S. Seo, D. D'Alessandro, M. C. Oz, and J. A. Oliver.
Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock.
Circulation, 95 :1122–1125, Mar 1997.

[45] T. Sharshar, F. Gray, G. Lorin de la Grandmaison, N. S. Hopkinson, E. Ross, A. Dorandeu, D. Orlikowski, J. C. Raphael, P. Gajdos, and D. Annane.
Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock.
Lancet, 362 :1799–1805, Nov 2003.

[46] S. E. Calvano, W. Xiao, D. R. Richards, R. M. Felciano, H. V. Baker, R. J. Cho, R. O. Chen, B. H. Brownstein, J. P. Cobb, S. K. Tschoeke, C. Miller-Graziano, L. L. Moldawer, M. N. Mindrinos, R. W. Davis, R. G. Tompkins, and S. F. Lowry.
A network-based analysis of systemic inflammation in humans.
Nature, 437(7061) :1032–1037, Oct 2005.

[47] J. Schmutz, J. Wheeler, J. Grimwood, M. Dickson, J. Yang, C. Caoile, E. Bajorek, S. Black, Y. M. Chan, M. Denys, J. Escobar, D. Flowers, D. Fotopulos, C. Garcia, M. Gomez, E. Gonzales, L. Haydu, F. Lopez, L. Ramirez, J. Retterer, A. Rodriguez, S. Rogers, A. Salazar, M. Tsai, and R. M. Myers.
Quality assessment of the human genome sequence.
Nature, 429(6990) :365–368, May 2004.

[48] International Human Genome Sequencing Consortium.
Finishing the euchromatic sequence of the human genome.
Nature, 431(7011) :931–945, Oct 2004.

[49] Florian Hahne, Wolfgang Huber, Robert Gentleman, and Seth Falcon.
Bioconductor Case Studies (Use R).
Springer, 1 edition, August 2008.
ISBN 0387772391.
URL http://www.worldcat.org/isbn/0387772391.

[50] Robert Gentleman, Vincent Carey, Wolfgang Huber, Rafael Irizarry, and Sandrine Dudoit.
Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor.
Springer Science & Business Media, 2006.

[51] A. Sutherland, M. Thomas, R. A. Brandon, R. B. Brandon, J. Lipman, B. Tang, A. McLean, R. Pascoe, G. Price, T. Nguyen, G. Stone, and D. Venter.
Development and validation of a novel molecular biomarker diagnostic test for the early detection of sepsis.
Crit Care, 15(3) :R149, 2011.

[52] K. Takenaka, E. Ogawa, H. Wada, and T. Hirata.
Systemic inflammatory response syndrome and surgical stress in thoracic surgery.
J Crit Care, 21(1) :48–53, Mar 2006.

[53] W. J. Lemon, J. J. Palatini, R. Krahe, and F. A. Wright.
Theoretical and experimental comparisons of gene expression indexes for oligonucleotide arrays.
Bioinformatics, 18(11) :1470–1476, Nov 2002.

[54] C. Li and W. H. Wong.
Model-based analysis of oligonucleotide arrays : expression index computation and outlier detection.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98(1) :31–36, Jan 2001.

[55] Cheng Li and Wing Wong.
Model-based analysis of oligonucleotide arrays : model validation, design issues and standard error application.

Genome Biology, 2 :1–11, 2001.
ISSN 1465-6906.
URL http://dx.doi.org/10.1186/gb-2001-2-8-research0032.
10.1186/gb-2001-2-8-research0032.

[56] K. Shakya, H. J. Ruskin, G. Kerr, M. Crane, and J. Becker.
Comparison of microarray preprocessing methods.
Adv. Exp. Med. Biol., 680 :139–147, 2010.

[57] A. Conesa, M. J. Nueda, A. Ferrer, and M. Talon.
maSigPro : a method to identify significantly differential expression profiles in time-course microarray experiments.
Bioinformatics, 22(9) :1096–1102, May 2006.

[58] G. K. Smyth.
Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments.
Stat Appl Genet Mol Biol, 3 :Article3, 2004.

[59] Gordon K Smyth.
Limma : linear models for microarray data.
Springer, 2005.

[60] Y. Benjamini and Y Hochberg.
Controlling the false discovery rate : A practical and powerful approach to multiple testing.
jrss, 57 :289–300, 1995.

[61] C. Monteiro Sousa, J. P. Boissel, F. Gueyffier, and G. Olivera-Botello.
Comparative transcriptomic analysis between an artificially induced SIRS in healthy individuals and spontaneous sepsis.
C. R. Biol., 338(10) :635–642, Oct 2015.

[62] T. Kawai and S. Akira.
TLR signaling.
Cell Death Differ., 13(5) :816–825, May 2006.

[63] T. Kawai and S. Akira.
The role of pattern-recognition receptors in innate immunity : update on Toll-like receptors.
Nat. Immunol., 11(5) :373–384, May 2010.

[64] L. A. O'Neill and A. G. Bowie.
The family of five : TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling.
Nat. Rev. Immunol., 7(5) :353–364, May 2007.

[65] J. Brown, H. Wang, G. N. Hajishengallis, and M. Martin.
TLR-signaling networks : an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk.
J. Dent. Res., 90(4) :417–427, Apr 2011.

[66] C. Lonez, M. F. Lensink, M. Vandenbranden, and J. M. Ruysschaert.
Cationic lipids activate cellular cascades. Which receptors are involved ?
Biochim. Biophys. Acta, 1790(6) :425–430, Jun 2009.

[67] M. Gangloff and N. J. Gay.
MD-2 : the Toll 'gatekeeper' in endotoxin signalling.
Trends Biochem. Sci., 29(6) :294–300, Jun 2004.

[68] K. A. Fitzgerald, D. C. Rowe, and D. T. Golenbock.
Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex.
Microbes Infect., 6(15) :1361–1367, Dec 2004.

[69] B. S. Park, D. H. Song, H. M. Kim, B. S. Choi, H. Lee, and J. O. Lee.
The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex.
Nature, 458(7242) :1191–1195, Apr 2009.

[70] S. Akira.
Toll-like receptor signaling.
J. Biol. Chem., 278(40) :38105–38108, Oct 2003.

[71] E. M. Palsson-McDermott and L. A. O'Neill.
Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4.
Immunology, 113(2) :153–162, Oct 2004.

[72] Y. C. Lu, W. C. Yeh, and P. S. Ohashi.
LPS/TLR4 signal transduction pathway.
Cytokine, 42(2) :145–151, May 2008.

[73] J. C. Kagan, T. Su, T. Horng, A. Chow, S. Akira, and R. Medzhitov.
TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta.
Nat. Immunol., 9(4) :361–368, Apr 2008.

[74] M. Yamamoto, S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, K. Hoshino, T. Kaisho, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira.
TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway.
Nat. Immunol., 4(11) :1144–1150, Nov 2003.

[75] N. Tanimura, S. Saitoh, F. Matsumoto, S. Akashi-Takamura, and K. Miyake.

Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 368(1) :94–99, Mar 2008.

[76] H. Hacker, V. Redecke, B. Blagoev, I. Kratchmarova, L. C. Hsu, G. G. Wang, M. P. Kamps, E. Raz, H. Wagner, G. Hacker, M. Mann, and M. Karin.
Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6.
Nature, 439(7073) :204–207, Jan 2006.

[77] P. H. Tseng, A. Matsuzawa, W. Zhang, T. Mino, D. A. Vignali, and M. Karin.
Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines.
Nat. Immunol., 11(1) :70–75, Jan 2010.

[78] F. Ikeda, C. M. Hecker, A. Rozenknop, R. D. Nordmeier, V. Rogov, K. Hofmann, S. Akira, V. Dotsch, and I. Dikic.
Involvement of the ubiquitin-like domain of TBK1/IKK-i kinases in regulation of IFN-inducible genes.
EMBO J., 26(14) :3451–3462, Jul 2007.

[79] P. N. Moynagh.
TLR signalling and activation of IRFs : revisiting old friends from the NF-kappaB pathway.
Trends Immunol., 26(9) :469–476, Sep 2005.

[80] K. Shuai and B. Liu.
Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system.
Nat. Rev. Immunol., 3(11) :900–911, Nov 2003.

[81] S. V. Kotenko and J. A. Langer.
Full house : 12 receptors for 27 cytokines.
Int. Immunopharmacol., 4(5) :593–608, May 2004.

[82] P. J. Murray.
The JAK-STAT signaling pathway : input and output integration.
J. Immunol., 178(5) :2623–2629, Mar 2007.

[83] L. A. O'Sullivan, C. Liongue, R. S. Lewis, S. E. Stephenson, and A. C. Ward.
Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease.
Mol. Immunol., 44(10) :2497–2506, Apr 2007.

[84] R. A. Piganis, N. A. De Weerd, J. A. Gould, C. W. Schindler, A. Mansell, S. E. Nicholson, and P. J. Hertzog.
Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 inhibits type I interferon (IFN) signaling via the interferon alpha receptor (IFNAR1)-associated tyrosine kinase Tyk2.

J. Biol. Chem., 286(39) :33811–33818, Sep 2011.

[85] J. S. Rawlings, K. M. Rosler, and D. A. Harrison.
The JAK/STAT signaling pathway.
J. Cell. Sci., 117(Pt 8) :1281–1283, Mar 2004.

[86] R. Nunez Miguel, J. Wong, J. F. Westoll, H. J. Brooks, L. A. O'Neill, N. J. Gay, C. E. Bryant, and T. P. Monie.
A dimer of the Toll-like receptor 4 cytoplasmic domain provides a specific scaffold for the recruitment of signalling adaptor proteins.
PLoS ONE, 2(8) :e788, 2007.

[87] S. F. Liu and A. B. Malik.
NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation.
Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., 290(4) :L622–L645, Apr 2006.

[88] K. G. Lee, S. Xu, Z. H. Kang, J. Huo, M. Huang, D. Liu, O. Takeuchi, S. Akira, and K. P. Lam.
Bruton's tyrosine kinase phosphorylates Toll-like receptor 3 to initiate antiviral response.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 109(15) :5791–5796, Apr 2012.

[89] C. A. Jefferies, S. Doyle, C. Brunner, A. Dunne, E. Brint, C. Wietek, E. Walch, T. Wirth, and L. A. O'Neill.
Bruton's tyrosine kinase is a Toll/interleukin-1 receptor domain-binding protein that participates in nuclear factor kappaB activation by Toll-like receptor 4.
J. Biol. Chem., 278(28) :26258–26264, Jul 2003.

[90] P. G. Motshwene, M. C. Moncrieffe, J. G. Grossmann, C. Kao, M. Ayaluru, A. M. Sandercock, C. V. Robinson, E. Latz, and N. J. Gay.
An oligomeric signaling platform formed by the Toll-like receptor signal transducers MyD88 and IRAK-4.
J. Biol. Chem., 284(37) :25404–25411, Sep 2009.

[91] S. C. Lin, Y. C. Lo, and H. Wu.
Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling.
Nature, 465(7300) :885–890, Jun 2010.

[92] N. J. Gay, M. Gangloff, and L. A. O'Neill.
What the Myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity.
Trends Immunol., 32(3) :104–109, Mar 2011.

[93] P. Towb, H. Sun, and S. A. Wasserman.
Tube Is an IRAK-4 homolog in a Toll pathway adapted for development and immunity.
J Innate Immun, 1(4) :309–321, 2009.

[94] T. Kawagoe, S. Sato, K. Matsushita, H. Kato, K. Matsui, Y. Kumagai, T. Saitoh, T. Kawai, O. Takeuchi, and S. Akira.
Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2.
Nat. Immunol., 9(6) :684–691, Jun 2008.

[95] H. Ye, J. R. Arron, B. Lamothe, M. Cirilli, T. Kobayashi, N. K. Shevde, D. Segal, O. K. Dzivenu, M. Vologodskaia, M. Yim, K. Du, S. Singh, J. W. Pike, B. G. Darnay, Y. Choi, and H. Wu.
Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling.
Nature, 418(6896) :443–447, Jul 2002.

[96] W. Dong, Y. Liu, J. Peng, L. Chen, T. Zou, H. Xiao, Z. Liu, W. Li, Y. Bu, and Y. Qi.
The IRAK-1-BCL10-MALT1-TRAF6-TAK1 cascade mediates signaling to NF-kappaB from Toll-like receptor 4.
J. Biol. Chem., 281(36) :26029–26040, Sep 2006.

[97] S. Gottipati, N. L. Rao, and W. P. Fung-Leung.
IRAK1 : a critical signaling mediator of innate immunity.
Cell. Signal., 20(2) :269–276, Feb 2008.

[98] S. E. Keating, G. M. Maloney, E. M. Moran, and A. G. Bowie.
IRAK-2 participates in multiple toll-like receptor signaling pathways to NFkappaB via activation of TRAF6 ubiquitination.
J. Biol. Chem., 282(46) :33435–33443, Nov 2007.

[99] B. Lamothe, A. Besse, A. D. Campos, W. K. Webster, H. Wu, and B. G. Darnay.
Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I kappa B kinase activation.
J. Biol. Chem., 282(6) :4102–4112, Feb 2007.

[100] Z. P. Xia, L. Sun, X. Chen, G. Pineda, X. Jiang, A. Adhikari, W. Zeng, and Z. J. Chen.
Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains.
Nature, 461(7260) :114–119, Sep 2009.

[101] A. Kanayama, R. B. Seth, L. Sun, C. K. Ea, M. Hong, A. Shaito, Y. H. Chiu, L. Deng, and Z. J. Chen.
TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains.
Mol. Cell, 15(4) :535–548, Aug 2004.

[102] Y. Kulathu, M. Akutsu, A. Bremm, K. Hofmann, and D. Komander.
Two-sided ubiquitin binding explains specificity of the TAB2 NZF domain.
Nat. Struct. Mol. Biol., 16(12) :1328–1330, Dec 2009.

[103] C. Wang, L. Deng, M. Hong, G. R. Akkaraju, J. Inoue, and Z. J. Chen.
TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK.
Nature, 412(6844) :346–351, Jul 2001.

[104] Y. Fleming, C. G. Armstrong, N. Morrice, A. Paterson, M. Goedert, and P. Cohen.
Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7.
Biochem. J., 352 Pt 1 :145–154, Nov 2000.

[105] M. Sundarrajan, D. L. Boyle, M. Chabaud-Riou, D. Hammaker, and G. S. Firestein.
Expression of the MAPK kinases MKK-4 and MKK-7 in rheumatoid arthritis and their role as key regulators of JNK.
Arthritis Rheum., 48(9) :2450–2460, Sep 2003.

[106] A. Banerjee and S. Gerondakis.
Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system.
Immunol. Cell Biol., 85(6) :420–424, 2007.

[107] T. Ishitani, G. Takaesu, J. Ninomiya-Tsuji, H. Shibuya, R. B. Gaynor, and K. Matsumoto.
Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling.
EMBO J., 22(23) :6277–6288, Dec 2003.

[108] L. A. Solt and M. J. May.
The IkappaB kinase complex : master regulator of NF-kappaB signaling.
Immunol. Res., 42(1-3) :3–18, 2008.

[109] L. A. Solt, L. A. Madge, and M. J. May.
NEMO-binding domains of both IKKalpha and IKKbeta regulate IkappaB kinase complex assembly and classical NF-kappaB activation.
J. Biol. Chem., 284(40) :27596–27608, Oct 2009.

[110] A. Weber, P. Wasiliew, and M. Kracht.
Interleukin-1 (IL-1) pathway.
Sci Signal, 3(105) :cm1, 2010.

[111] L. Verstrepen, T. Bekaert, T. L. Chau, J. Tavernier, A. Chariot, and R. Beyaert.
TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB : variations on a common theme.
Cell. Mol. Life Sci., 65(19) :2964–2978, Oct 2008.

[112] L. M. Workman and H. Habelhah.
TNFR1 signaling kinetics : Spatiotemporal control of three phases of IKK activation by posttranslational modification.
Cell. Signal., 25(8) :1654–1664, Aug 2013.

[113] W. M. Chu.
Tumor necrosis factor.
Cancer Lett., 328(2) :222–225, Jan 2013.

[114] S. Siegemund and K. Sauer.
Balancing pro- and anti-inflammatory TLR4 signaling.
Nat. Immunol., 13(11) :1031–1033, Nov 2012.

[115] M. H. Laird, S. H. Rhee, D. J. Perkins, A. E. Medvedev, W. Piao, M. J. Fenton, and S. N. Vogel.
TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling.
J. Leukoc. Biol., 85(6) :966–977, Jun 2009.

[116] T. D. Troutman, J. F. Bazan, and C. Pasare.
Toll-like receptors, signaling adapters and regulation of the pro-inflammatory response by PI3K.
Cell Cycle, 11(19) :3559–3567, Oct 2012.

[117] B. Vanhaesebroeck, J. Guillermet-Guibert, M. Graupera, and B. Bilanges.
The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 11(5) :329–341, May 2010.

[118] K. Hazeki, K. Nigorikawa, and O. Hazeki.
Role of phosphoinositide 3-kinase in innate immunity.
Biol. Pharm. Bull., 30(9) :1617–1623, Sep 2007.

[119] T. Fukao and S. Koyasu.
PI3K and negative regulation of TLR signaling.
Trends Immunol., 24(7) :358–363, Jul 2003.

[120] M Martin, RE Schifferle, N Cuesta, SN Vogel, J Katz, and SM Michalek.
Role of the phosphatidylinositol 3 kinase-akt pathway in the regulation of il-10 and il-12 by porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide.
J Immunol, 171 :717–725, 2003.

[121] M. Ruse and U. G. Knaus.
New players in TLR-mediated innate immunity : PI3K and small Rho GTPases.
Immunol. Res., 34(1) :33–48, 2006.

[122] M Guha and N Mackman.
The phosphatidylinositol 3-kinase-akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells.
J Biol Chem, 277 :32124–32132, 2002.
doi : 10.1074/jbc.M203298200.

[123] M. Martin, K. Rehani, R. S. Jope, and S. M. Michalek.
Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3.
Nat. Immunol., 6(8) :777–784, Aug 2005.

[124] H. Wang, J. Brown, and M. Martin.
Glycogen synthase kinase 3 : a point of convergence for the host inflammatory response.
Cytokine, 53(2) :130–140, Feb 2011.

[125] T. D. Troutman, W. Hu, S. Fulenchek, T. Yamazaki, T. Kurosaki, J. F. Bazan, and C. Pasare.
Role for B-cell adapter for PI3K (BCAP) as a signaling adapter linking Toll-like receptors (TLRs) to serine/threonine kinases PI3K/Akt.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 109(1) :273–278, Jan 2012.

[126] T. Weichhart, G. Costantino, M. Poglitsch, M. Rosner, M. Zeyda, K. M. Stuhlmeier, T. Kolbe, T. M. Stulnig, W. H. Horl, M. Hengstschlager, M. Muller, and M. D. Saemann.
The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response.
Immunity, 29(4) :565–577, Oct 2008.

[127] M. D. Saemann, M. Haidinger, M. Hecking, W. H. Horl, and T. Weichhart.
The multifunctional role of mTOR in innate immunity : implications for transplant immunity.
Am. J. Transplant., 9(12) :2655–2661, Dec 2009.

[128] M. Laplante and D. M. Sabatini.
mTOR signaling at a glance.
J. Cell. Sci., 122(Pt 20) :3589–3594, Oct 2009.

[129] J. D. Powell, K. N. Pollizzi, E. B. Heikamp, and M. R. Horton.
Regulation of immune responses by mTOR.
Annu. Rev. Immunol., 30 :39–68, 2012.

[130] T. Weichhart and M. D. Saemann.
The multiple facets of mTOR in immunity.
Trends Immunol., 30(5) :218–226, May 2009.

[131] H. Wang, J. Brown, Z. Gu, C. A. Garcia, R. Liang, P. Alard, E. Beurel, R. S. Jope, T. Greenway, and M. Martin.
Convergence of the mammalian target of rapamycin complex 1- and glycogen synthase kinase 3-β-signaling pathways regulates the innate inflammatory response.
J. Immunol., 186(9) :5217–5226, May 2011.

[132] E. Beurel and R. S. Jope.
Differential regulation of STAT family members by glycogen synthase kinase-3.
J. Biol. Chem., 283(32) :21934–21944, Aug 2008.

[133] A. W. Thomson, H. R. Turnquist, and G. Raimondi.
Immunoregulatory functions of mTOR inhibition.
Nat. Rev. Immunol., 9(5) :324–337, May 2009.

[134] H. R. Turnquist, J. Cardinal, C. Macedo, B. R. Rosborough, T. L. Sumpter, D. A. Geller, D. Metes, and A. W. Thomson.
mTOR and GSK-3 shape the CD4+ T-cell stimulatory and differentiation capacity of myeloid DCs after exposure to LPS.
Blood, 115(23) :4758–4769, Jun 2010.

[135] A. K. Baker, R. Wang, N. Mackman, and J. P. Luyendyk.
Rapamycin enhances LPS induction of tissue factor and tumor necrosis factor-alpha expression in macrophages by reducing IL-10 expression.
Mol. Immunol., 46(11-12) :2249–2255, Jul 2009.

[136] T. Weichhart, M. Haidinger, K. Katholnig, C. Kopecky, M. Poglitsch, C. Lassnig, M. Rosner, G. J. Zlabinger, M. Hengstschlager, M. Muller, W. H. Horl, and M. D. Saemann.
Inhibition of mTOR blocks the anti-inflammatory effects of glucocorticoids in myeloid immune cells.
Blood, 117(16) :4273–4283, Apr 2011.

[137] H. Wang, J. Brown, C. A. Garcia, Y. Tang, M. R. Benakanakere, T. Greenway, P. Alard, D. F. Kinane, and M. Martin.
The role of glycogen synthase kinase 3 in regulating IFN-β-mediated IL-10 production.
J. Immunol., 186(2) :675–684, Jan 2011.

[138] J. R. Woodgett and P. S. Ohashi.
GSK3 : an in-Toll-erant protein kinase ?
Nat. Immunol., 6(8) :751–752, Aug 2005.

[139] R. S. Jope and G. V. Johnson.
The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3.
Trends Biochem. Sci., 29(2) :95–102, Feb 2004.

[140] R. Cortes-Vieyra, A. Bravo-Patino, J. J. Valdez-Alarcon, M. C. Juarez, B. B. Finlay, and V. M. Baizabal-Aguirre.
Role of glycogen synthase kinase-3 beta in the inflammatory response caused by bacterial pathogens.
J Inflamm (Lond), 9(1) :23, 2012.

[141] N. Coant, M. Simon-Rudler, T. Gustot, M. Fasseu, S. Gandoura, K. Ragot, W. Abdel-Razek, D. Thabut, P. Letteron, E. Ogier-Denis, R. Ouziel, J. Deviere, G. Lizard, Z. Tellier, D. Lebrec, and R. Moreau.
Glycogen synthase kinase 3 involvement in the excessive proinflammatory response to LPS in patients with decompensated cirrhosis.
J. Hepatol., 55(4) :784–793, Oct 2011.

[142] R. S. Jope, C. J. Yuskaitis, and E. Beurel.
Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) : inflammation, diseases, and therapeutics.
Neurochem. Res., 32(4-5) :577–595, 2007.

[143] C. Hofmann, N. Dunger, J. Scholmerich, W. Falk, and F. Obermeier.
Glycogen synthase kinase 3-β : a master regulator of toll-like receptor-mediated chronic intestinal inflammation.
Inflamm. Bowel Dis., 16(11) :1850–1858, Nov 2010.

[144] A. Y. Wen, K. M. Sakamoto, and L. S. Miller.
The role of the transcription factor CREB in immune function.
J. Immunol., 185(11) :6413–6419, Dec 2010.

[145] M. Ohtani, S. Nagai, S. Kondo, S. Mizuno, K. Nakamura, M. Tanabe, T. Takeuchi, S. Matsuda, and S. Koyasu.
Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells.
Blood, 112(3) :635–643, Aug 2008.

[146] F. Y. Liew, D. Xu, E. K. Brint, and L. A. O'Neill.
Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses.
Nat. Rev. Immunol., 5(6) :446–458, Jun 2005.

[147] T. Kondo, T. Kawai, and S. Akira.
Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling.
Trends Immunol., 33(9) :449–458, Sep 2012.

[148] S. K. Biswas and E. Lopez-Collazo.
Endotoxin tolerance : new mechanisms, molecules and clinical significance.
Trends Immunol., 30(10) :475–487, Oct 2009.

[149] S. M. Miggin and L. A. O'Neill.
New insights into the regulation of TLR signaling.
J. Leukoc. Biol., 80(2) :220–226, Aug 2006.

[150] M. Saraiva and A. O'Garra.
The regulation of IL-10 production by immune cells.
Nat. Rev. Immunol., 10(3) :170–181, Mar 2010.

[151] P. J. Murray.
Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response.
Curr Opin Pharmacol, 6(4) :379–386, Aug 2006.

[152] K. J. Staples, T. Smallie, L. M. Williams, A. Foey, B. Burke, B. M. Foxwell, and L. Ziegler-Heitbrock.
IL-10 induces IL-10 in primary human monocyte-derived macrophages via the transcription factor Stat3.
J. Immunol., 178(8) :4779–4785, Apr 2007.

[153] M. J. Pattison, K. F. Mackenzie, and J. S. Arthur.
Inhibition of JAKs in macrophages increases lipopolysaccharide-induced cytokine production by blocking IL-10-mediated feedback.
J. Immunol., 189(6) :2784–2792, Sep 2012.

[154] C. Niemand, A. Nimmesgern, S. Haan, P. Fischer, F. Schaper, R. Rossaint, P. C. Heinrich, and G. Muller-Newen.
Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3.
J. Immunol., 170(6) :3263–3272, Mar 2003.

[155] H. Qin, K. L. Roberts, S. A. Niyongere, Y. Cong, C. O. Elson, and E. N. Benveniste.
Molecular mechanism of lipopolysaccharide-induced SOCS-3 gene expression in macrophages and microglia.
J. Immunol., 179(9) :5966–5976, Nov 2007.

[156] M. Kubo, T. Hanada, and A. Yoshimura.
Suppressors of cytokine signaling and immunity.
Nat. Immunol., 4(12) :1169–1176, Dec 2003.

[157] A. Yoshimura, T. Naka, and M. Kubo.
SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation.
Nat. Rev. Immunol., 7(6) :454–465, Jun 2007.

[158] W. S. Alexander and D. J. Hilton.
The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response.
Annu. Rev. Immunol., 22 :503–529, 2004.

[159] A. Yoshimura, M. Suzuki, R. Sakaguchi, T. Hanada, and H. Yasukawa.
SOCS, Inflammation, and Autoimmunity.
Front Immunol, 3 :20, 2012.

[160] J. J. Babon, N. J. Kershaw, J. M. Murphy, L. N. Varghese, A. Laktyushin, S. N. Young, I. S. Lucet, R. S. Norton, and N. A. Nicola.

Suppression of cytokine signaling by SOCS3 : characterization of the mode of inhibition and the basis of its specificity.
Immunity, 36(2) :239–250, Feb 2012.

[161] R. Nakagawa, T. Naka, H. Tsutsui, M. Fujimoto, A. Kimura, T. Abe, E. Seki, S. Sato, O. Takeuchi, K. Takeda, S. Akira, K. Yamanishi, I. Kawase, K. Nakanishi, and T. Kishimoto.
SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses.
Immunity, 17(5) :677–687, Nov 2002.

[162] I. Kinjyo, T. Hanada, K. Inagaki-Ohara, H. Mori, D. Aki, M. Ohishi, H. Yoshida, M. Kubo, and A. Yoshimura.
SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation.
Immunity, 17(5) :583–591, Nov 2002.

[163] A. Ryo, F. Suizu, Y. Yoshida, K. Perrem, Y. C. Liou, G. Wulf, R. Rottapel, S. Yamaoka, and K. P. Lu.
Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA.
Mol. Cell, 12(6) :1413–1426, Dec 2003.

[164] A. Mansell, R. Smith, S. L. Doyle, P. Gray, J. E. Fenner, P. J. Crack, S. E. Nicholson, D. J. Hilton, L. A. O'Neill, and P. J. Hertzog.
Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation.
Nat. Immunol., 7(2) :148–155, Feb 2006.

[165] H. Frobøse, S. G. Rønn, P. E. Heding, H. Mendoza, P. Cohen, T. Mandrup-Poulsen, and N. Billestrup.
Suppressor of cytokine Signaling-3 inhibits interleukin-1 signaling by targeting the TRAF-6/TAK1 complex.
Mol. Endocrinol., 20(7) :1587–1596, Jul 2006.

[166] L. Verstrepen, K. Verhelst, G. van Loo, I. Carpentier, S. C. Ley, and R. Beyaert.
Expression, biological activities and mechanisms of action of A20 (TNFAIP3).
Biochem. Pharmacol., 80(12) :2009–2020, Dec 2010.

[167] Edward W Harhaj and Vishva M Dixit.
Deubiquitinases in the regulation of NF-κB signaling.
Cell research, 21(1) :22–39, 2010.

[168] E. W. Harhaj and V. M. Dixit.
Regulation of NF-κB by deubiquitinases.
Immunol. Rev., 246(1) :107–124, Mar 2012.

[169] N. Shembade and E. W. Harhaj.
Regulation of NF-κB signaling by the A20 deubiquitinase.

Cell. Mol. Immunol., 9(2) :123–130, Mar 2012.

[170] J. Ruland.
Return to homeostasis : downregulation of NF-κB responses.
Nat. Immunol., 12(8) :709–714, Aug 2011.

[171] C. van 't Veer, P. S. van den Pangaart, M. A. van Zoelen, M. de Kruif, R. S. Birjmohun, E. S. Stroes, A. F. de Vos, and T. van der Poll.
Induction of IRAK-M is associated with lipopolysaccharide tolerance in a human endotoxemia model.
J. Immunol., 179(10) :7110–7120, Nov 2007.

[172] P. Escoll, C. del Fresno, L. Garcia, G. Valles, M. J. Lendinez, F. Arnalich, and E. Lopez-Collazo.
Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 311(2) :465–472, Nov 2003.

[173] K. Kobayashi, L. D. Hernandez, J. E. Galan, C. A. Janeway, R. Medzhitov, and R. A. Flavell.
IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling.
Cell, 110(2) :191–202, Jul 2002.

[174] S. Flannery and A. G. Bowie.
The interleukin-1 receptor-associated kinases : critical regulators of innate immune signalling.
Biochem. Pharmacol., 80(12) :1981–1991, Dec 2010.

[175] D. U. Ferreiro and E. A. Komives.
Molecular mechanisms of system control of NF-kappaB signaling by IkappaBalpha.
Biochemistry, 49(8) :1560–1567, Mar 2010.

[176] A. Majdalawieh and H. S. Ro.
Regulation of IkappaBalpha function and NF-kappaB signaling : AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages.
Mediators Inflamm., 2010 :823821, 2010.

[177] A. Poret and J. P. Boissel.
An in silico target identification using Boolean network attractors : Avoiding pathological phenotypes.
C. R. Biol., 337(12) :661–678, Dec 2014.

[178] Assieh Saadatpour and Réka Albert.
Boolean modeling of biological regulatory networks : a methodology tutorial.
Methods, 2012.

[179] George Boole.
The mathematical analysis of logic, being an essay towards a calculus of deductive reasoning, originally published in cambridge by macmillan, barclay, & macmillan.
Reprinted in Oxford by Basil Blackwell, page 175, 1847.

[180] Albert-Laszlo Barabasi and Zoltan N Oltvai.
Network biology : understanding the cell's functional organization.
Nature Reviews Genetics, 5(2) :101–113, 2004.

[181] Xiaowei Zhu, Mark Gerstein, and Michael Snyder.
Getting connected : analysis and principles of biological networks.
Genes & Development, 21(9) :1010–1024, 2007.

[182] Lotfi Asker Zadeh.
Fuzzy logic.
Computer, 21(4) :83–93, 1988.

[183] Arnaud Poret, Claudio Monteiro Sousa, and Jean-Pierre Boissel.
Enhancing boolean networks with fuzzy operators and edge tuning.
arXiv :1407.1135, 2014.

[184] Ilía Nikolaevich Bronshtein, Konstantin A Semendyayev, Gerhard Musiol, and Heiner Muehlig.
Algorithms of graph theory.
In *Handbook of Mathematics*, chapter 5, pages 348–359. Springer, 2007.

[185] Stuart A Kauffman.
Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets.
Journal of theoretical biology, 22(3) :437–467, 1969.

[186] Leon Glass.
Classification of biological networks by their qualitative dynamics.
Journal of Theoretical Biology, 54(1) :85–107, 1975.

[187] Lee E Ostrander and Joe E Brand.
Functional boolean models for systems with continuous variables.
Journal of theoretical biology, 38(3) :665–675, 1973.

[188] René Thomas.
Boolean formalization of genetic control circuits.
Journal of theoretical biology, 42(3) :563–585, 1973.

[189] Réka Albert and Juilee Thakar.
Boolean modeling : a logic-based dynamic approach for understanding signaling and regulatory networks and for making useful predictions.
Wiley Interdisciplinary Reviews : Systems Biology and Medicine, 6(5) :353–369, 2014.

[190] Rui-Sheng Wang, Assieh Saadatpour, and Reka Albert.
Boolean modeling in systems biology : an overview of methodology and applications.
Physical biology, 9(5) :055001, 2012.

[191] István Albert, Juilee Thakar, Song Li, Ranran Zhang, and Réka Albert.
Boolean network simulations for life scientists.
Source code for biology and medicine, 3(1) :1–8, 2008.

[192] Stefan Bornholdt.
Boolean network models of cellular regulation : prospects and limitations.
Journal of the Royal Society Interface, 5(Suppl 1) :S85–S94, 2008.

[193] Abhishek Garg, Alessandro Di Cara, Ioannis Xenarios, Luis Mendoza, and Giovanni De Micheli.
Synchronous versus asynchronous modeling of gene regulatory networks.
Bioinformatics, 24(17) :1917–1925, 2008.

[194] Ilía Nikolaevich Bronshtein, Konstantin A Semendyayev, Gerhard Musiol, and Heiner Muehlig.
Boolean algebras and switch algebra.
In *Handbook of mathematics*, chapter 5, pages 342–347. Springer, 2007.

[195] Minoru Kanehisa and Susumu Goto.
Kegg : kyoto encyclopedia of genes and genomes.
Nucleic Acids Research, 28(1) :27–30, 2000.

[196] David Croft, Gavin O'Kelly, Guanming Wu, Robin Haw, Marc Gillespie, Lisa Matthews, Michael Caudy, Phani Garapati, Gopal Gopinath, Bijay Jassal, et al.
Reactome : a database of reactions, pathways and biological processes.
Nucleic acids research, 39(suppl 1) :D691–D697, 2011.

[197] W. Piao, C. Song, H. Chen, M. A. Diaz, L. M. Wahl, K. A. Fitzgerald, L. Li, and A. E. Medvedev.
Endotoxin tolerance dysregulates MyD88- and Toll/IL-1R domain-containing adapter inducing IFN-beta-dependent pathways and increases expression of negative regulators of TLR signaling.
J. Leukoc. Biol., 86(4) :863–875, Oct 2009.

[198] T. S. Cole, M. Zhang, T. J. Standiford, M. Newstead, J. Luther, J. Zhang, C. C. Chen, and J. Y. Kao.
IRAK-M modulates expression of IL-10 and cell surface markers CD80 and MHC II after bacterial re-stimulation of tolerized dendritic cells.
Immunol. Lett., 144(1-2) :49–59, May 2012.

[199] F. Schmitz, A. Heit, S. Dreher, K. Eisenacher, J. Mages, T. Haas, A. Krug, K. P. Janssen, C. J. Kirschning, and H. Wagner.
Mammalian target of rapamycin (mTOR) orchestrates the defense program of innate immune cells.
Eur. J. Immunol., 38(11) :2981–2992, Nov 2008.