



HAL
open science

Pathologie inflammatoire : étude de la contribution des PAMP et DAMP

Brice Nativel

► **To cite this version:**

Brice Nativel. Pathologie inflammatoire : étude de la contribution des PAMP et DAMP. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de la Réunion, 2017. Français. NNT : 2017LARE0065 . tel-02900689

HAL Id: tel-02900689

<https://theses.hal.science/tel-02900689>

Submitted on 16 Jul 2020

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.



Université de la Réunion

Thèse présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LA REUNION

Spécialité : Biologie cellulaire, Biochimie, Biologie moléculaire

Présentée par

Brice NATIVEL

Pathologie inflammatoire : Etude de la contribution des PAMP et DAMP

Soutenue publiquement le 26 JUIN 2017

Composition du Jury :

Dr. Bénédicte PY	Université de Lyon 1 INSERM	Rapporteuse
Pr. Pierre-Emmanuel CHARLES	Université de Bourgogne CHU de Dijon	Rapporteur
Pr. Pascale GUIRAUD	Université de la Réunion	Examinatrice
Dr. Nathalie BECKER	Museum National d'Histoire Naturelle	Examinatrice
Dr. Wildriss VIRANAICKEN	Université de la Réunion	Encadrant de thèse
Pr. Christian LEFEBVRE D'HELLENCOURT	Université de la Réunion	Directeur de thèse

Remerciements

Cette thèse a débuté au sein du Groupe d'Etude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité (GEICO) dirigé par le Pr. Christian Lefebvre d'Hellencourt puis a continué dans l'unité mixte de recherche U1188 Diabète athérombose Thérapie Réunion Océan Indien (DÉTROI) dirigée par le Dr. Olivier Meilhac.

Ce travail a été rendu possible grâce au soutien financier de la Région Réunion et du Fonds Social Européen. Je remercie l'Université de la Réunion, l'École doctorale et la Structure Fédérative environnement, Biodiversité, Santé pour leur soutien financier. Je remercie également la plateforme CYROI pour m'avoir donné la possibilité de travailler dans de bonnes conditions.

J'adresse mes remerciements au Pr. Christian Lefebvre d'Hellencourt et au Dr. Olivier Meilhac pour m'avoir accueilli au sein de leurs équipes et permis d'y réaliser ce travail. Je vous exprime ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie mon directeur de thèse, le Pr. Christian Lefebvre d'Hellencourt sans qui cette thèse n'aurait pu voir le jour. Merci de m'avoir accordé votre confiance.

J'adresse toute ma reconnaissance envers les membres du jury de thèse, le Dr. Bénédicte Py et le Pr. Pierre-Emmanuel Charles qui ont eu l'amabilité d'être tous les deux rapporteurs, ainsi que le Pr. Pascale Guiraud et le Dr. Nathalie Becker en tant qu'examinatrices. Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer ces travaux.

Je tiens également à remercier mes encadrants de thèse, le Dr. Christine Robert-Da Silva et le Dr. Wildriss Viranaicken. Merci pour votre disponibilité, vos conseils, et pour la patience dont vous avez fait preuve durant ces années de thèse. Merci à Christine d'avoir cru en moi pour cette aventure et pour ton esprit critique et scientifique. Merci également pour tout ce temps passé à lire et corriger le manuscrit (surtout des fautes d'orthographe). Un grand merci tout particulièrement à Wildriss qui m'a toujours soutenu et fait confiance depuis la Licence, merci d'avoir partagé avec moi ton goût pour la recherche, merci pour tes conseils aussi bien scientifiques que dans la vie de tous les jours. Merci également pour tous ces weekends bricolages.

Je remercie le Pr. Philippe Gasque et le Dr. Bénédicte Roquebert pour le temps qu'ils m'ont consacré et pour tous leurs conseils lors des réunions de suivi de thèse.

Je remercie tous les membres de DÉTROI, qu'ils soient enseignants, thésards, ingénieurs, techniciens ou praticiens hospitaliers avec qui j'ai eu le plaisir de travailler. Merci pour la bonne ambiance et l'esprit de cohésion qui règne au sein de l'équipe. Merci particulièrement pour les moments de rigolade passés ensemble surtout en animalerie. Merci aux autres doctorants pour tous les bons moments de convivialité passés ensemble.

Je remercie aussi les membres des autres unités de recherche au sein de la plateforme CYROI, particulièrement l'équipe de PIMIT et mes collègues doctorants.

Merci à tous ceux que je n'ai pas cités mais qui ont contribué, de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

Je remercie tous mes proches, amis, famille et belle-famille, pour leur soutien et leur aide. Tout particulièrement à ceux qui m'ont offert tous ces bons petits carrys.

Rien ne m'aurait été possible sans le soutien inconditionnel de ma famille. J'adresse mes plus sincères remerciements à ma petite sœur ainsi que mes parents, ma maman et mon papa qui m'ont soutenu jusqu'au bout au cours de ces longues années d'études, avec une pensée pour ma première fan: ma mère. Sa présence, son enseignement et ses encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis devenu aujourd'hui.

Mon dernier remerciement est destiné à la personne qui m'est le plus cher. Je remercie Giovédie, sans qui tout ceci n'aurait pas été possible. Merci d'être à mes côtés et pour tous ces merveilleux moments passés ensemble. Merci de m'avoir soutenu et supporté à l'égard de mes travaux comme de la vie en général pendant toutes ces années.

A ma mère

Sommaire

Remerciements	3
Sommaire	6
Liste des publications et des communications	10
Liste des figures	11
Liste des abréviations	12
I. Etude bibliographique	14
1. Introduction	14
2. Les DAMP et PAMP dans le système immunitaire	21
2.1. La localisation et la libération des DAMP	21
2.2. Les récepteurs et corécepteurs.....	21
3. PAMP : exemple des LPS.....	23
3.1. Introduction	23
3.2. Structure, fonction et variation des LPS.....	24
3.2.1. Le lipide A.....	24
3.2.2. Le noyau	24
3.2.3. Structure de la chaîne O.....	24
3.2.4. Agrégabilité des LPS	27
3.3. La variabilité des LPS.....	27
3.4. Méthode d'étude des LPS	27
3.4.1. Extraction et purification	28
3.4.2. Dosage et pureté.....	28
3.4.3. Mesure de l'activité des LPS.....	29
3.4.4. Analyse structurale	29
3.5. Voie d'entrée et de sortie des LPS dans l'organisme	29
3.5.1. Voies d'entrée	29
3.5.2. La capture et l'élimination	30
3.6. LPS et inflammation	30
3.6.1. Signalisation cellulaire.....	31
3.6.2. Relation structure inflammation.....	33

3.7.	Conclusion.....	34
4.	DAMP : exemple de HMGB1	35
4.1.	Introduction	35
4.2.	Structure et modification post traductionnelle de HMGB1.....	35
4.3.	Fonction	37
4.3.1.	Fonction intracellulaire	37
4.3.2.	La libération de HMGB1 dans le milieu extracellulaire.....	37
4.3.3.	Fonction extracellulaire.....	39
4.4.	HMGB1 inflammation et cofacteur.....	40
4.4.1.	Inflammation stérile et non-stérile	40
4.4.2.	Cofacteurs	40
4.4.3.	La complexité de l'étude de HMGB1	42
4.5.	Conclusion.....	44
5.	DAMP et PAMP associés: exemple de HSP60 et LPS.....	46
5.1.	Introduction	46
5.2.	La famille HSP60.....	46
5.3.	HSP60 dans la cellule, une protéine chaperonne mais pas seulement.	47
5.3.1.	La structure et les modifications de HSP60 dans la cellule.....	47
5.3.2.	L'activité chaperonne de HSP60 dans la cellule.....	48
5.3.3.	HSP60 dans l'apoptose.....	49
5.4.	HSP60 membranaire et extracellulaire, une protéine impliquée dans la réponse immunitaire	51
5.4.1.	HSP60 membranaire	51
5.4.2.	La libération de HSP60 dans le milieu extracellulaire	52
5.4.3.	HSP60 présent dans le milieu extracellulaire.....	53
5.4.4.	Action de HSP60 sur les Lymphocytes T	54
5.5.	HSP60 inflammation et LPS.....	56
5.6.	Conclusion.....	58
6.	CD93 un potentiel nouveau récepteur de la famille des CLR	59
6.1.	Introduction	59
6.2.	Structure	60
6.3.	CD93 soluble	61
6.4.	CD93 et ses fonctions.....	61
6.4.1.	Hématopoïèse.....	62

6.4.2.	Angiogenèse.....	64
6.4.3.	Adhésion cellulaire.....	64
6.4.4.	Phagocytose.....	65
6.5.	CD93 et LPS dans l'inflammation.....	66
6.6.	Conclusion.....	66
7.	Les DAMP dans les maladies inflammatoires chroniques.....	67
7.1.	HMGB1 dans les maladies inflammatoires.....	67
7.1.1.	Athérosclérose.....	67
7.1.2.	Diabète et obésité.....	68
7.1.3.	Maladie liée à l'arthrite.....	68
7.2.	HSP60 dans les maladies inflammatoires chroniques.....	69
7.2.1.	L'athérosclérose.....	69
7.2.2.	Diabète et obésité.....	70
7.2.3.	Maladies liées à l'arthrite.....	70
7.3.	CD93 dans les maladies inflammatoires chroniques.....	70
7.3.1.	Athérosclérose.....	70
7.3.2.	Diabète.....	71
7.3.3.	Maladie liée à l'arthrite.....	71
8.	Conclusion.....	72
8.1.	Les PAMP.....	72
8.2.	Les DAMP.....	72
8.3.	L'association entre DAMP et PAMP.....	72
8.4.	Les PAMP et DAMP dans les cas de maladie inflammatoire.....	73
II.	Objectif des travaux de thèse.....	75
III.	Approche expérimentale.....	77
IV.	Résultats.....	79
1.	Etude 1: Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharides act via TLR4 to induce a differential response in human and mouse models.....	79
2.	Etude 2: Soluble HMGB1 Is a Novel Adipokine Stimulating IL-6 Secretion through RAGE Receptor in SW872 Pre-adipocyte Cell Line: Contribution to Chronic Inflammation in Fat Tissue.....	104
3.	Etude 3: Recombinant human HSP60 produced in ClearColi™ BL21(DE3) does not activate the NFκB pathway.....	123

4. Etude 4: Soluble expression of Disulfide-bonded C-Type Lectin Like domain of human CD93 in the cytoplasm of Escherichia coli	140
5. Etude 5: CD93 is a cell surface receptor for bacterial DNA and CpG oligonucleotides	156
6. Etude 6: CD93 a potential new receptor for HMGB1.	169
V. Discussion.....	189
VI. Conclusion et perspective	196
Annexe: Autre article issu de mon travail.	198
Références bibliographique	213
Pathologie inflammatoire : Etude de la contribution des PAMP et DAMP	251
Résumé	251
Inflammatory pathology: Study of the contribution of PAMPs and DAMPs.....	252
Abstract.....	252

Liste des publications et des communications

Publications

Nativel B, Marimoutou M, Thon-Hon VG, Gunasekaran MK, Andries J, Stanislas G, Planesse C, Robert-Da Silva C, Césari M, Iwema T, Gasque P, Viranaïcken W. Soluble HMGB1 is a novel adipokine stimulating IL-6 secretion through RAGE receptor in SW872 preadipocyte cell line: contribution to chronic inflammation in fat tissue. *PLoS One*. 2013 Sep 20;8(9):e76039. doi: 10.1371/journal.pone.0076039. eCollection 2013.

Planesse C, **Nativel B**, Iwema T, Gasque P, Robert-Da Silva C, Viranaïcken W. Recombinant human HSP60 produced in ClearColi™ BL21(DE3) does not activate the NFκB pathway. *Cytokine*. 2015 May;73(1):190-5. doi: 10.1016/j.cyto.2015.01.028. Epub 2015 Mar 12

Frumence E, Roche M, Krejbich-Trotot P, El-Kalamouni C, **Nativel B**, Rondeau P, Missé D, Gadea G, Viranaïcken W, Desprès P. The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN-β production and apoptosis induction. *Virology*. 2016 Apr 6;493:217-226. doi: 10.1016/j.virol.2016.03.006.

Nativel B, Figuester A, Andries J, Planesse C, Couprie J, Gasque P, Viranaïcken W, Iwema T. Soluble expression of Disulfide-bonded C-Type Lectin Like domain of human CD93 in the cytoplasm of Escherichia Coli. *J. Immunol. Methods*. (2016). doi:10.1016/j.jim.2016.10.003

Article soumis: **Nativel B**, David Couret, Olivier Meilhac, Christian Lefebvre d'Hellencourt, Wildriss Viranaïcken, Christine Robert Da Silva. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharides act via TLR4 to induce a differential response in human and mouse models. 2017VIRULENCE0008

Communications

Nativel B, Marimoutou M, Thon-Hon VG, Gunasekaran MK, Andries J, Stanislas G, Planesse C, Robert-Da Silva C, Césari M, Iwema T, Gasque P, Viranaïcken W. HMGB1 stimulate IL-6 secretion in adipocyte : Glycyrrhiza glabra to prevent insulin resistance ? 7ème CIPAM : Colloque International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales des régions d'outre-mer. 6, 7, 8, 9 Novembre 2012. Ile de La Réunion - France.

Nativel B, Planesse C, Iwema T, Gasque P, Robert-Da Silva C, Viranaïcken W. Recombinant human HSP60 produced in ClearColi™ BL21(DE3) does not activate the NF-κB pathway. 40th Congress of the Federation of the European Biochemical Societies (FEBS) July 4-9, 2015. Berlin - Germany

Liste des figures

Figure 1. Cellules impliquées dans le système immunitaire, entre réponse immunitaire innée et réponse immunitaire adaptative.	15
Figure 2. Evolution de l'athérosclérose au fil du temps.....	17
Figure 3. Schéma de la régulation de la glycémie et mécanisme de l'implantation de l'insulinorésistance.....	18
Figure 4. Schéma de l'évolution tissu adipeux lors de l'installation de l'obésité et de l'insulinorésistance.	19
Figure 5. Schéma des complications liées à la polyarthrite rhumatoïde.	20
Figure 6: L'enveloppe des bactéries Gram négatives	23
Figure 7. Structure générale du LPS exemple du LPS d' <i>E. coli</i>	26
Figure 8. Mécanisme de reconnaissance et d'activation des cellules par du LPS, et activation des voies intracellulaire précoce et tardive	32
Figure 9. Structure du lipide A de différents LPS en fonction de sa capacité inflammatoire.	34
Figure 10. Structure et domaine important de HMGB1.	36
Figure 11. Les différents types de libération de HMGB1.	39
Figure 12. Voie intracellulaire de l'action de HMGB1 et de ses cofacteurs.....	42
Figure 13. Relation structure et fonction de HMGB1 en fonction de son état d'oxydation.....	44
Figure 14. Les différentes fonctions de HMGB1.	45
Figure 15. Structure 3D du complexe chaperonne HSP60/HSp10 (GroEL/GroES).....	48
Figure 16. Activité chaperonne de GroEL/GroES.	49
Figure 17. Les fonctions de HSP60 dans l'apoptose.....	51
Figure 18. Les différentes voies de libération de HSP60.....	53
Figure 19. La différenciation des lymphocytes T.....	56
Figure 20. Réponse immunitaire différentielle de HSP60.....	58
Figure 21. Structure de CD93 et de sa famille (CD2148, CD141 et Clec14A).....	61
Figure 22. Hématopoïèse	63
Figure 23. HSP60 interaction assay.....	139
Figure 24. CD93-CTLD production.....	153
Figure 25. ELISA assay for interaction between LPS and CD93-CTLD.	154
Figure 26. LPS binding activity to CD93-CTLD by spectrofluorescence.....	155
Figure 27. Schéma bilan de l'action de CD93 sur l'inflammation	195

Liste des abréviations

ADN: Acide Désoxyribonucléique
AIM2: absent in melanoma 2
AP-1: Activator Protein 1
ARN: Acide Ribonucléique
CCT: chaperonin containing TCP-1
CD14: Cluster Differentiation 14
CD93: Cluster Differentiation 93
CLR: C-type lectin receptors
CpG: [Cytosine]-[phosphate]-[Guanine]
CRM1: Chromosomal Maintenance 1
CTLD: C-Type Lectin like Domaine
DAMP: Damage Associated Molecular Pattern
DG: dystroglycane
EGF: Epidermal Growth Factor
GIPC: GAIP interacting protein, C terminus
Gram-: Gram negative
HDL: High Density Lipoprotein
HMGB1: High Mobility Group Box 1
HRP: Horseradish Peroxidase
HSP: Heat Shock Protein
IFN: Interferon
IL-6: Interleukine 6
IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IRF3: Interferon Regulatory Factor 3
Kdo: keto-deoxyoctulosonate
LAL: Limulus Amebocyte Lysate
LBP: Lipopolysaccharide Binding Protein
LDL: Low Density Lipoprotein
LPS: Lipopolysaccharide
LPS DR: LPS Deep Rough
LPS R: LPS Rough
LPS S: LPS Smooth
LPS SR: LPS Semi Rough
LTA: Acide Lipoteichoïque
MAC: Membrane Attack Complex
MBL: Mannose-binding lectin
MCL: Macrophage C-type lectin
MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein1
MD2: Myeloid Differentiation 2 (Lymphocyte antigen 96)
MMP: Matrix Metalloproteinase
MyD88: Myeloid Differentiation primary response gene 88
NF- κ B: Nuclear Factor-kappa B
NK: Natural Killer
NES: Nuclear Export Signal
NLR: NOD-like receptors
NLS: Nuclear Location Signal
ODN: Oligodeoxynucleotide
OMP: Outer Membrane Protein

PAGE: Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern
PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell)
PLTP: Phospholipid Transfer Protein
PRR: Pattern Recognition Receptor
RAGE: Receptor for Advanced Glycation Endproducts
RLR: RIG-I-like receptors
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
SEAP: SEcreted Alkaline Phosphatase
SPR: Surface Plasmon Resonance
SRIS: Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique
TAE-DOC: triethylamine-deoxycholate sodium
TLR: Toll Like Receptor
TM: Thrombomoduline
TNF: Tumor Necrosis Factor
TRiC: TCP-1 Ring Complex
TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
VLDV: Very Low Density Lipoprotein

I. Etude bibliographique

1. Introduction

Le système immunitaire permet la protection de notre organisme contre tous les types d'agression. En effet, il permet de lutter aussi bien contre des organismes pathogènes que des molécules toxiques ou des cellules cancéreuses. On distingue deux parties: le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif (Figure 1).

-Le système immunitaire inné est la première ligne de défense pour combattre une invasion de micro-organisme. Il agit rapidement sans spécificité et de manière répétée jusqu'à résolution de l'agression. En plus des différentes barrières physiques de protection comme la peau et les muqueuses, au sein de l'organisme les cellules immunitaires telles que les macrophages et les cellules dendritiques, sont capables de phagocyter et de détruire ces pathogènes. Différents récepteurs, appelés récepteurs de reconnaissance de pathogènes (PRR, Pattern-Recognition Receptor) sont utilisés par les cellules du système immunitaire inné pour reconnaître les pathogènes. Les principaux récepteurs connus font partie de la famille des TLR (Toll-Like Receptor). Cette reconnaissance entraîne une variété de réponses cellulaires comme l'induction de la phagocytose, la production de chimiokines et de cytokines. Cette activation du système immunitaire inné entraîne également l'initiation du système immunitaire adaptatif (Figure 1).

-Le système immunitaire adaptatif intervient en parallèle du système immunitaire inné. C'est une réponse immunitaire plus longue qui se met en place au bout de 4 à 7 jours suivant l'infection, et qui est spécifique du pathogène. Il existe une mémoire du système immunitaire adaptatif, permettant de répondre plus rapidement en cas de réinfection. Deux types de cellules sont impliqués, les lymphocytes B et T. Les lymphocytes B participent à la réponse immunitaire humorale produisant des anticorps dirigés spécifiquement contre les antigènes du pathogène. Les lymphocytes T sont impliqués dans la réponse immunitaire adaptative dite cellulaire. Ils se différencient en lymphocytes T cytotoxiques qui lysent les cellules infectées, et en lymphocytes T auxiliaires capables d'amplifier les réactions d'élimination du pathogène. Ces lymphocytes T auxiliaires produisent également des molécules, les cytokines, participant à la régulation de l'ensemble du système immunitaire (Figure 1).

Le système immunitaire peut être activé par des molécules endogènes, (molécules du soi) ou exogènes (molécules du non-soi). Des molécules endogènes peuvent être produites suite à un traumatisme (coups, déchirure musculaire, fracture, ...), elles conduisent à une réponse dite stérile du système immunitaire. Des molécules du non-soi provenant d'infections bactériennes ou virales sont à l'origine de la production de composés exogènes capables eux aussi d'activer le système immunitaire. Ces deux réponses peuvent être complémentaires. En effet, aussi bien les cellules infectées que les cellules immunitaires libèrent différents types de molécules, telles que des molécules d'adhésion, des enzymes, des alarmines et des cytokines capables d'activer le système immunitaire. De plus, les cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques et les macrophages sont nécessaires pour stimuler les lymphocytes T et les lymphocytes B et permettre ainsi le passage de l'immunité inné en processus immunitaires adaptatifs.

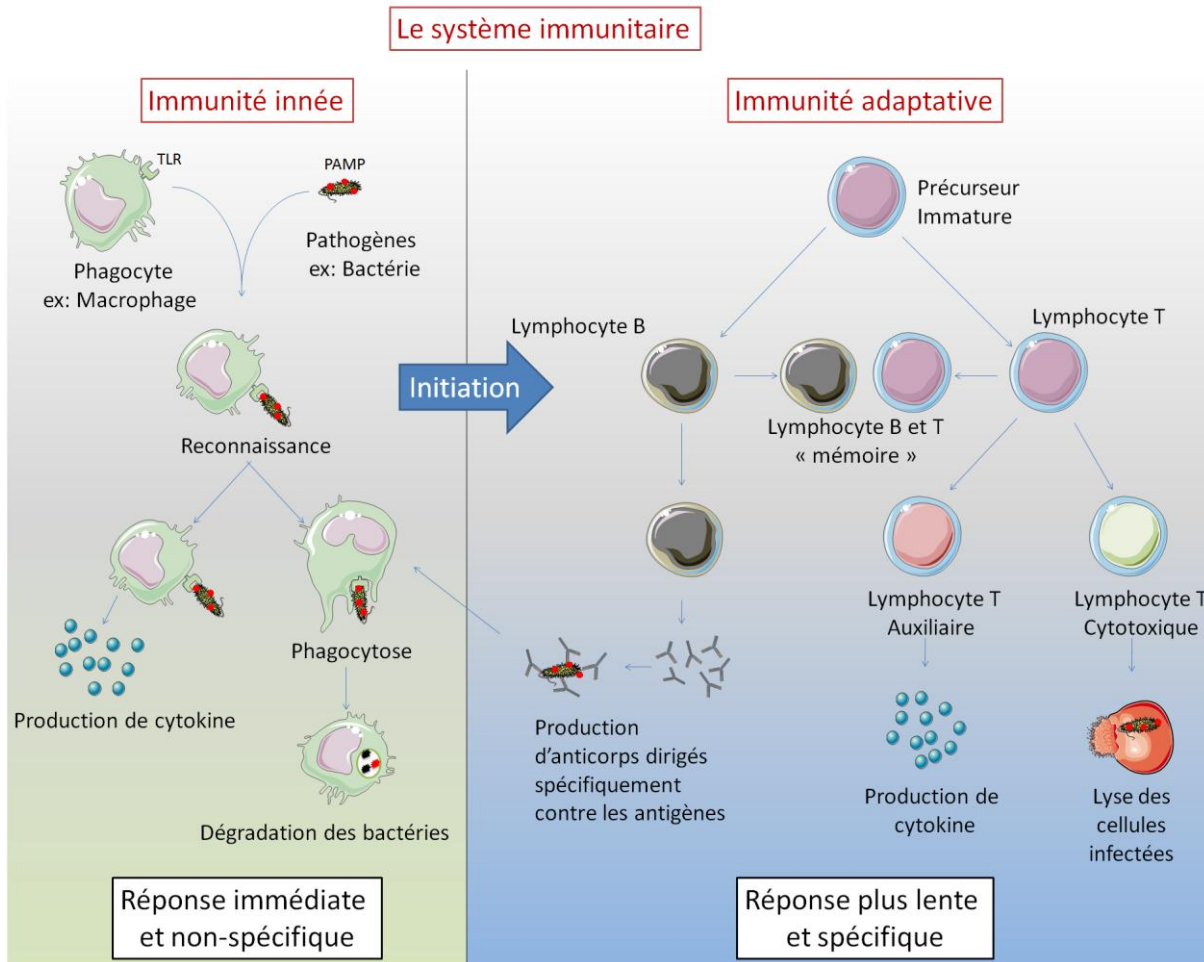


Figure 1. Cellules impliquées dans le système immunitaire, entre réponse immunitaire innée et réponse immunitaire adaptative.

Les alarmines ou **DAMP** (Damage Associated Molecular Pattern) sont des molécules libérées par les cellules en état de danger pour prévenir et activer le système immunitaire. L'origine du danger peut être très variée, il peut provenir d'une infection par un pathogène, d'un dommage cellulaire ou d'un traumatisme. Les alarmines possèdent une caractéristique principale, elles ont un pouvoir immunogène lorsqu'elles sont libérées lors de la mort cellulaire accidentelle (par nécrose) et non lors de la mort programmée (par apoptose). Elles peuvent également être libérées par les cellules immunitaires avec un fort pouvoir immunogène. Certaines alarmines sont aussi capables de promouvoir la régénération cellulaire à la suite d'un dommage cellulaire. De nombreuses protéines sont définies comme alarmine comme par exemple la famille des HSP (Heat Shock Protein), IL-1 (interleukine-1), HMGB1 (High Mobility Group Box 1), ou encore S100.

Les PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) sont des molécules issues des pathogènes et capables d'activer le système immunitaire. Ces molécules exogènes sont reconnues par les récepteurs TLR et PRR. De nombreuses molécules d'origine bactérienne ou virale sont connues pour induire une réponse immunitaire parmi lesquelles les lipopolysaccharides (LPS), les peptidoglycanes, les flagellines, l'acide lipotéichoïque (LTA), l'ARN double brin, les motifs CpG de l'ADN.

Les cytokines sont des molécules impliquées dans l'inflammation, jouant un rôle important dans la réponse immunitaire. Toutes les cellules de l'organisme, à l'exception des globules rouges, sont capables de libérer et de répondre aux cytokines. Leurs cibles sont toutefois principalement les cellules immunitaires. Les cytokines vont réguler et permettre la cohésion entre les différentes cellules du système immunitaire, mais également entre le système immunitaire inné et adaptatif. Elles agissent comme messenger entre deux cellules identiques ou différentes. On distingue un grand nombre de cytokines qui peuvent être classées dans la catégorie des cytokines pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires suivant l'activité, la fonction de l'action ou le message qu'elles transportent.

L'inflammation correspond à l'ensemble des réactions immunitaires générées par l'organisme en réponse à une agression subie. L'inflammation a tout d'abord été décrite d'un point de vue physiologique, elle se caractérise par une rougeur, une douleur, un gonflement et une augmentation de chaleur. Cette inflammation est induite et régulée par un grand nombre de phénomènes biologiques, mais les cytokines et les cellules immunitaires sont au centre de cette réponse inflammatoire. Il existe deux types d'inflammation, l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique. L'inflammation aiguë intervient directement après l'agression puis diminue jusqu'à disparaître après rémission complète du tissu touché, grâce à l'action des cellules immunitaires et des cytokines anti-inflammatoires. L'inflammation chronique n'est pas une réaction physiologique normale. Cette inflammation de faible intensité persiste dans le temps et est souvent associée à des pathologies comme les maladies auto-immunes, le diabète, l'obésité, l'arthrite et l'athérosclérose. Ces maladies sont appelées maladies inflammatoires chroniques.

Au cours de cette étude bibliographique nous allons nous intéresser à certaines maladies inflammatoires chroniques : l'athérosclérose, le diabète, l'obésité et les maladies arthritiques.

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique caractérisée par la formation de plaques d'athérome au niveau des artères ; ces plaques grossissent au fil du temps et entraînent un rétrécissement de l'artère (Figure 2). L'athérosclérose peut toucher toutes les artères. Lorsque les artères du cœur sont touchées par exemple, on parle de maladie coronarienne. Dans certains cas graves, l'endothélium s'érode et les plaques peuvent se rompre et libérer des fragments dans la circulation, entraînant une obstruction complète de l'artère appelée thrombose. Ceci provoque une absence d'irrigation sanguine et une ischémie du tissu concerné. Lorsque l'ischémie concerne le cerveau, on a un accident vasculaire cérébral et lorsqu'elle touche le cœur on parle d'infarctus du myocarde. L'athérosclérose fait partie des maladies cardiovasculaires. Des études montrent que cette maladie est liée à une dyslipidémie mais également à de l'inflammation, qui joue un rôle important dans cette maladie. L'inflammation intervient dans toutes les étapes de la maladie, de l'initiation à la progression jusqu'à l'érosion de l'endothélium et la rupture de la plaque. L'athérosclérose commence par un dysfonctionnement de l'endothélium, entraînant l'attachement et l'accumulation de monocytes, macrophages, et plaquettes au niveau des cellules endothéliales. L'activation anormale de ces cellules entraîne la production de molécules pro-inflammatoires et d'enzymes protéolytiques, qui peuvent conduire à l'affaiblissement de la plaque, puis sa rupture. Les monocytes/macrophages jouent un rôle important dans l'athérosclérose tout au long du processus de formation de la plaque d'athérome jusqu'à sa rupture. Les monocytes sont recrutés au niveau de l'endothélium activé des artères et se différencient en macrophage. Ces macrophages deviennent des cellules spumeuses formant ensuite, avec de la fibrine et des lipides (LDL oxydé),

un noyau de la plaque. L'activation de ces macrophages entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires ainsi que d'autres molécules entraînant la déstabilisation et la rupture de la plaque.

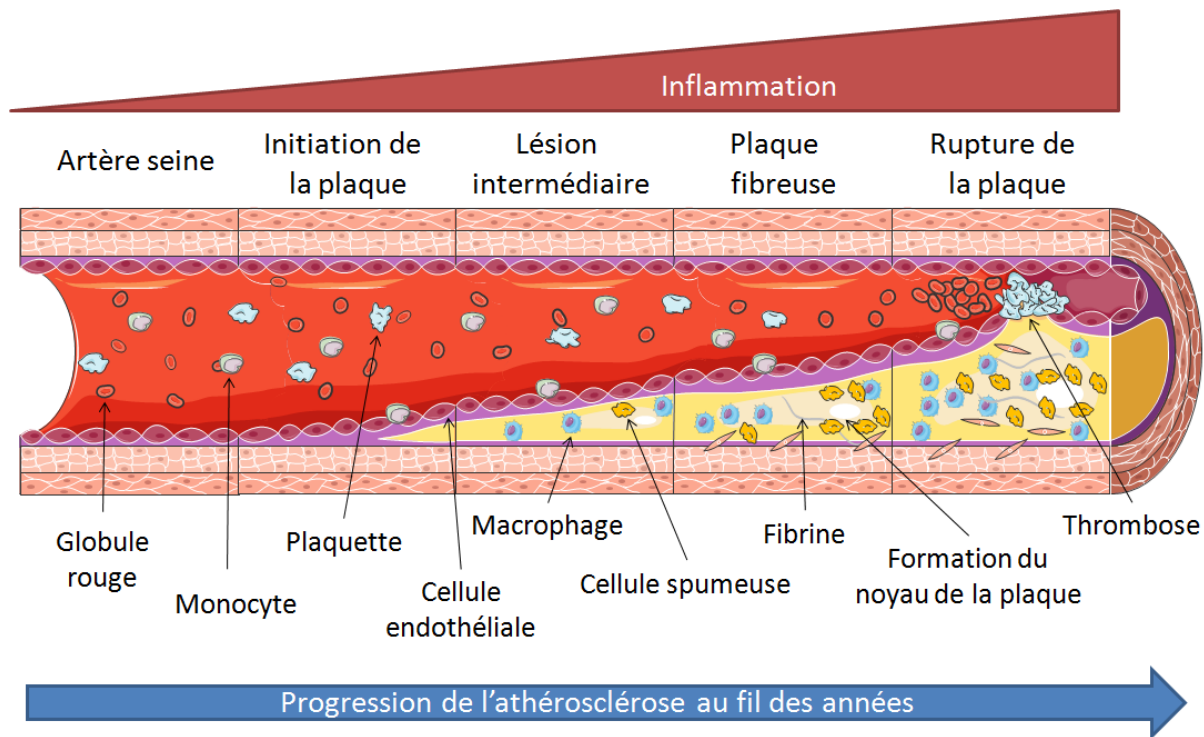


Figure 2. Evolution de l'athérosclérose au fil du temps.

Le diabète est un trouble de l'assimilation, de l'utilisation et du stockage des sucres apportés par l'alimentation. Une hormone, l'insuline, est au centre de la régulation du glucose dans le sang (glycémie), (Figure 3). L'insuline est produite par les cellules bêta dans les îlots de Langerhans du pancréas. Elle a pour rôle de diminuer la glycémie dans le sang, car une glycémie trop forte (hyperglycémie) est dangereuse pour la santé et peut entraîner l'apparition de maladies. Le rôle de l'insuline est de permettre l'utilisation du glucose du sang par les cellules comme source ou réserve d'énergie. La synthèse du glucose en glycogène se fait principalement dans le foie, plus précisément au niveau des hépatocytes, pour former des réserves énergétiques. Dans les cas de diabète cette insuline ne joue plus son rôle. On distingue 2 types de diabète :

- Le diabète de type 1 représente environ 10% des cas de diabète. C'est une maladie auto-immune qui se traduit par une destruction des cellules bêta et donc une production d'insuline quasi nulle. Ce défaut de production d'insuline peut être compensé par des injections régulières de l'hormone. On parle alors d'insulinodépendance.
- Le diabète de type 2 concerne environ 90% des cas de diabète. Dans ce cas, les cellules cibles ne répondent plus à l'insuline. On parle d'insulino-résistance. Pour compenser cela, le pancréas produit de plus en plus d'insuline et finit par s'épuiser et ne plus assurer une production suffisante d'insuline.

L'inflammation est un mécanisme important dans le développement du diabète. Des prédispositions génétiques sont également à prendre en considération pour l'installation du diabète. En effet, la fréquence du diabète dans la famille d'une personne diabétique est plus élevée que dans une famille où le diabète est absent. La fréquence est encore plus élevée pour les enfants dont les deux parents sont diabétiques.

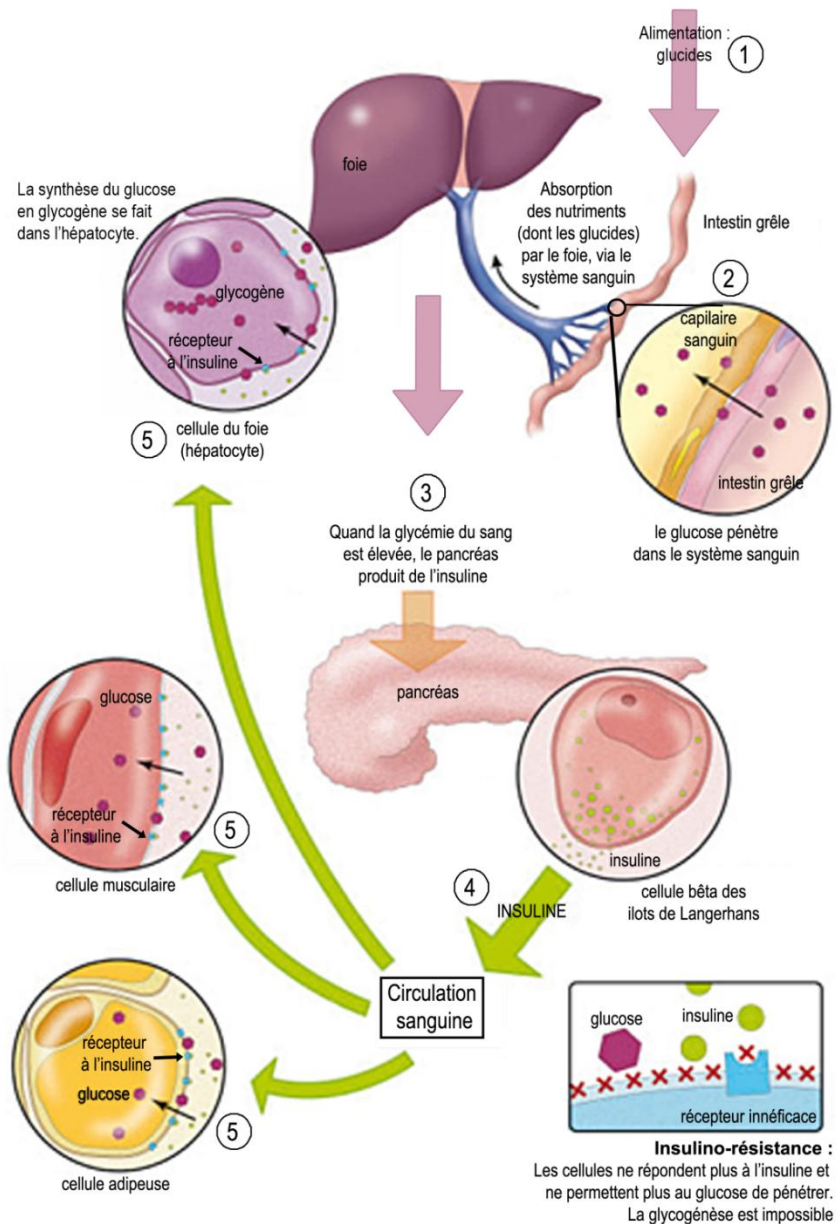


Figure 3. Schéma de la régulation de la glycémie et mécanisme de l'implantation de l'insulino-résistance. 1. Entrée des glucides de l'alimentation, 2. Entrée du glucose dans le sang, 3. Détection de la glycémie par le pancréas, 4. Production d'insuline par les cellules bêta des îlots de Langerhans, 5. Action de l'insuline sur les cellules cibles : cellules adipeuses, cellules musculaires, cellules du foie.

<http://diabete-reunion.over-blog.com/article-le-diabete-un-fleau-a-la-reunion-45248877.html>

L'obésité est l'un des principaux facteurs connus pour induire le diabète de type 2. L'obésité peut avoir plusieurs origines. Le manque d'activité physique, la sédentarité, une alimentation trop riche et non équilibrée entraînent une augmentation de la masse grasse corporelle. Le surplus de graisse dans le corps est stocké essentiellement au niveau du tissu adipeux. L'insuline stimule l'absorption de glucose dans les tissus musculaires et adipeux. Chez les personnes obèses, ce tissu adipeux est présent en grande quantité et donc une production importante d'insuline est nécessaire. Les personnes obèses développent une résistance progressive à l'insuline, elles finissent par devenir insulino-résistante. Un autre facteur de l'installation du diabète est le déséquilibre lipidique chez les personnes obèses, ce qui entraîne la présence accrue d'acide gras libres et de triglycérides participant à l'insulino-résistance et la destruction des cellules bêta. Une autre cause est la sécrétion de facteurs inflammatoires, comme les cytokines. Il a été décrit que des cellules immunitaires, notamment des macrophages et des lymphocytes T, infiltrent le tissu adipeux des sujets obèses, créant un environnement inflammatoire, favorisant le diabète (Figure 4). L'accumulation exagérée de graisse entraîne donc le développement du diabète, par :

- l'insulinorésistance qu'elle contribue à développer,
- la détérioration des cellules bêta qu'elle facilite,
- et l'installation d'un environnement inflammatoire chronique du tissu adipeux.

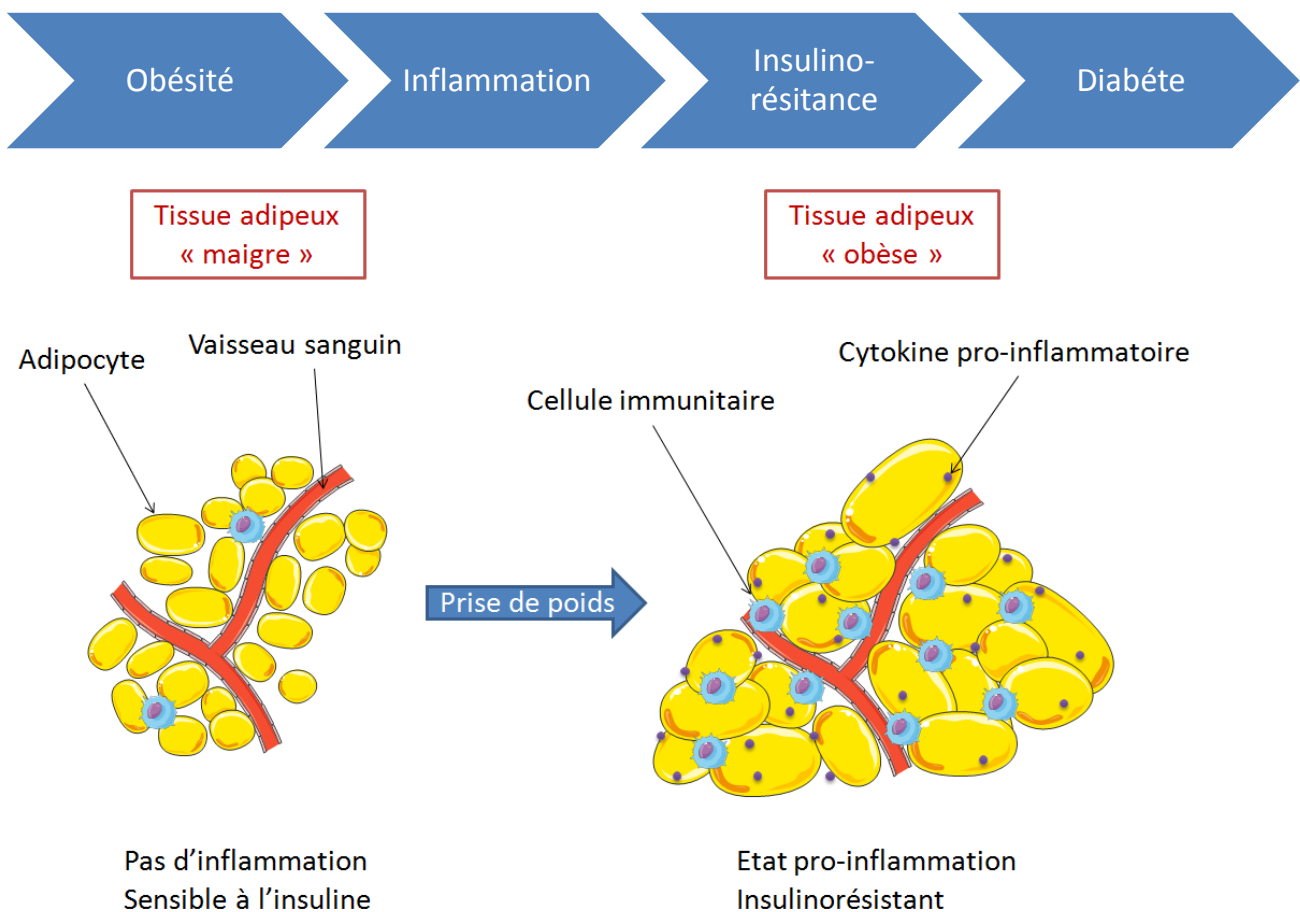


Figure 4. Schéma de l'évolution tissu adipeux lors de l'installation de l'obésité et de l'insulinorésistance.

Les maladies arthritiques désignent plus d'une centaine d'affections différentes caractérisées par des douleurs au niveau des articulations, des ligaments, des tendons, des os ou d'autres éléments du système musculo-squelettique. De manière générale, l'arthrite est caractérisée par la mise en place d'une inflammation chronique au niveau des articulations. L'origine de cette inflammation est aujourd'hui mal connue, mais elle pourrait être liée à des facteurs génétiques et environnementaux. De plus, l'arthrite est souvent liée à l'installation d'une maladie auto-immune. Dans certains cas, l'arthrite peut survenir après une infection bactérienne ou virale. La polyarthrite rhumatoïde est la maladie arthritique inflammatoire chronique la plus fréquente et la plus connue (Figure 5). Elle se caractérise par des douleurs articulaires intenses associées à une destruction progressive des articulations, mais aussi de certains organes internes. Elle évolue par poussées, entrecoupées de périodes où les symptômes s'atténuent, voire disparaissent temporairement. Les symptômes de la polyarthrite sont dus à une réaction auto-immune déclenchant une inflammation anormale au sein de l'articulation. La membrane synoviale tapisse l'intérieure des articulations et fabrique le liquide synovial permettant la lubrification des mouvements. Quand elle est agressée, cette membrane fabrique trop de liquide et contient des cellules immunitaires produisant des cytokines pro-inflammatoires. Cela va entraîner l'agression des articulations, des cartilages, des tendons et des os par les cellules inflammatoires.

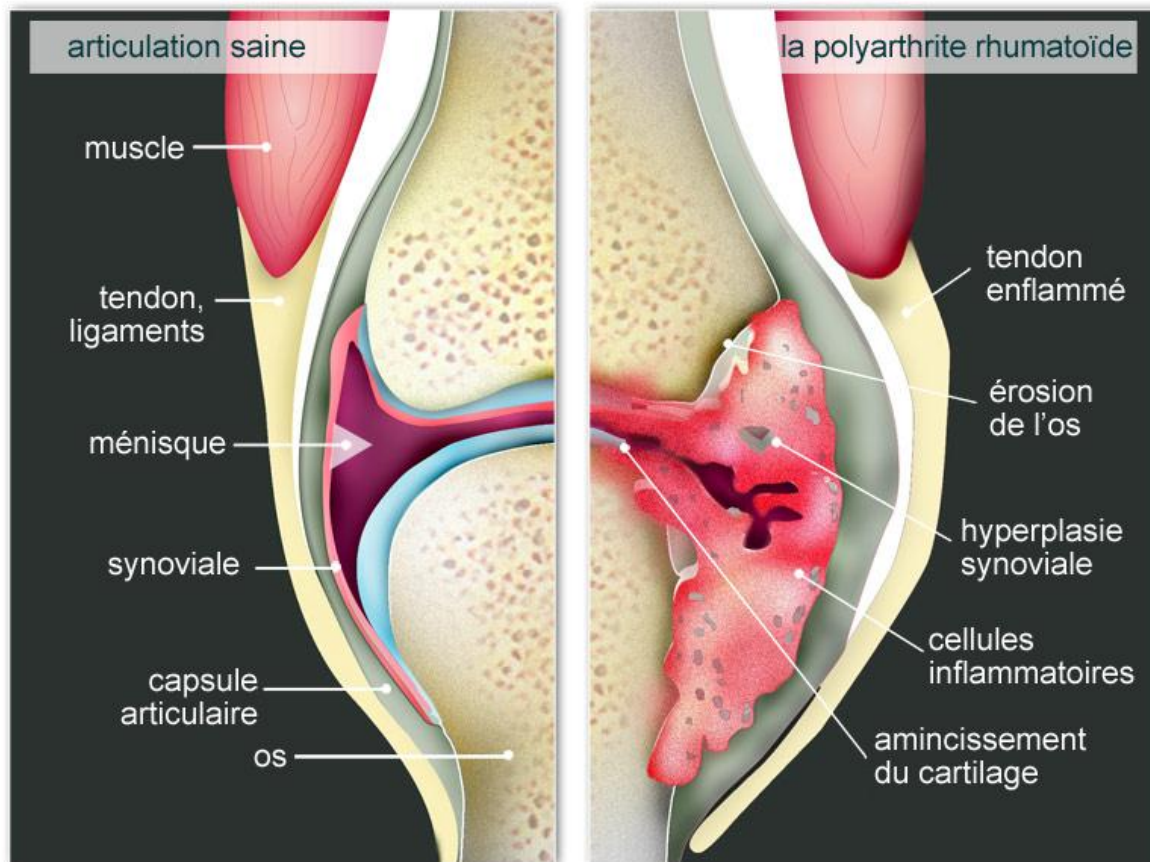


Figure 5. Schéma des complications liées à la polyarthrite rhumatoïde. (Extrait de <http://sante.canoe.ca/channel/polyarthrite-rhumatoide/a-propos-de-la-polyarthrite-rhumatoide/la-polyarthrite-rhumatoide-une-maladie-evolutive>)

2. Les DAMP et PAMP dans le système immunitaire

Les PAMP et DAMP sont deux familles de molécules très importantes impliquées dans l'activation du système immunitaire. Ils conduisent à l'activation de cellules immunitaires et à la mise en place d'un environnement inflammatoire. De nombreux pathogènes libèrent des molécules immunostimulatrices, les PAMP. Les DAMP sont des molécules endogènes libérées suite à un stress tissulaire ou une blessure. Ils ont comme fonction supplémentaire de restaurer l'homéostasie tissulaire en favorisant la reconstruction du tissu suite à un traumatisme ou à l'invasion par un pathogène, ou encore à des effets secondaires de l'inflammation.

2.1. La localisation et la libération des DAMP

Les DAMP sont des facteurs endogènes intracellulaires ou membranaires et non accessibles pour la reconnaissance par le système immunitaire dans des conditions physiologiques normales. Cependant, dans des conditions de stress ou de lésion cellulaire, ces molécules peuvent être libérées dans l'environnement extracellulaire et déclencher une inflammation.

Les DAMP peuvent se trouver dans différents compartiments et organites cellulaires. Les DAMP peuvent être localisés dans :

- Les mitochondries (ex : HSP60 et l'ADN mitochondriale). La mitochondrie est le compartiment cellulaire majeure dans la libération de DAMP [1].
- Les auto-phagosomes (ex : HMGB1). De nombreux DAMP peuvent être libérés par des cellules stressées subissant une autophagie, de plus ces DAMP sont issus des auto-phagosomes [2,3].
- Le noyau (ex : HMGB1 et les histones). La translocation de nombreuses molécules nucléaires est observée lorsque des cellules sont en état de stress inflammatoire ou de mort cellulaire [4].
- Le cytosol (ex : S100 et les HSPs). Le cytosol possède des molécules qui lorsqu'elles se retrouvent dans le milieu extracellulaire jouent le rôle de DAMP [5].
- La membrane cellulaire (ex : biglycane et acide hyaluronique). Lorsqu'ils sont présents à la surface des cellules au niveau de la membrane plasmique, ils sont clivés en partie ou en totalité et libérés dans le milieu extracellulaire. Ce clivage se fait grâce à diverses enzymes telles que MMP-2, MMP-3, granzyme B [6].

Les DAMP sont libérés dans le milieu extracellulaire de façon passive suite à la mort cellulaire ou de façon active en réponse à un stress. Le mécanisme par lequel les DAMP se retrouvent dans le milieu extracellulaire a une influence sur son pouvoir immunogène. Par exemple, HMGB1 et HSP60 suite à une apoptose, sont libérés dans le milieu extracellulaire mais avec des propriétés immunogènes très faibles [7,8] alors qu'une libération active conduit à des propriétés immunogènes plus importantes [4,9].

2.2. Les récepteurs et corécepteurs

Les PAMP et les DAMP sont reconnus par des PRR présents sur les cellules immunitaires et induisent la production de facteurs inflammatoires.

Les TLR (Toll-like Receptors) sont les PRR les plus décrits. Dix TLR sont connus chez l'Homme et douze chez la souris. Ils sont très conservés au cours l'évolution. La plupart des DAMP et PAMP sont capables d'interagir avec les TLR [10]. Par exemple, le TLR9 reconnaît l'ADN bactérien de type CpG. Il est intéressant de noter que malgré les grandes diversités de structures, les PAMP et les DAMP partagent une grande capacité à lier et activer principalement les récepteurs TLR4 et TLR2 [11,12]. Par exemple HMGB1, HSP60, S100, biglycane, LPS et lipoprotéines sont autant de ligands de ces 2 TLR. La structure des complexes DAMP/TLR et PAMP/TLR n'est

pas entièrement élucidée. Il n'y a pas aujourd'hui de règles générales concernant l'interaction entre DAMP, PAMP et TLR.

L'interaction avec les TLR nécessite des corécepteurs. Ces protéines forment un complexe avec les TLR et participent à la reconnaissance et la fixation du ligand.

Dans le cas du récepteur TLR4, ce dernier s'associe à CD14 et à la protéine de myéloïd différenciation 2 (MD-2) et transduit une variété de signaux pour activer l'immunité innée, par exemple lorsque les cellules reconnaissent des PAMP comme le LPS [13] et des DAMP comme HMGB1 [14]. Les corécepteurs ne sont pas spécifiques d'un récepteur. En effet CD14 est également capable de former un complexe avec TLR2 et TLR3 pour la reconnaissance des DAMP et PAMP comme par exemple le LPS [15]. Ils ne sont pas non plus spécifiques d'un type de ligand, en effet il a été démontré que les corécepteurs et les molécules accessoires nécessaires pour la reconnaissance de ligands par TLR sont utilisés à la fois par les DAMP et les PAMP.

Les CLR (C-type lectin receptors) sont des récepteurs transmembranaires qui contiennent un domaine de liaison spécifique qui reconnaît les glucides présents sur les virus, les bactéries et les champignons. Beaucoup de ligands de ces CLR sont inconnus [16]. Les CLR constituent une grande famille de protéines comportant plus d'une centaine de représentants. Dans les cellules présentatrices d'antigènes, les CLR sont impliqués dans l'absorption et le trafic de l'antigène pour la présentation de cet antigène à la surface des cellules [17]. Bien que leur rôle principal se situe dans la défense de l'hôte contre les agents pathogènes, les CLR sont également impliqués dans la détection de mort cellulaire [18] et donc a priori des DAMP. Par exemple, Mincle est capable de reconnaître le DAMP SAP130, libéré dans au cours de la nécrose mais pas de l'apoptose [19].

Un 3^{ème} type de récepteur, RAGE (Receptor for Advanced Glycation End Products), a été décrit pour interagir avec les DAMP. Ce récepteur membranaire peut également exister sous une forme soluble sRAGE. Dans ce cas sRAGE peut interagir avec ses ligands et empêcher leur interaction avec la forme membranaire de RAGE et donc l'activation de la cellule [20]. RAGE est connu pour se lier à HMGB1 [21] et S100 [22]. Des études montrent une synergie entre RAGE et TLR2 ou TLR4 dans la réponse inflammatoire. HMGB1, S100 et le LPS sont des ligands communs à ces récepteurs. Il a également été montré que la partie intracellulaire de RAGE et des TLR interagit avec les protéines adaptatrices TIRAP et MyD88 pour induire une cascade de signalisation intracellulaire [23].

Face à la grande diversité des signaux, les cellules disposent d'une variété de récepteurs limités. Toutefois la reconnaissance des PAMP et des DAMP implique différents acteurs. C'est ainsi que les récepteurs, en particulier les TLR, peuvent former des hétérodimères, se faire aider de corécepteur, ou de protéines accessoires dans l'interaction avec les signaux de danger. Cela permet d'augmenter l'éventail de détection permettant au système immunitaire de reconnaître une grande quantité de motifs moléculaires.

3. PAMP : exemple des LPS

3.1.Introduction

le terme de « lipopolysaccharide » est mentionné dans la littérature pour la première fois en 1943, lorsque le biochimiste Shear M.J isole un composé d'un extrait de bactérie (*Bacillus prodigiosus*) [24].

La paroi des bactéries est une structure qui assure la protection des bactéries. Chez les bactéries à Gram négatif (Gram-), cette paroi est constituée d'une membrane plasmique, d'une couche de peptidoglycane et d'une membrane externe (Figure 7). La membrane externe est une bicouche lipidique dans laquelle on trouve du côté interne des phospholipides et du côté externe des lipopolysaccharides (LPS).

D'un point de vue fonctionnel, la membrane externe joue un rôle primordial dans le processus d'échange entre la bactérie et son environnement. D'un point de vue structural, la membrane externe est comme la membrane plasmique, une bicouche de phospholipides dans laquelle on trouve des lipopolysaccharides un composé spécifique de cette membrane externe [25]. La communication entre la membrane plasmique et la membrane externe se fait par l'intermédiaire de jonctions appelées les « ponts de Bayer » qui représentent des zones de fusion entre les deux bicouches lipidiques des membranes.

Dans la structure de la membrane externe on trouve également trois types de protéines appelées OMP (Outer Membrane Protein) [26]: des protéines de structure consolidant la membrane; les porines permettent le passage des petites molécules hydrophiles; et des enzymes impliquées dans la conjugaison bactérienne.

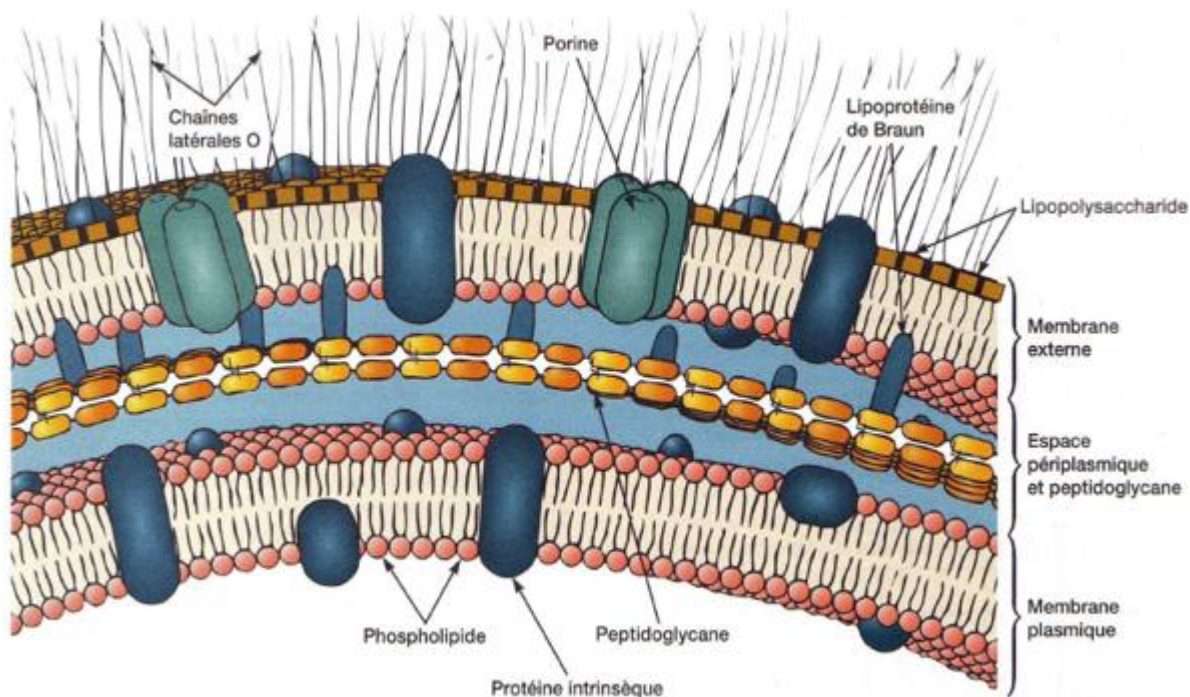


Figure 6: L'enveloppe des bactéries Gram négatives (<http://www.arches.uga.edu/~kristenc/cellwall.html>)

3.2. Structure, fonction et variation des LPS

Dans la structure du LPS on distingue trois parties : la chaîne O ou antigène O (pour «Ohne Kapsel»), le noyau ou le Core, et le lipide A (Figure 8).

3.2.1. Le lipide A

Le lipide A est le point d'ancrage du LPS à la bicouche lipidique. Le lipide A se compose d'un squelette de 2 glucosamines sur lequel sont liés les acides gras d'un côté et le noyau de l'autre côté. Grâce à ces chaînes d'acide gras hydrophobes, le lipide A se fixe à la bicouche lipidique. La partie hydrophile de ce squelette se lie au noyau. Il a été démontré qu'en absence du lipide A, la bactérie n'est plus en mesure de garder l'intégrité de la membrane externe et ne peut donc survivre même *in vitro* (mutants létaux) [27,28].

Chez toutes les bactéries à Gram- on retrouve dans la structure du lipide A deux sucres liés à des acides gras. Les variations dans la structure du lipide A concernent essentiellement les acides gras et elles sont spécifiques des espèces bactériennes. Ces variations se situent au niveau :

- du nombre de chaînes d'acide gras (généralement entre 4 et 7, exceptionnellement 8) ;
- de la longueur des chaînes d'acide gras (C12, C14 et C16 sont les plus communes) ;
- du degré d'insaturation des chaînes acides gras ;
- du degré d'oxydation de certaines chaînes acides gras ;
- du degré de phosphorylation et autres modifications particulières du squelette du lipide A.

3.2.2. Le noyau

Le noyau sert de liaison entre la partie ancrée dans la membrane externe et la partie extracellulaire du LPS. Le noyau est formé de deux parties, le noyau interne et le noyau externe. Le noyau interne est lié de manière covalente au lipide A par des sucres de type Kdo (keto-deoxyoctulosonate). Il est composé, d'une première chaîne composée de sucres Kdo, d'une deuxième chaîne contenant des heptoses. Le noyau externe a une structure plus variable que le noyau interne. Le noyau externe, également connu sous le nom de « région hexoses », est composé d'un nombre variable de sucres ordinaires, comme le glucose et le galactose. L'absence de synthèse de la partie Kdo entraîne une non-survie des bactéries [29].

La structure générale du noyau interne est fortement conservée chez les bactéries Gram-. C'est la partie du LPS qui varie le moins entre les bactéries. Par exemple, les noyaux internes d'*E. coli* et de *Salmonella enterica* ont la même structure [30]. Les différences se retrouvent essentiellement au niveau du noyau externe. Jusqu'à présent, seules cinq structures de noyaux ont été identifiées chez *E. coli* (notés R1, R2, R3, R4 et K12), et la plus présente est le type R1 [31]. Les différences entre ces cinq structures apparaissent surtout dans la région du noyau externe [32].

3.2.3. Structure de la chaîne O

La chaîne O représente l'interface entre la bactérie et le milieu extérieur. Du point de vue structural, l'antigène O est le produit d'assemblage par polymérisation de plusieurs sucres souvent modifiés, nommés aussi « unités O ». Chaque unité O est le produit d'une cascade biosynthétique spécifique. Les unités O sont composées d'1 à 8 résidus qui se répètent jusqu'à 50 fois pour former la chaîne O. L'unité O est un oligosaccharide obtenu par la polymérisation soit d'un seul type de glucide (homopolymère), soit de plusieurs types différents de glucides (hétéropolymère).

La chaîne O constitue la partie la plus variable du LPS, il existe une grande diversité inter- et intra-spécifique de la chaîne O. Au sein d'une même espèce bactérienne, il peut exister une grande variabilité d'unité O dans sa

longueur mais aussi dans sa composition. Elle peut montrer des variations dans la structure, les arrangements et/ou les substitutions latérales des oligosaccharides. Aujourd'hui de nombreuses chaînes O ont été identifiées, mais bien d'autres n'ont pas encore été caractérisées [33]. Par exemple, chez *E. coli* plus de 170 sérogroupes O ont été décrits [34]. C'est pour cela qu'on retrouve des dénominations de LPS en fonction de la souche d'*E. coli* de type O111:B4, O157:H8, O26:B6, ... (où B représente le type d'antigène de surface et H le type d'antigène flagellaire). En général, les modifications de la chaîne O jouent un important rôle dans différents mécanismes infectieux, comme par exemple le processus d'installation de la bactérie et son habileté à échapper aux mécanismes de la réponse immunitaire [35].

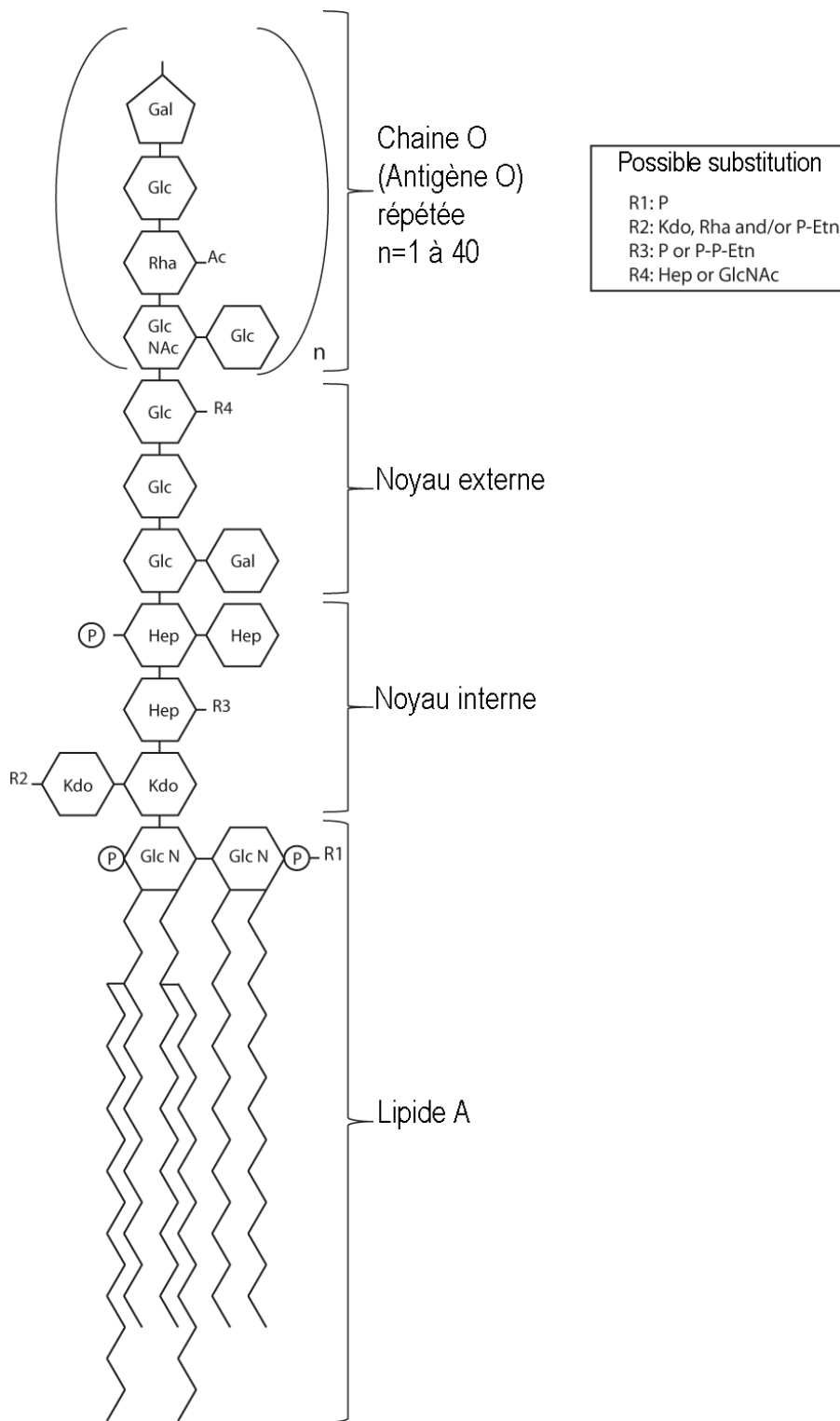


Figure 7. Structure générale du LPS exemple du LPS d'*E. coli*. (Extrait et traduit de Planesse C. et al. Cytokine, 2015;73 :190-195)

3.2.4. Agrégabilité des LPS

Du fait de leur caractère amphiphile, les molécules de LPS en solution aqueuse sont capables de s'agréger entre elles. L'ensemble de ces molécules peut alors adopter différents types de structure supra moléculaire comme des micelles, des vésicules ou des formations en bicouche. La structure supramoléculaire alors formée dépend de différents paramètres comme la concentration en LPS, la température, le pH, la nature du solvant, la présence de cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) [36], mais également la structure du LPS lui-même [37,38]. Néanmoins le facteur principal reste la concentration en LPS, l'organisation du LPS est fonction de la concentration d'agrégation critique [39]. En dessous de ce seuil, le LPS est principalement sous forme de micelles, et au-dessus de ce seuil il formera un édifice supramoléculaire plus complexe [40]. Ce seuil est différent en fonction du type de LPS.

3.3. La variabilité des LPS

Le LPS est une molécule présentant une immense variabilité de structure entre espèces mais également au sein d'une même espèce. La structure générale du LPS telle que décrite précédemment est constante quelle que soit l'espèce bactérienne considérée. Des variations dans la structure peuvent toutefois exister et ses variations sont à l'origine d'une classification des colonies bactériennes.

Historiquement, la classification des colonies bactériennes était fondée sur leur aspect visuel. Par la suite les chercheurs ont découvert que la chaîne O était la cause de ses différentes textures des colonies bactériennes. C'est pourquoi cette nomenclature a été conservée pour décrire les différents LPS en fonction de la taille de la chaîne O [41]. La structure du LPS est en lien direct avec la forme des colonies.

- Les bactéries présentant, sur les milieux solides de culture, des colonies rondes et brillantes à surface bombée et lisse, avec des marges bien délimitées et sans ondulations appartiennent au type « smooth » ou S. En milieu liquide (sérum physiologique, 0,85 % NaCl), ces colonies donnent une suspension stable avec une turbidité homogène. Ces bactéries possèdent un LPS complet qui contient donc les trois parties. Ce LPS est appelé "smooth-LPS" (LPS-S) ou LPS lisse.
- Les bactéries donnant sur les milieux solides de culture des colonies à marges irrégulières et ondulantes et à surface rugueuse et plate sont qualifiées de "rough" ou R. En sérum physiologique, ces colonies ne donnent pas de suspension stable et homogène, car les bactéries s'agglutinent entre elles. Ces bactéries ont un LPS dans la structure duquel il n'y a que le lipide A et le noyau, la chaîne O étant inexistante. Ce LPS incomplet est connu sous le nom de « rough LPS » (LPS-R) ou LPS rugueux.
- Il existe un type intermédiaire pour lequel les LPS sont pourvus d'une chaîne O se résumant à une seule sous-unité. Ce type de LPS est désigné par le terme « semi-rough » (LPS-SR) ou LPS semi-rugueux.
- Il existe des cas plus extrêmes où la chaîne O et le noyau sont absents, le LPS est nommé « deep rough » (LPS-DR) ou LPS rugueux profond. Ces mutants ne peuvent survivre, même *in vitro*, que dans des conditions particulières.

3.4. Méthode d'étude des LPS

De nombreuses études ont porté sur le LPS d'*E.coli*. Aujourd'hui de nombreux autres LPS issus d'espèces de bactéries différentes sont étudiés. Commercialement, on peut retrouver de nombreux LPS issus de différentes souches d'*E.coli*, mais aussi d'autres bactéries comme *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella minnesota* ou encore *Porphyromonas gingivalis*.

3.4.1. Extraction et purification

La principale technique d'extraction du LPS a été mise en place par Westphal en 1952 et optimisée en 1965 [42,43]. Le solvant d'extraction utilisé est un mélange phénol chaud et eau. La technique d'extraction exploite la différence de solubilité des différents constituants de la bactérie entre deux phases formées, une phase organique et une phase aqueuse. Le LPS se retrouve dans la phase aqueuse, qui sera ensuite filtrée et dialysée pour éliminer les traces de phénol. Le LPS est ensuite culotté et séché. Cette technique a été suivie d'une autre technique presque identique utilisant du phénol, du chloroforme et de l'éther de pétrole [44]. Ces méthodes d'extraction ne permettent pas d'obtenir un LPS pur et comportent des contaminations. Le LPS est souvent associé à d'autres protéines membranaires contaminants [45].

Les extraits de LPS obtenus après extraction peuvent comporter de nombreux contaminants tels que des protéines, des lipides, des lipopeptides et des acides nucléiques. Lors de l'utilisation du LPS pour des études portant sur des effets physiologiques sur cellule, ces contaminants peuvent constituer un réel problème dans l'interprétation des résultats. Une expérience menée avec du LPS d'*E.coli* a montré que l'activation des cellules était due à la présence de lipoprotéines. Deux lipoprotéines (Lip12 et Lip19) ont été identifiées comme étant les principaux composants responsables de l'activation des cellules par le TLR2 dans les préparations commerciales de LPS extraits de la bactérie *E. coli* [46]. Cela montre qu'une pureté quasi parfaite du LPS est nécessaire pour ne pas risquer d'imputer au LPS des effets observés qui seraient dus à des contaminants présents dans l'extrait de LPS. La purification du LPS est donc une étape déterminante. Différentes techniques peuvent être utilisées en complément de l'extraction :

- Chromatographie d'affinité sur colonne polymyxine B-agarose [47]
- Chromatographie échangeuse d'ions
- Digestion enzymatique pour éliminer l'ADN, ARN, et certaines protéines (DNAse, RNAse, protéinase K ...) [48].
- Re-purification du LPS pour l'extraction des résidus protéiques par mélange phénol/désoxycholate/triéthylamine (Phenol-TEA-DOC) [49].

Les préparations commerciales aujourd'hui précisent la pureté de leurs préparations. La méthode phénol/eau suivie d'une ou plusieurs étapes de purification permet d'obtenir du LPS dit « ultra-pure ». Suite à l'extraction et la purification, il est nécessaire de doser et d'évaluer la pureté de la préparation obtenue.

3.4.2. Dosage et pureté

La méthode la plus utilisée pour doser le LPS est tout simplement la mesure de la masse de matière obtenue après purification. Il est possible également de doser ce LPS en quantifiant des constituants qu'on ne retrouve que dans du LPS, comme par exemple le dosage du 3-hydroxymyristique (C14-OH), acide gras spécifique du lipide A et non présent chez les vertébrés, ou encore les sucres Kdo. Le dosage de ces constituants se fait principalement à l'aide d'une chromatographie liquide haute performance associée à une spectrométrie de masse. Le sucre Kdo peut également être dosé grâce à des méthodes colorimétriques [50–52]. Ces mesures peuvent parfois entraîner des biais selon la nature des contaminants et le type de LPS.

La pureté du LPS est évaluée par rapport à la concentration en contaminants. On peut ainsi avoir différents degrés de pureté en fonction du type d'extraction et de purification jusqu'à atteindre une valeur supérieure à 99%. La pureté peut être également appréciée en fonction des effets cellulaires observés, plus précisément en fonction des récepteurs cellulaires activés par le LPS (développé dans la suite).

3.4.3. Mesure de l'activité des LPS

En plus du dosage, de la concentration et de la pureté, on mesure l'activité cytotoxique du LPS encore appelée mesure de l'activité biologique. Le test LAL (Limulus Amebocyte Lysate) est utilisé pour évaluer cette activité biologique. Ce test a été développé suite à une observation faite d'un phénomène de coagulation lorsque du sang de limule a été mis en présence de bactéries Gram- [53]. Il a été montré que la coagulation était due à la présence de LPS. Ce dernier active une enzyme, la coagulase, qui clive le coagulogène en coaguline, on mesure alors l'activité de cette enzyme. Aujourd'hui, des protéines recombinantes ont remplacé le sang de la limule [54]. Il existe plusieurs types de test LAL:

- Mesure de la turbidité de la coaguline dans un liquide
- Mesure de la gélification de la coaguline
- Mesure par coloration, dans lequel on remplace le substrat de l'enzyme coagulase par un substrat (la paranitroaniline) qui lorsqu'il est clivé apparaît coloré.

Ces tests LAL sont sensibles à une grande variété de LPS, mais également aux différents contaminants qui peuvent biaiser les résultats du test LAL [55,56], qui rend ce test peu spécifique. De plus la mesure de l'activité biologique est totalement en relation avec la structure du LPS, chaque type de LPS aura une activité spécifique [57,58]. Toutefois il a été montré que ce test d'activité biologique n'était pas en adéquation avec les réponses des cellules immunitaires [57–60]. Cette activité biologique ne reflète pas totalement le pouvoir immunogène des LPS. Cette mesure est donc complémentaire aux autres mesures évoquées.

3.4.4. Analyse structurale

Une bactérie pouvant donner plusieurs LPS différents, après purification, on obtient un ensemble de LPS qui diffèrent principalement par la nature de leurs chaînes O, définissant différents chémotypes. Afin d'étudier le niveau d'hétérogénéité de l'extrait de LPS purifié et de distinguer les différents types chimiques de LPS présents, ainsi que leurs proportions relatives, quatre techniques principales peuvent être utilisées:

- l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) [61]
- la chromatographie sur couche mince [62,63]
- l'électrophorèse capillaire [64]
- la chromatographie sur colonne de silice ou d'hydroxyapatite [65]

Ces techniques permettent de séparer les différents chémotypes en fonction de leur poids moléculaire. Une fois les différents chémotypes séparés et isolés, la structure du LPS peut être analysée par spectrométrie de masse.

3.5. Voie d'entrée et de sortie des LPS dans l'organisme

Le LPS joue un rôle clé dans un grand nombre de maladies infectieuses et également non infectieuses. Le LPS est connu pour induire une forte inflammation. C'est la molécule connue pour induire la plus forte réponse inflammatoire et la plus grande diversité de réponse inflammatoire sur le système immunitaire.

3.5.1. Voies d'entrée

Le LPS peut pénétrer dans l'organisme selon différentes voies. Dans la plupart des cas, les LPS sont introduits dans l'organisme en traversant les barrières physiologiques de l'organisme sous forme libre.

- L'inhalation de LPS : le LPS est présent dans l'air [66] et les poussières [67]. Il est présent en quantité particulièrement importante dans certains environnements [68], notamment le secteur agricole, l'industrie du coton [67,69], les entreprises de compostage des déchets [70], mais également dans des cigarettes [71]. Le LPS inhalé conduit à une inflammation au niveau des poumons qui constituent une voie d'entrée dans l'organisme [72–74].
- Le microbiote de l'organisme humain peut être une source de LPS. L'ensemble des micro-organismes qui vivent en symbiose avec l'organisme se retrouve essentiellement sur la peau et dans le tractus digestif. Ils ne provoquent pas de maladie, mais représentent toutefois une source de LPS. Un régime enrichi en graisses est associé à des modifications de la flore intestinale humaine et animale. Ces changements entraînent une augmentation du rapport entre les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif et augmentent la probabilité de diffusion des LPS dans le sang [75,76]. La perméabilité de la paroi intestinale peut également être augmentée au cours de ce régime [77–79]. Une augmentation de la perméabilité de la paroi intestinale a été mise en évidence suite une stimulation par du LPS [80,81]. Ce phénomène est en partie responsable de l'initiation de l'inflammation caractérisant l'obésité et le diabète de type 2. Le microbiote intestinal joue ainsi un rôle majeur dans les maladies métaboliques [82,83].
- L'introduction de LPS dans le compartiment vasculaire des patients lors de traumatismes portant atteinte à l'intégrité des barrières protectrices de l'organisme ou d'actes médicaux invasifs (injections, transfusions, hémodialyses, circulation extracorporelle, actes chirurgicaux, etc.) [84–87].
- Dans le cas d'une infection bactérienne, le LPS pénètre l'organisme avec les bactéries, puis il est libéré une fois dans le milieu intérieur.

3.5.2. La capture et l'élimination

Une voie d'élimination du LPS associée à la voie d'élimination du cholestérol a été mise en évidence. Cette voie est appelée le transport inverse du LPS en référence au transport inverse du cholestérol [88,89]. Cette voie d'élimination du LPS utilise les mêmes enzymes que la voie du cholestérol, en particulier la PLTP (phospholipid transfer protein) [88]. La PLTP aurait une grande similitude de structure avec la LBP (Lipopolysaccharide Binding Protein)[90]. Ces deux protéines sont capables de transférer du LPS aux HDL et LDL [91,92]. Néanmoins la PLTP ne facilite pas la fixation du LPS au CD14, contrairement au LBP [92]. Ce transfert du LPS vers les lipoprotéines conduit à l'inactivation de ce même LPS [93]. Cette inactivation est également observée en présence d'une protéine présente dans les HDL, l'apolipoprotéine A1 (Apo A1) [93]. L'effet inhibiteur sur le LPS observé est fonction du type de lipoprotéine impliquée (HDL>LDL>VLDL). Il existe ainsi un lien étroit entre le métabolisme des lipides et l'immunité lié au LPS.

L'élimination de ce LPS inactivé par les lipoprotéines se fait par le foie. Il a été montré que suite à une injection de LPS chez des mammifères, on le retrouve en grande proportion dans le foie de ces animaux [94–96], plus précisément au niveau des hépatocytes [97,98] avant de se retrouver dans la bile [98]. Durant ces étapes plusieurs enzymes interviennent et dégradent le LPS. Les étapes de cette détoxification du LPS sont aujourd'hui mal connues, même si l'acide biliaire est connu pour être impliqué dans ce phénomène [99–101].

3.6.LPS et inflammation

Le LPS est capable d'induire une réponse inflammatoire dans tout type de cellules aussi bien spécialisées dans la réponse immunitaire ou non, à partir du moment où elles possèdent les récepteurs adéquats. Pour déterminer la partie du LPS responsable de son activité pro-inflammatoire, les chercheurs ont scindé le LPS en ses différentes parties. Le fait de couper le lien entre le lipide A et le noyau, permet d'obtenir le lipide A sans

ses chaînes O et le noyau. Il a ainsi été montré que l'activité pro-inflammatoire pouvait être attribuée au lipide A [102]. Une forme synthétique de ce lipide A a montré les mêmes propriétés biologiques que le lipide A d'*E. coli* [103,104].

3.6.1. Signalisation cellulaire

La signalisation cellulaire induite par la reconnaissance du LPS est aujourd'hui bien décrite. Le mécanisme d'action du LPS sur le système immunitaire implique une étape de reconnaissance du LPS, puis une fixation sur son récepteur et enfin une cascade de signalisation conduisant à la production de cytokines inflammatoires [105] (Figure 8).

3.6.1.1. Reconnaissance du LPS

Deux protéines jouent un rôle clé dans la reconnaissance et la fixation du LPS dans le milieu extra cellulaire, le LBP et le CD14. La protéine LBP est libre dans le milieu extracellulaire et fixe le LPS par l'intermédiaire de son lipide A [106]. Cette protéine est surexprimée lors du syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) [107]. Cette réponse inflammatoire est due à une agression grave comme une infection, un traumatisme ou un état de choc. La protéine LBP est capable d'interagir également avec le CD14 [108]. Le CD14 peut se trouver sous deux formes, une forme membranaire et une forme soluble (sCD14) issue du clivage de la forme membranaire [109,110]. Les cellules dépourvues de CD14 à leur surface, comme par exemple les cellules épithéliales, utilisent le sCD14 pour répondre au LPS [110]. Comme le LPS circule souvent sous forme de micelle, la LBP permet de déstabiliser ce complexe pour récupérer une molécule de LPS et puis s'associer au CD14 [108,111]. Le CD14 peut interagir avec le LPS directement, mais la présence de micelles en milieu aqueux entraîne une diffusion lente des monomères de LPS [108]. Le LBP va donc potentialiser cette interaction [112].

Les souris KO pour CD14 ont des niveaux de réponses aux LPS 10000 fois inférieurs à la normale [113], alors qu'aucune différence dans les réponses aux LPS n'est observée chez les souris KO pour la LBP, *in vivo* [114]. Toutefois *in vitro* les cellules issues de ces souris répondent 1000 fois moins aux LPS. Il a été montré que le LPS peut également se lier à de l'albumine et remplacer le LBP en son absence. Mais cette voie est minoritaire en présence de LBP [115].

3.6.1.2. Récepteur cellulaire du LPS

Le complexe CD14/LPS se fixe à la membrane plasmique grâce au CD14, qu'il soit membranaire ou soluble. Cependant, CD14 ne possédant pas de domaine intracellulaire, il ne peut pas être considéré, comme l'initiateur de l'activation de la réponse immunitaire. Le récepteur TLR4 a été identifié comme étant le récepteur essentiel pour la signalisation du LPS. En effet, les souris TLR4 KO sont insensibles à une stimulation aux LPS [116]. Pour fonctionner le TLR4 a besoin de son corécepteur MD-2 (Myeloid differentiation factor 2). Il a en effet été montré que des souris MD-2 KO restaient insensibles au LPS [117]. MD2 est associé à TLR4 du côté extracellulaire. Une partie des acides gras du lipide A se fixe à MD-2 [118,119] et l'autre partie des chaînes d'acides gras vont se fixer au TLR4, en formant également un dimère de complexe TLR4/MD-2 [120,121]. Ainsi deux complexes TLR4/MD-2 lient deux molécules de LPS, en se dimérisant ils vont induire une cascade de signalisations intracellulaires.

3.6.1.3. Cascade de signalisation intracellulaire

Suite à la liaison du LPS à son récepteur TLR4, ce dernier déclenche deux types de voies de signalisation intracellulaire, une voie dépendant de MyD88 (Myeloid differentiation factor 88) et une autre de TRIF (TIR-

domain-containing adapter-inducing InterFeron-β) [13,122]. Ces deux cascades sont activées de façon parallèle dans la cellule.

- La voie passant par MyD88 se traduit par l'activation des facteurs de transcription NF-κB et d'AP-1 (Activating Protein-1).
- La voie passant par TRIF est plus lente à être activée car elle nécessite l'internalisation du dimère de TLR4 et débute à partir des endosomes [123,124]. Cette voie de signalisation possède une partie commune avec la voie MyD88. Elle se traduit par l'activation des facteurs de transcription NF-κB, d'AP-1, mais également IRF3.

Les deux voies de signalisation sont importantes pour induire une réponse inflammatoire [125], même si la voie prédominante est celle dépendante de MyD88 [126]. Dans les deux cas, cela mène à la production des cytokines inflammatoires IL-6, IFN-α, TNF-α, MCP-1. De plus, le facteur de transcription IRF3 induit la production d'interféron de type I.

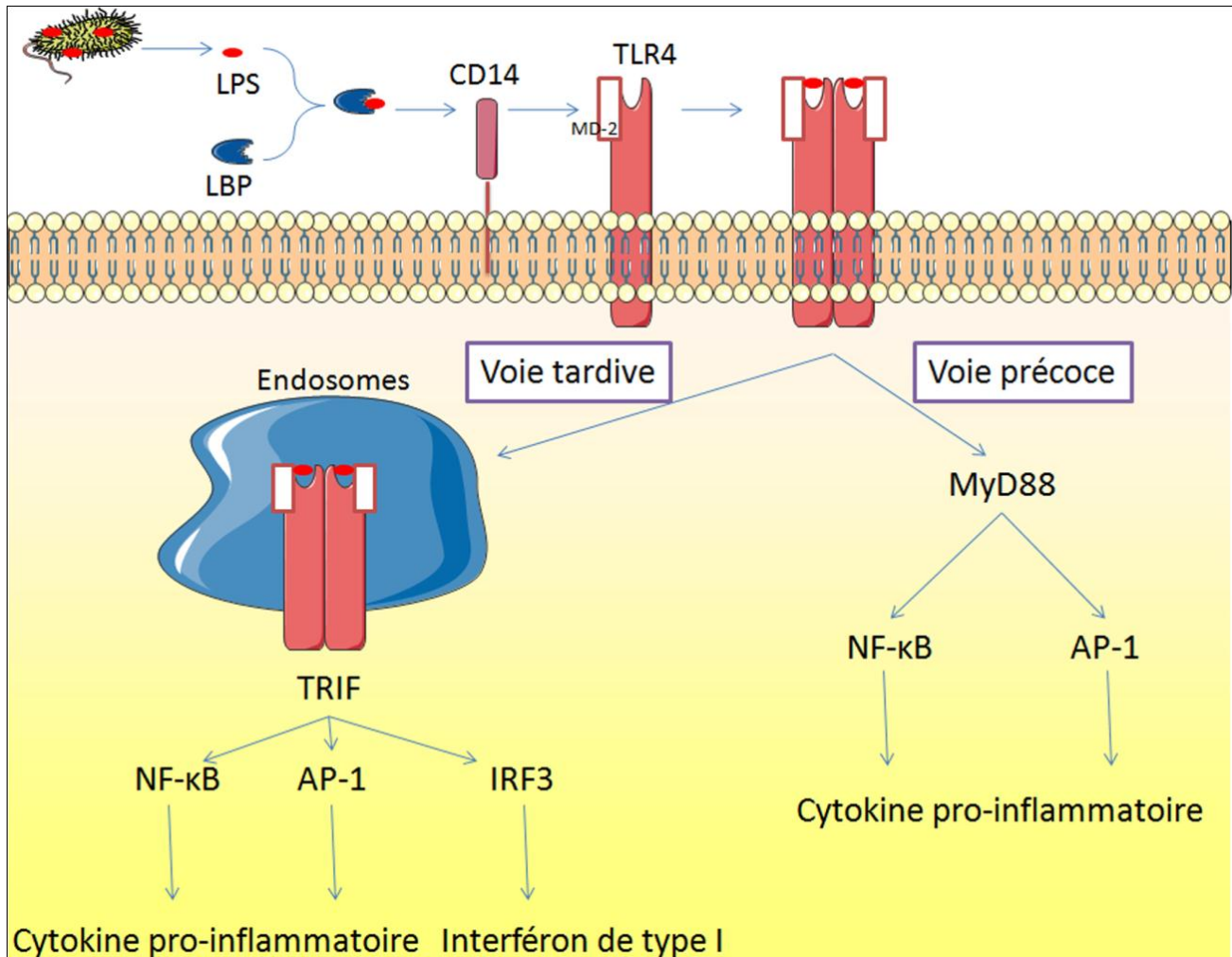


Figure 8. Mécanisme de reconnaissance et d'activation des cellules par du LPS, et activation des voies intracellulaire précoce et tardive.

3.6.2. Relation structure inflammation

Il existe un grand nombre de LPS différents et également de lipides A différents, l'interaction entre ces LPS et les protéines connues pour fixer le LPS (LBP, CD14, et TLR4/MD-2) se fera avec des affinités différentes, et donc des réponses cellulaires et inflammatoires différentes. Le lipide A est au centre de l'activité biologique du LPS. Il existe différents types de lipide A, et une modification mineure dans la structure de ce lipide A peut entraîner une forte modulation de l'activité du LPS. Par exemple une simple déphosphorylation du lipide A du LPS de *E. coli* (passant d'une forme diphosphorylée à une forme monophosphorylée) peut être à l'origine d'une modification de l'affinité pour le complexe TLR4/MD-2 et donc diminuer son activité pro-inflammatoire [127,128] (Figure 9). Nous avons déjà vu que les lipides A se différenciaient par la nature des chaînes d'acides gras. Ces acides gras de par leur nombre, leur taille et le degré d'insaturation influencent l'activité du LPS en modulant son affinité avec les protéines connues pour fixer le LPS [129,130].

- La longueur des chaînes d'acides gras du lipide A est un facteur impliqué dans cette activité : la présence d'acide gras à 8 atomes de carbone confère une affinité moindre pour le TLR4 que celle d'un acide gras avec une chaîne carbonée plus longue, 10 atomes de carbone par exemple [131].
- La présence de carbones asymétriques dans le lipide A aura également une influence dans l'activité du LPS [132,133].
- Le nombre de chaîne d'acide gras est le facteur le plus important dans l'activité du LPS. Un nombre de chaîne faible (<5) est associé à une activité faible du LPS. Par exemple la modification du nombre d'acide gras du lipide A de *E. coli*, passant de hexa-acétylé à penta-acétylé, induit une forte diminution de l'activité pro-inflammatoire du LPS [134,135]. Ceci a également été observé chez d'autres bactéries [136]. Il existe un composé synthétique (compound 406) représentant ce lipide A tétra-acétylé qui n'a presque aucun effet inflammatoire, il a même un effet antagoniste sur les récepteurs TLR4 [137,138]. De plus lorsqu'on enlève totalement les chaînes acides gras du lipide A (LPS détoxifié), on observe une très forte diminution d'activité du LPS de l'ordre de 10000 fois [139].
- La position des chaînes d'acides gras également joue sur la capacité inflammatoire du LPS.

Les phosphates du squelette et les chaînes d'acides gras du lipide A sont les modulateurs de l'activité du LPS [140] (Figure 9). De plus, la nature du lipide A a des effets variables sur l'activité du LPS, démontrant ainsi l'importance de la configuration spatiale du lipide A pour son interaction avec ses récepteurs [141].

La chaîne O joue également un rôle important dans la réponse immunitaire mais différent du lipide A. La chaîne O agit comme un inhibiteur de l'interaction du LPS avec le TLR4 [142]. Par exemple, certaines bactéries comme *Helicobacter pylori*, *Porphyromonas gingivalis*, et *L. pneumophila*, synthétisent une forme de LPS avec une très longue chaîne O, qui n'est pas reconnue par le TLR4 [143]. La taille de la chaîne O est souvent un indicateur de la virulence de la bactérie [35].

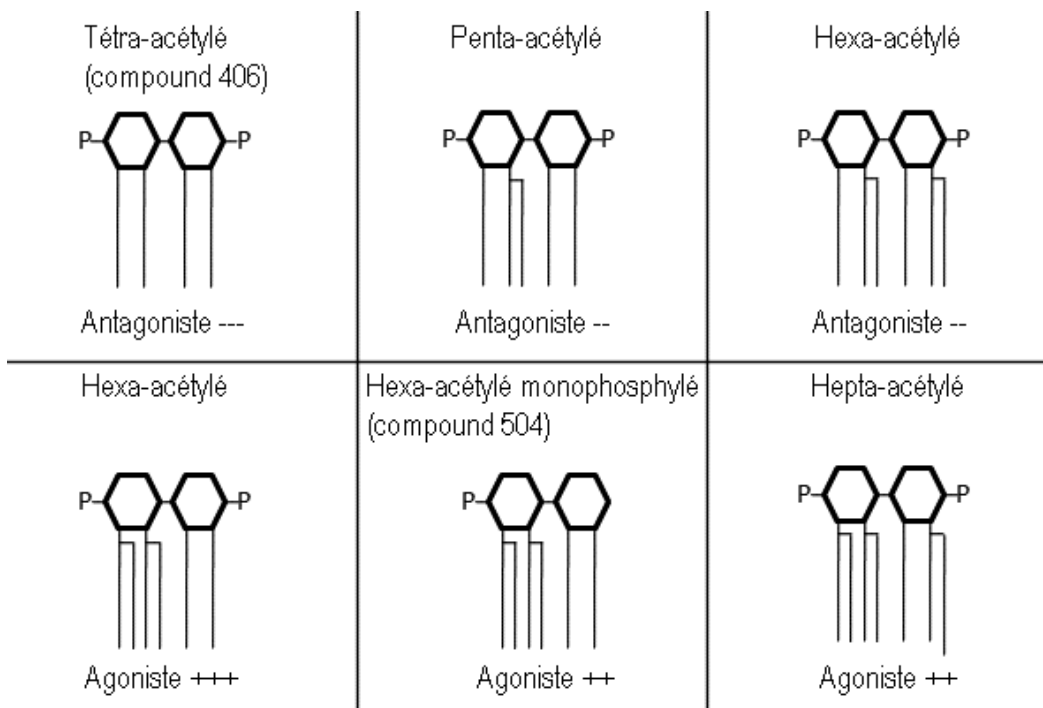


Figure 9. Structure du lipide A de différents LPS en fonction de sa capacité inflammatoire. (D'après Rietschel ET. et al. Prog. in Clin. and Biol. Res., 1985, 189:31-51)

3.7. Conclusion

Le LPS est une molécule non protéique de la membrane externe des bactéries Gram-. Il est composé de 3 domaines : la chaîne O, le noyau, et le lipide A. Il existe une grande variété inter- et intra- espèce. Cette variabilité concerne principalement la chaîne O constituée de multiples oligosaccharides. Une autre source d'hétérogénéité est le lipide A au niveau de la nature de ses acides gras. Aujourd'hui il existe des techniques permettant d'extraire et de purifier le LPS des bactéries Gram-. La principale limite se trouve dans la pureté des extraits de LPS, ces extraits pouvant comporter différents contaminants d'origine bactérienne. Il existe de nos jours différentes techniques d'analyse et de mesure de l'activité du LPS permettant d'étudier cette pureté.

Le LPS peut entrer dans l'organisme par différentes voies aussi bien de manière directe dans le cas d'infection bactérienne, ou indirectement via des voies aériennes, intestinales ou actes chirurgicaux. Il est intéressant de noter que récemment une nouvelle théorie sur l'installation de maladie métabolique a été proposée qui impliquerait les LPS de la microflore intestinale. Une fois dans l'organisme ce LPS agit comme inducteur de l'inflammation. Le LPS est connu pour induire l'une des réponses pro-inflammatoire la plus importante connue. Néanmoins cette capacité pro-inflammatoire varie en fonction des différents types de LPS, dépendant principalement de la structure du lipide A. Ce LPS est reconnu dans l'organisme grâce à la protéine LBP. Le LBP va ramener le LPS au niveau des cellules qui interagiront avec le LPS grâce au complexe CD14/MD-2/TLR4. Cette interaction conduit à deux cascades de signalisation intracellulaire l'une dépendant de MyD88 et l'autre de TRIF, induisant la production de cytokines pro-inflammatoire telles que TNF- α , INF, IL-6 et MCP-1.

4. DAMP : exemple de HMGB1

4.1.Introduction

La protéine High Mobility Group Box 1 (HMGB1) fait partie de la super famille des High Mobility Group (HMG) qui inclut les familles HMGA, HMGB et HMGN [144]. La famille HMGB comporte 4 membres notés de 1 à 4. Tous les membres de cette famille possèdent le même type de structure.

HMGB1 est également connue sous le nom d'amphotérine ou HMG-1. La séquence de cette protéine est extrêmement bien conservée au cours de l'évolution. On la retrouve chez toutes les espèces de l'homme aux bactéries en passant par les plantes, les insectes, et les poissons [145]. Il y a 99% homologie de séquence entre les rongeurs et l'Homme [146,147]. C'est une protéine ubiquitaire et la plus fortement exprimée de toute la superfamille des HMG.

HMGB1 est une protéine nucléaire de type non-histone. On la retrouve essentiellement dans le noyau des cellules de mammifère. HMGB1 peut également être retrouvé dans le cytoplasme et dans le milieu extracellulaire. Des modifications post-traductionnelles peuvent intervenir entraînant une relocalisation de la protéine.

4.2.Structure et modification post traductionnelle de HMGB1

HMGB1 est une protéine globulaire de 25kDa, comportant 3 domaines : deux domaines de liaison à l'ADN (Box-A et Box-B) chargés positivement, et une queue acide chargée négativement (Figure 12).

Les deux domaines de liaison à l'ADN sont formés chacun d'environ 80 résidus d'acides aminés organisés en 3 hélices alpha. La présence de nombreuses charges positives permet la liaison avec l'ADN au niveau du petit sillon. Cette interaction s'accompagne d'un changement de conformation de l'ADN. De plus il a été décrit que ce domaine interagit préférentiellement avec des régions altérées de l'ADN [148]

La queue acide située en position C-terminale est formée d'environ 30 résidus aminoacides qui sont exclusivement des acides aspartique et glutamique. Cette queue acide peut interagir avec les Box et moduler leur propriété de fixation à l'ADN principalement [149–151]. La masse moléculaire prédite pour HMGB1 est de 25kDa, mais il migre vers 30kDa sur gel SDS-PAGE, ceci à cause de la forte charge positive des Box. La présence d'une charge positive et d'une charge négative à chacune des extrémités de la protéine confère à celle-ci une forte bipolarité.

HMGB1 peut subir des modifications post traductionnelles conduisant à sa relocalisation. Différentes modifications de type acétylation [152], phosphorylation [153], méthylation [154], glycation et ADP-ribosylation, induisent la relocalisation de HMGB1 dans le cytoplasme ou le milieu extracellulaire. La protéine HMGB1 est maintenue dans le noyau grâce à deux séquences particulières de signal de localisation nucléaire (NLS, Nuclear Location Signal) riches en résidus lysine. Ces séquences sont localisées dans les Box-A et Box-B. La modification post-traductionnelle de ces NLS (acétylation, phosphorylation, méthylation) permet de déterminer la localisation de HMGB1 dans la cellule (noyau ou cytoplasme) [152] ou dans le milieu extracellulaire. HMGB1 possède également une région appelée signal d'exportation nucléaire (NES, Nuclear Export Signal) qui permet la fixation de la protéine CRM1 (Chromosomal Maintenance 1) impliquée dans sa sortie du noyau. HMGB1 passe dans le cytoplasme à l'aide de cette protéine CRM1 [153,155].

HMGB1 comporte 3 cystéines en position 23, 45 et 106. Les cystéines 23 et 45 sont impliquées dans la formation d'un pont disulfure. Ce n'est que récemment, que les chercheurs ont découvert que l'état d'oxydation des cystéines était très important dans la fonction de HMGB1. Une nomenclature de HMGB1 a été ainsi mise en place en 2014 [156]. Dans la cellule, HMGB1 est totalement réduite (C23-SH, C45-SH, C106-SH, appelée HMGB-SH). En dehors de la cellule, lorsque la protéine est totalement réduite, elle possède une activité chimiokine. Lorsque la cystéine 106 est réduite et qu'il y a un pont disulfure entre la cystéine 23 et la cystéine 45 (C23-C45, C106-SH, appelée HMGB1-SS), elle a une activité cytokine. Par ailleurs, lorsque la protéine est totalement oxydée (C23-SO₃H, C45-SO₃H, C106-SO₃H, appelée HMGB1-SO), elle ne présente plus aucune de ces fonctions [157,158].

Le domaine Box-B contient une région spécifique (position 89 à 108) impliquée dans l'interaction entre HMGB1 et TLR4 [159]. La cystéine 106 est présente dans cette région et elle est impliquée dans l'interaction avec le TLR4. En effet, une mutation de cette cystéine entraîne la perte d'interaction avec TLR4 [160]. En plus de l'importance de la cystéine 106 dans l'activité cytokine pro-inflammatoire de HMGB1, la présence du pont disulfure est importante pour maintenir la structure de la protéine [161].

La cystéine 106 est également importante dans la cellule pour sa migration entre le noyau et le cytoplasme [162]. L'état des cystéines de HMGB1 influence également sa fixation à l'ADN [163–165], une modification de ces cystéines entraîne une perte d'affinité pour l'ADN (Figure 10).

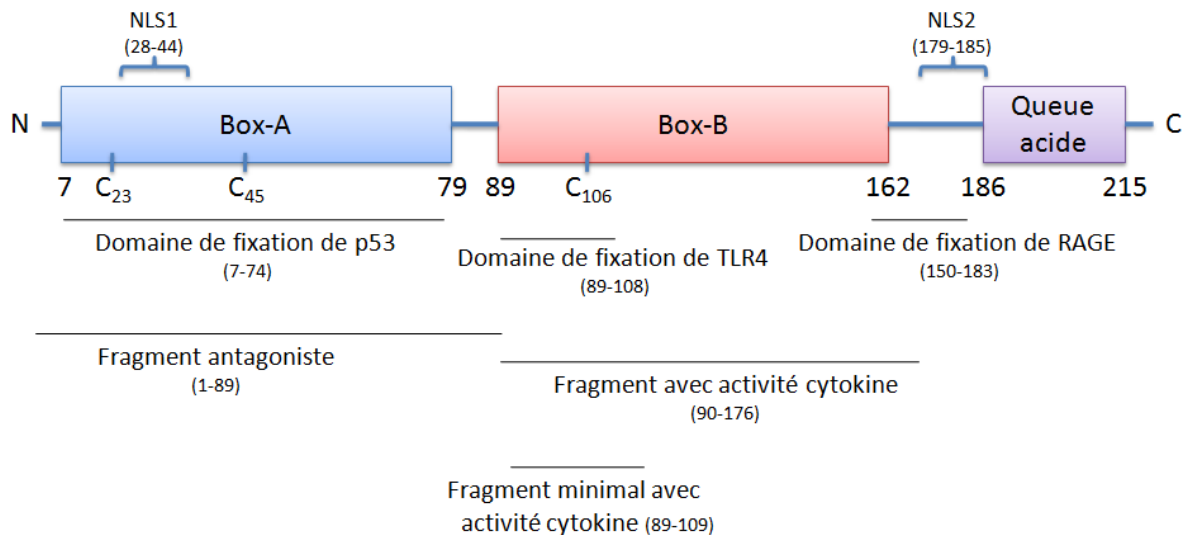


Figure 10. Structure et domaine important de HMGB1. (D'après [166])

4.3.Fonction

4.3.1. Fonction intracellulaire

Dans le noyau, HMGB1 joue un rôle important ; il interagit avec l'ADN et module l'architecture de l'ADN. Il participe à la régulation de la transcription en modifiant la structure de l'ADN et en stabilisant le nucléosome [148]. HMGB1 se fixe à l'ADN indépendamment de la séquence nucléique, facilitant le déroulement de l'ADN pour la fixation des facteurs de transcription. HMGB1 intervient dans les phénomènes de réplication et de réparation de l'ADN, ainsi que dans la régulation de la transcription des gènes [145].

HMGB1 est une protéine très mobile, elle est en constant mouvement au sein de la cellule entre le noyau et le cytoplasme [167,168]. Le ratio entre noyau et cytoplasme en condition normale est de 30 :1 [169]. Cette mobilité perpétuelle assure à HMGB1 d'être présent à tout moment pour les besoins localisés de la cellule.

HMGB1 est essentiel à la survie des organismes, en effet les souris HMGB1 KO meurent 1 à 2 jours après la naissance, suite à une hypoglycémie. Les lignées de cellules HMGB1 KO présentent des perturbations de l'expression de nombreuses protéines, en particulier le récepteur pour les glucocorticoïdes [170].

HMGB1 intervient aussi, dans la cellule, dans les phénomènes d'autophagie [2]. L'autophagie est un mécanisme de la cellule qui permet la dégradation et le recyclage des composants cellulaires comme les protéines et les organelles, suite à une privation en nutriments ou suite à une accumulation trop importante potentiellement toxique dans la cellule [171]. Lors d'un stress, HMGB1 se retrouve dans le cytoplasme, participe et aide à l'autophagie [172]. Dans la cellule, HMGB1 participe à l'autophagie en interagissant avec Beclin1. Cette interaction nécessite la forme HMGB1-SS dans le cytoplasme des cellules [173].

HMGB1 inhibe également l'apoptose des cellules en augmentant l'expression de molécules anti-apoptotiques comme Bcl-XL [174–176].

On peut également retrouver HMGB1 à la surface externe de certaines cellules. Au niveau des plaquettes, HMGB1 se retrouve à la surface membranaire lorsque celles-ci sont activées [177]. On le retrouve également à la surface des cellules nerveuses, lors de la germination axonale et de l'excroissance des neurites [178].

4.3.2. La libération de HMGB1 dans le milieu extracellulaire

HMGB1 peut être libéré dans le milieu extracellulaire de façon active ou passive (Figure 11). Il existe des différences moléculaires et fonctionnelles de HMGB1 entre ses différentes formes de libération.

4.3.2.1. Libération active

Lorsque les cellules sont stressées, on observe une translocation de HMGB1 du noyau vers le cytoplasme [152,179] d'où il est ensuite libéré de manière active dans le milieu extracellulaire. Cette sécrétion active de HMGB1 est principalement connue pour les cellules de l'immunité innée, mais toutes les cellules sont capables de la mettre en œuvre. De nombreux stimuli pro-inflammatoires sont connus pour induire la sécrétion active de HMGB1 comme par exemple le LPS, le TNF- α , IFN ..., et ceci chez un grand nombre de type cellulaire aussi bien immunitaire comme les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les NK [180–182], que non immunitaires comme les neurones, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales [183]. Cette sécrétion de HMGB1 ne nécessite pas une nouvelle synthèse, mais utilise le HMGB1 déjà présent dans la cellule principalement dans le noyau.

Le mécanisme de sécrétion de HMGB1 ne passe pas par la voie de sécrétion classique, car il ne possède pas de séquence signal pour ce type d'expression. Cette sécrétion active requière l'acétylation de HMGB1 sur les deux sites spécifiques des NLS [152]. HMGB1 passe dans le cytoplasme également grâce à l'aide de la protéine CRM1 [153,155]. Il a été montré récemment que la glycosylation était impliquée dans la libération de HMGB1 du noyau [184]. La libération de HMGB1 pourrait passer par l'utilisation de la voie régulant les endosomes et la sécrétion par les lysosomes [152,185]. Un transporteur de cette voie non-classique a été identifié pour aider à la sécrétion de HMGB1, il s'agit de ATP-binding cassette transporteur 1 [186]. Ainsi HMGB1 serait présent et s'accumulerait dans les lysosomes, ces derniers fusionneraient avec la membrane permettant la libération de HMGB1 dans le milieu extracellulaire.

Un autre mécanisme de sécrétion de HMGB1 est la sécrétion lors de la pyroptose. Ce processus se situe entre sécrétion active et passive car il se termine par la mort des cellules. La pyroptose est un mécanisme découvert récemment, dans lequel la cellule met en place un complexe protéique appelé inflammasome. Ce complexe détecte les DAMP et PAMP dans les infections et les inflammations stériles [187]. Il va permettre la production de cytokines pro-inflammatoires. La pyroptose s'accompagne également de l'activation de la caspase 1 par l'inflammasome, qui conduit à la libération de cytokines pro-inflammatoires et de HMGB1 [188,189].

4.3.2.2. Libération passive

HMGB1 peut être libéré de manière passive lors des processus de nécrose et d'apoptose, néanmoins ces deux types de libération ont des effets différents sur HMGB1.

- La nécrose est un type de mort non-contrôlée de la cellule. Lorsque HMGB1 est libéré lors de la nécrose [9,205], il possède une activité pro-inflammatoire. La présence de HMGB1 dans le milieu extracellulaire sert ainsi de signal de nécrose, indiquant que des cellules ont été tuées et qu'une réparation du tissu est nécessaire [190].
- L'apoptose est un type de mort contrôlée par la cellule. Lors de la libération passive par apoptose, il a été démontré que HMGB1 était préférentiellement séquestré dans le noyau. HMGB1 se fixe de manière irréversible à l'ADN en cours d'apoptose [8]. La mobilité de HMGB1 est ainsi presque nulle, l'empêchant de se retrouver dans le milieu extracellulaire. Cette interaction n'est pas due à une modification de HMGB1, mais à celle de l'ADN des cellules qui entrent en apoptose [8]. Le complexe ADN/HMGB1 subit ensuite une translocation dans les vésicules générées durant l'apoptose [191]. De plus, lorsque les cellules en apoptose passent en nécrose secondaire, on n'observe pas de libération de HMGB1 et pas d'effet pro-inflammatoire, même après une lyse des corps apoptotiques [8]. Cette absence d'activité de HMGB1 suite à la nécrose secondaire et la lyse peut être expliquée par le fait que lors de l'apoptose un phénomène d'oxydation très important se met en place dans la cellule et HMGB1 est oxydée (HMGB1-SO), perdant ainsi son activité cytokine [192].

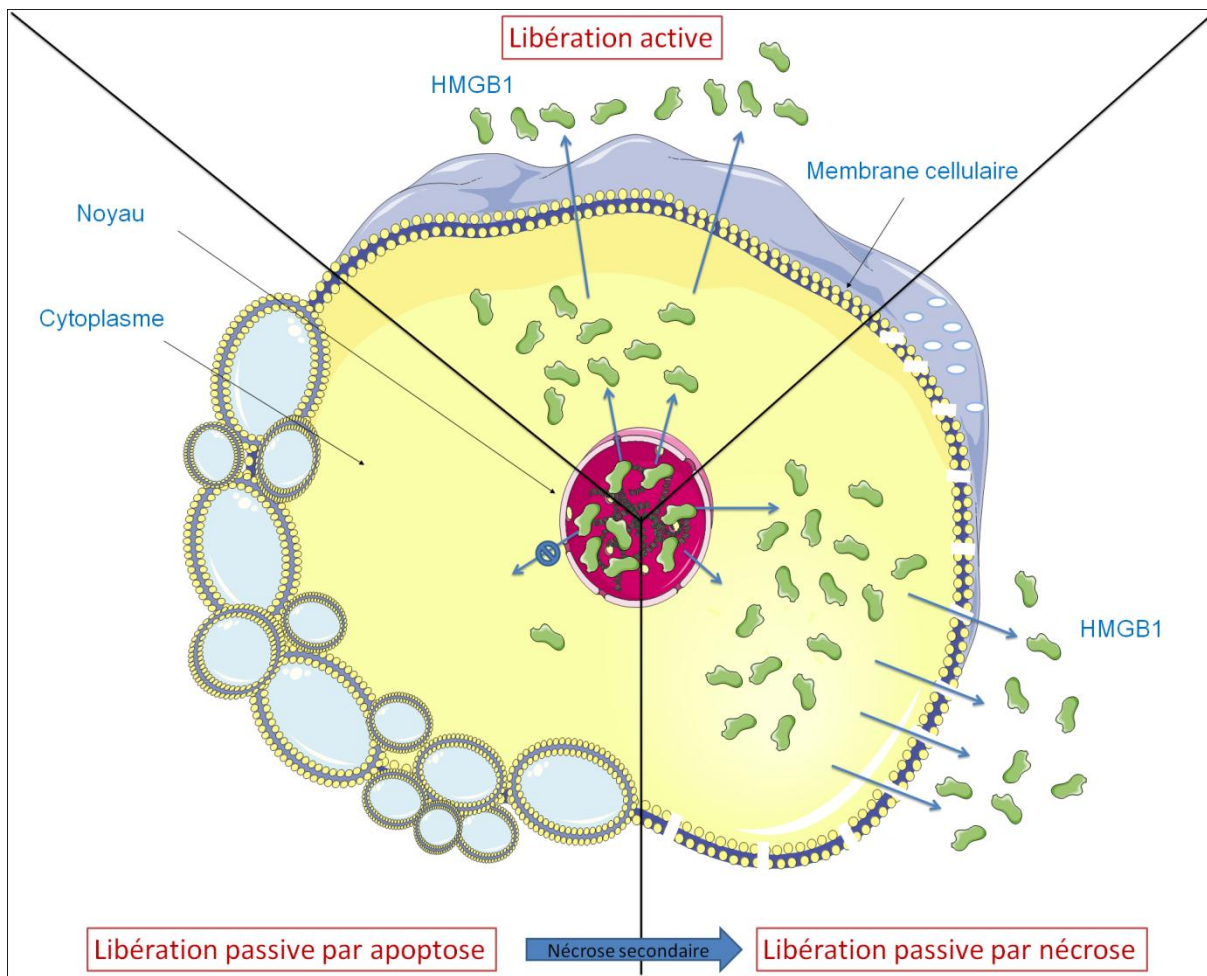


Figure 11. Les différents types de libération de HMGB1.

4.3.3. Fonction extracellulaire

HMGB1 est connu pour être impliqué dans de nombreuses fonctions en dehors de la cellule. La principale fonction de HMGB1 est celle d'alarmine activant les cellules du système immunitaire, mais également les cellules non-immunitaires. Dans le milieu extracellulaire, HMGB1 agirait ainsi comme chimiokine et comme cytokine avec des propriétés pro-inflammatoires. Elle attire et active les cellules immunitaires au sein d'un tissu enflammé [193,194]. Elle permet également une réponse plus importante du système immunitaire adaptatif. HMGB1 induit une activation et une maturation des cellules dendritiques [195,196], cellules clés parmi les cellules présentatrices d'antigène. Les cellules dendritiques produisent également HMGB1 lorsqu'elles sont stimulées. De plus, rajouté dans les adjuvants lors de l'immunisation de souris, HMGB1 induit une production d'anticorps plus importante [197]. Il interviendrait ainsi dans l'expansion clonale. HMGB1 aide à la polarisation des lymphocytes T naïfs [195,196].

HMGB1 agirait également comme protéine conduisant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins [198–201]. Il serait ainsi impliqué dans le développement de tumeurs [202,203]. Ces fonctions aident également dans les phénomènes de réparation tissulaire, attirant ainsi les cellules souches, les fibroblastes et les cellules endothéliales pour la réparation du tissu et des vaisseaux sanguins. Dans un modèle d'infarctus chez la souris,

l'administration de HMGB1 induit une accumulation de myocytes conduisant à une récupération cardiaque significative après l'infarctus [204].

Dans le milieu extracellulaire HMGB1 peut agir comme signal de dommage ou de détresse cellulaire, et activer des réponses physiologiques pour permettre la défense, la réparation et le soin des tissus touchés. Toutes ces observations montrent que HMGB1 intervient dans l'homéostasie tissulaire.

4.4.HMGB1 inflammation et cofacteur

4.4.1. Inflammation stérile et non-stérile

HMGB1 peut être libéré à la suite d'une infection par une bactérie ou un virus conduisant à la mise en place d'une inflammation du site d'infection. HMGB1 peut également se retrouver dans le milieu extracellulaire à la suite d'un préjudice subi par le tissu comme par exemple des ischémies, et des traumatismes, en l'absence de pathogène, conduisant à une inflammation stérile. HMGB1 peut ainsi être impliqué dans ces deux types d'inflammation [205].

Le premier récepteur décrit pour HMGB1 est le récepteur pour les produits avancés de glycation (RAGE) [206]. Toutefois compte tenu du fait que des souris KO pour RAGE sont toujours capables de répondre à HMGB1 et que l'utilisation d'anticorps anti-RAGE ne réduisant que partiellement la stimulation par HMGB1, il semblerait que RAGE ne soit pas l'unique récepteur de HMGB1 [21]. On a découvert par la suite que les récepteurs TLR2, TLR4, et TLR9 pouvaient également lier HMGB1 [207–212]. Néanmoins HMGB1 possède une plus forte affinité pour le récepteur RAGE que pour les TLR [213]. L'interaction entre HMGB1 et ses récepteurs conduit à l'activation des voies de signalisation PI3/AKT, MAPK, ERK1/2, p38 et NF- κ B [214–217], puis à l'expression de cytokines inflammatoires comme IL-6, IL-8, MCP-1 et TNF- α [218].

Les premières expériences ont montré des propriétés anti-bactériennes de HMGB1, cette protéine est en effet capable d'augmenter l'élimination des bactéries en culture [219]. Les recherches ont ensuite mis en évidence les propriétés pro-inflammatoires de HMGB1, lorsque celui-ci est libéré par des monocytes suite à une stimulation par du LPS [152]. HMGB1 est également capable d'induire l'activation des monocytes humains. Cette activation conduit à l'expression de cytokines inflammatoires, du récepteur RAGE et également de HMGB1 [218].

L'analyse des différents domaines de HMGB1 a mis en lumière une importance particulière du domaine Box-B pour l'activité pro-inflammatoire de HMGB1, plus précisément d'une région autour de la cystéine 106 [159]. De manière intéressante la Box-A seule agit plutôt comme antagoniste de HMGB1 et inhibe l'inflammation, et la queue acide aide à cet effet antagoniste [220–222] (Figure 10). Son action exacte n'est pas connue, mais la Box-A empêcherait la fixation de HMGB1 à ses récepteurs [220].

4.4.2. Cofacteurs

Des études récentes ont montré que du HMGB1 hautement purifié n'était pas capable d'induire une activité pro-inflammatoire par lui-même. L'interaction avec d'autres médiateurs pro-inflammatoires tels que ADN-CpG, IL-1 β et LPS, serait nécessaire pour exercer une influence synergique (Figure 12) [223,224].

4.4.2.1. LPS

HMGB1 est capable d'interagir avec le LPS. Des études ont montré qu'une forme recombinante ultra pure de HMGB1 n'était pas capable d'interagir avec le TLR4, en revanche associée à du LPS cette interaction devient

possible. Néanmoins ce résultat est à prendre avec précaution car la protéine HMGB1 produite n'a pas été caractérisée pour son état d'oxydation. Cependant du HMGB1 libéré suite à une stimulation par du LPS, est capable d'interagir avec le TLR4. Il est probable que HMGB1 se soit lié au LPS, permettant alors l'interaction avec TLR4 et une réponse inflammatoire. D'autres études ont montré que HMGB1 peut lier le LPS et avoir un effet synergique sur la capacité pro-inflammatoire du LPS [223–226].

HMGB1 favorise la fixation du LPS à CD14, comme le fait initialement la LBP, permettant son interaction avec TLR4 [227]. En plus du récepteur TLR4, le récepteur RAGE participe également à la réponse inflammatoire du complexe HMGB1/LPS dans les cellules [223–225]. Néanmoins il n'est pas essentiel pour cette réponse inflammatoire. HMGB1 est également capable d'interagir avec le LTA. HMGB1 est capable de transférer le LTA au CD14, qui interagit ensuite avec TLR2 et induit une cascade de signalisation pro-inflammatoire via NF- κ B [228].

Suite à une stimulation par du LPS, la cinétique de production de HMGB1 et des autres cytokines (IL-6, TNF- α , MCP-1, ...) est différente. La libération des cytokines se fait rapidement en moins de 2h, alors que celle du HMGB1 intervient 8h après la stimulation et dure plus longtemps, jusqu'à plus de 32h [182,229]. L'injection d'une forte concentration de HMGB1 chez la souris conduit à un choc septique, en particulier lorsqu'il est associé à des endotoxines [182,230]. Ainsi suite à une infection bactérienne la réponse immunitaire sera plus importante grâce à HMGB1.

4.4.2.2. ADN bactérien

Le même type de mécanisme est observé pour l'ADN, qui est présenté au TLR9 via HMGB1 [210,231]. HMGB1 interagit avec de l'ADN possédant le motif CpG, connu pour être fortement présent au sein de l'ADN de bactérie. Cet ADN CpG induit également la libération de HMGB1 par les cellules immunitaires. Le complexe HMGB1/ADN est reconnu par TLR9 et induit la production de facteurs pro-inflammatoires. TLR9 est présent dans la cellule, mais HMGB1 lui peut être cytoplasmique ou extracellulaire pour interagir avec TLR9. L'entrée de HMGB1 dans la cellule n'est pas connue. Il a été montré que HMGB1 interagirait avec TLR9 au préalable sans nécessité d'ADN, mais dans ces conditions aucune production de cytokine n'est observée. HMGB1 extracellulaire va lui interagir avec l'ADN et faciliter sa reconnaissance par TLR9 [210]. Ainsi dans ce mécanisme il n'y a pas d'ordre d'interaction. En plus du récepteur TLR9, le récepteur RAGE participe également à la réponse inflammatoire induite par le complexe HMGB1/ADN [231]. Dans les cellules, HMGB1 va ainsi aider à la réponse immunitaire, mais il n'est pas essentiel pour cette réponse inflammatoire.

4.4.2.3. Autres cofacteurs

Récemment, il a été découvert que HMGB1 est également capable d'interagir avec d'autres molécules [145], comme IL-1 β et son récepteur IL-1R pour induire l'inflammation [232], avec la protéine CXCL12 et son récepteur CXCR4 [233], et d'autres molécules également (pour une revue [145]).

De nombreuses études ont montré que le récepteur RAGE est le plus important récepteur pour HMGB1. Ainsi on peut émettre l'hypothèse que RAGE est le récepteur préférentiel de HMGB1 et dans les cas où il serait en interaction avec un cofacteur il pourrait ainsi interagir en plus avec le récepteur de ce cofacteur comme IL-1R pour IL-1 β ou TLR9 pour l'ADN, augmentant ainsi les effets observés. Cette capacité de HMGB1 à former un complexe avec ces ligands est une fonction importante de cette protéine, permettant d'augmenter la réponse inflammatoire en se liant à d'autres molécules de danger.

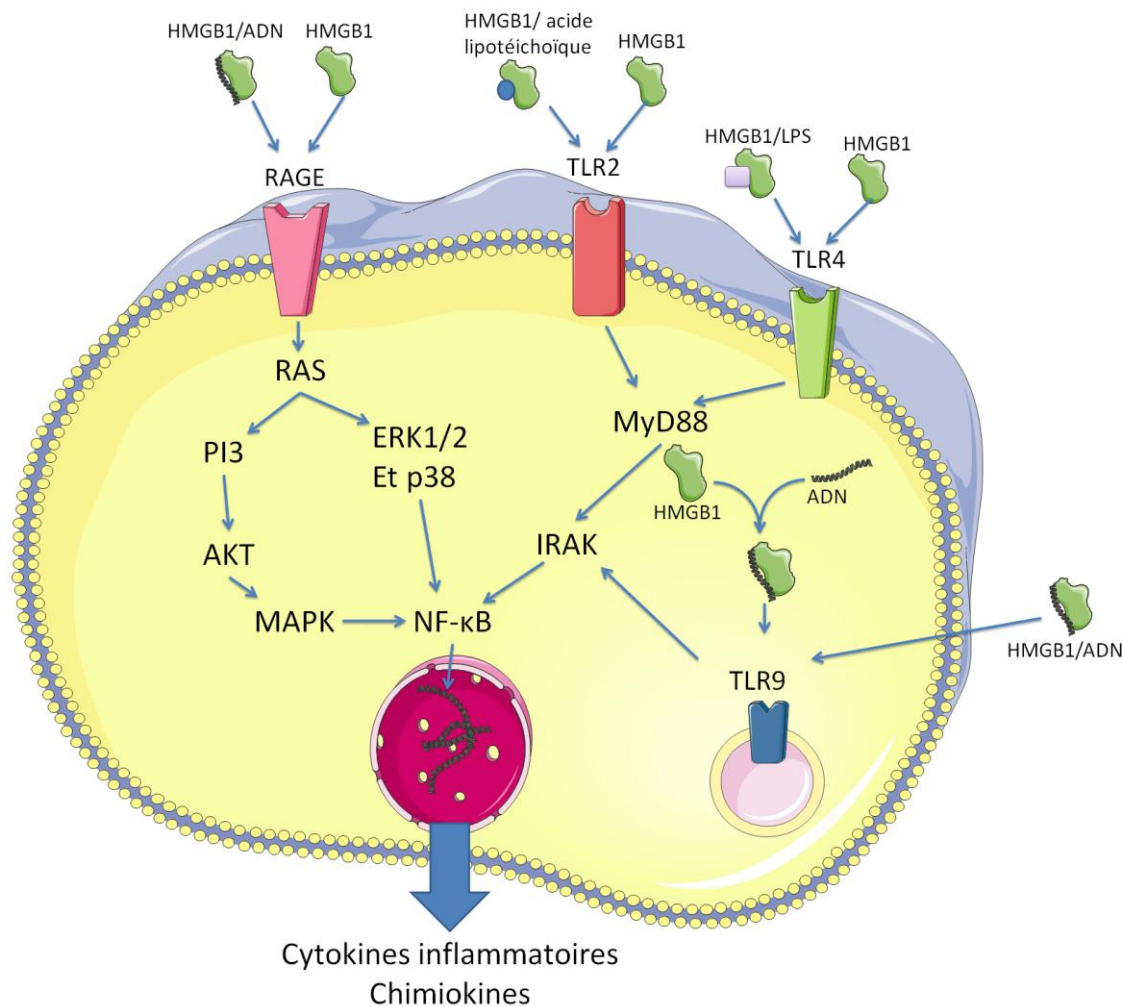


Figure 12. Voie intracellulaire de l'action de HMGB1 et de ses cofacteurs.

4.4.3. La complexité de l'étude de HMGB1

Les premières expériences ont été réalisées avec HMGB1 recombinant produit dans des bactéries *E. coli*. Néanmoins HMGB1 est capable d'interagir avec le LPS, l'ADN, LTA ... et ceci avec une forte affinité. Lors des premières manipulations de purification de HMGB1, l'élimination du LPS n'était pas toujours réalisée et vérifiée, peu d'efforts ont été faits sur l'élimination de l'ADN encore moins sur les autres contaminants. L'élimination de ces contaminants n'étant pas complète, il en reste quelque trace, et c'est cela qui pourrait être responsable de l'activité pro-inflammatoire de HMGB1. Des expériences ont montré que HMGB1 hautement purifié n'induit pas de production de cytokines inflammatoires [210,223,231,232]. D'autres chercheurs ont également décrit que HMGB1 hautement purifié gardait sa fonction cytokine mais des capacités pro-inflammatoires plus faibles que le HMGB1 « standard ». Ceci a également été montré pour HMGB1 extraits de cellules eucaryotes [234–236].

On a vu précédemment l'importance de l'état rédox de la protéine HMGB1 sur ses propriétés. De nombreuses préparations et mises en conservation sont faites en présence de DTT, agent fortement réducteur. La présence de DTT a certainement un effet sur l'état rédox de la protéine. La régulation de HMGB1 par des phénomènes

d'oxydation des cystéines est un important régulateur de la fonction biologique de HMGB1 (Figure 13). Lorsque HMGB1 est libéré par les cellules en nécrose, l'ensemble de ses 3 cystéines sont sous forme réduite sans pont disulfure (HMGB1-SH), et dans ces conditions HMGB1 a une fonction chimiokine et il va attirer les cellules immunitaires. Cette fonction chimiokine a été caractérisée avec un son cofacteur CXCL12 [157]. Puis apparaît le HMGB1-SS avec son activité pro-inflammatoire, issue de la sécrétion active des cellules immunitaires ou de l'oxydation de HMGB1 dans le milieu oxydant extracellulaire [157]. Cette fonction cytokine a été décrite avec le récepteur TLR4 [159–161]. Le milieu extracellulaire oxydant associé à la présence de ROS, HMGB1 sera irréversiblement oxydé (HMGB1-SO) entraînant son inactivation. L'ensemble de ces processus se déroule lorsque les dommages cellulaires sont en cours de réparation et lorsqu'on a une résolution de l'inflammation. L'oxydation régulant les propriétés inflammatoires de HMGB1 se fait donc de manière temporelle et spatiale [161].

Il existe ainsi de nombreuses contraintes autant sur la production de la protéine que sur sa conservation. Que la production de protéines recombinantes se fasse dans un système procaryote ou eucaryote, les contaminants existent (LPS ou ADN pour les systèmes procaryotes, ADN ou IL-1 dans les systèmes eucaryotes). La méthode de production a également un effet sur l'état d'oxydation de la protéine. De plus en condition standard, l'oxydation de la protéine peut se faire également au cours de la production, la purification et de la conservation de la protéine. Les solutions de HMGB1 recombinantes obtenues peuvent donc être hétérogènes et contenir un mélange des différentes formes redox de HMGB1. De plus les études utilisent également des doses très différentes de HMGB1 allant de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à plus de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Tout ceci peut expliquer les différences entre les études.

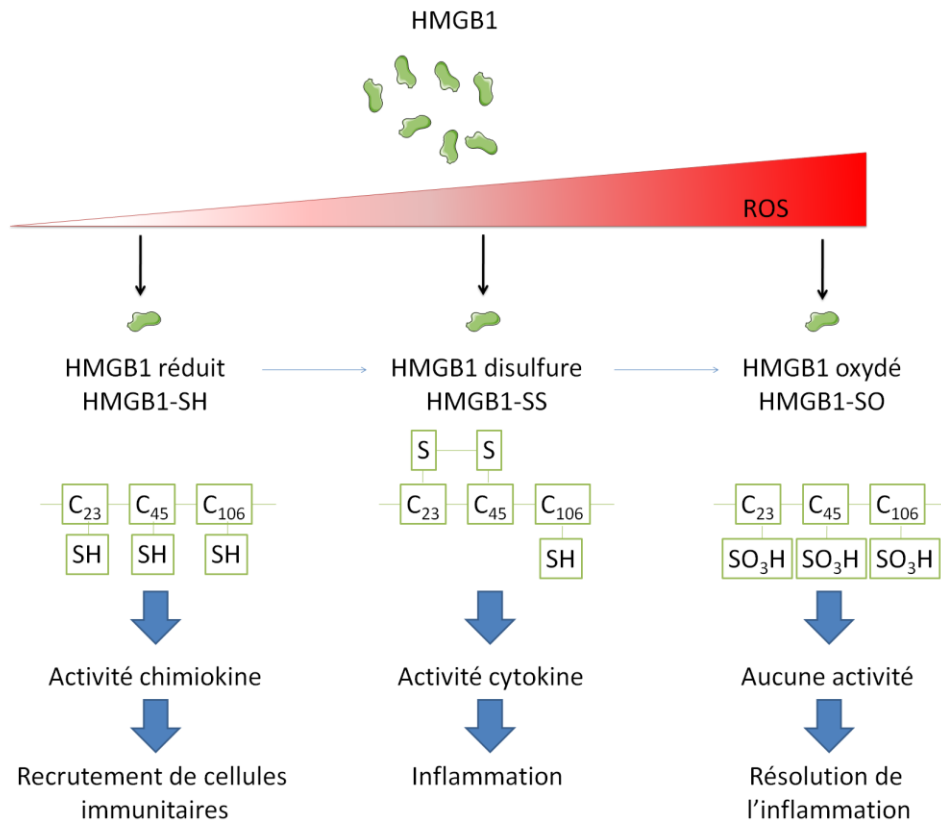


Figure 13. Relation structure et fonction de HMGB1 en fonction de son état d'oxydation. (D'après Tang D. et al. Mol. Med. 2012, 18:1360-1362)

4.5. Conclusion

HMGB1 est une protéine nucléaire qui participe à de nombreux événements liés à l'ADN comme la réplication, la réparation et la transcription. HMGB1 peut être libéré dans le milieu extracellulaire de manière passive ou active. HMGB1 intervient également en dehors de la cellule comme chimiokine et cytokine. Elle participe à la réponse inflammatoire stérile et à la réponse inflammatoire suite à une infection. HMGB1 joue également un rôle important dans la réparation tissulaire (Figure 14). De nombreuses modifications post-transcriptionnelles ont été identifiées modulant la sécrétion et l'activité de HMGB1 dans de nombreux processus cellulaires. Connue préférentiellement pour son activité inflammatoire, les dernières découvertes ont montré que cette activité dépend de la présence d'autres facteurs inflammatoires et/ou de son état redox, rendant ainsi l'étude sur HMGB1 plus complexe. Néanmoins, les cellules immunitaires activées produisent du HMGB1 qui par une action autocrine permet la production de HMGB1 ainsi que d'autres cytokines et chimiokines. Il entraîne également une réponse plus tardive et sur un plus long terme. Les phénomènes de régulation de HMGB1 sont des mécanismes très finement contrôlés. Une dérégulation de ces mécanismes peut conduire à des maladies.

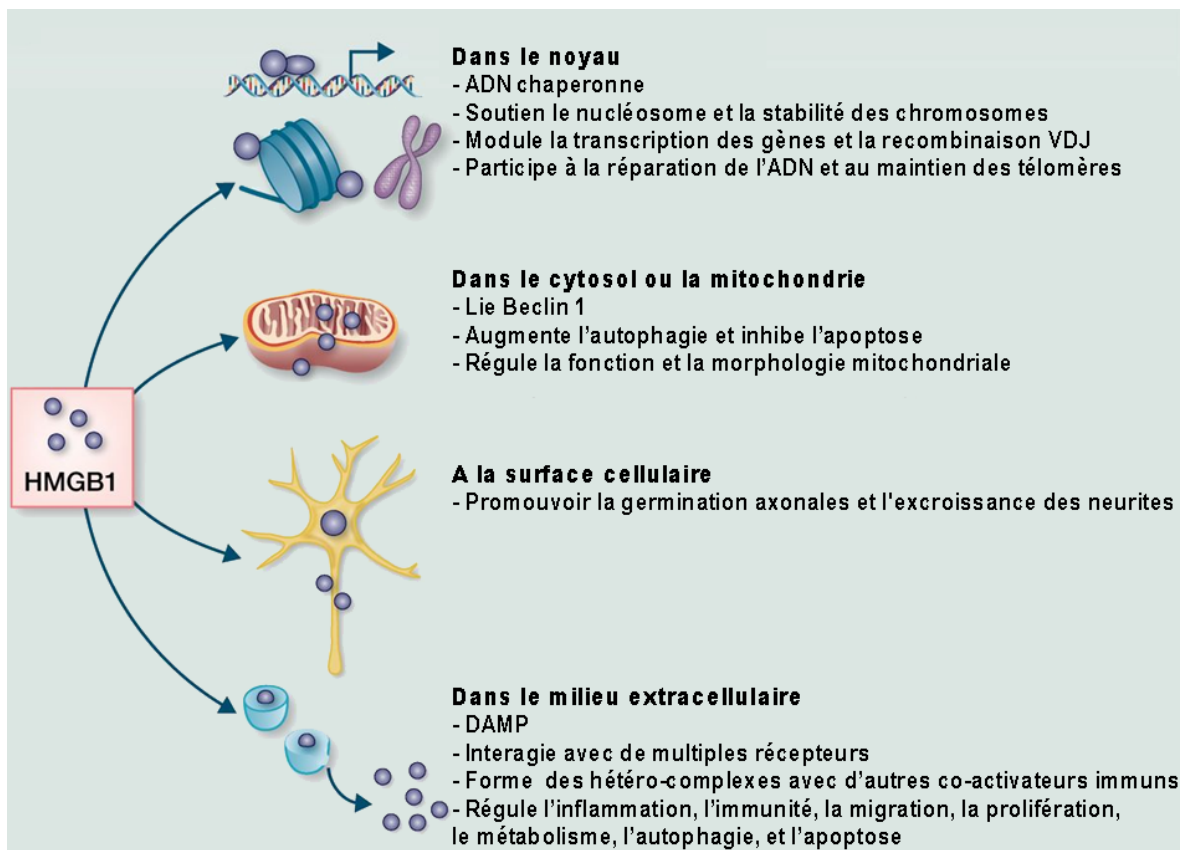


Figure 14. Les différentes fonctions de HMGB1. (Traduit de Kang R. et al. Clin. Canc. res. 2013, 19:4046-4057)

5. DAMP et PAMP associés: exemple de HSP60 et LPS

5.1.Introduction

Des organismes ou des cellules soumis à des températures élevées produisent un ensemble de protéines de choc thermique, les HSP (Heat Shock Protein). Cette famille de protéine a été mise en évidence pour la première fois chez la drosophile [237–239]. La réponse cellulaire au choc thermique et les protéines de la famille HSP impliquées dans cette réponse sont très conservées chez tous les organismes cellulaires aussi bien dans les bactéries, que l'Homme en passant par les plantes [240]. L'expression des protéines HSP peut également être induite au cours de nombreux autres stress cellulaires, comme par exemple l'ischémie, l'intoxication aux métaux lourds, la privation en nutriments, l'irradiation, les infections, le stress oxydant et l'inflammation [241].

HSP représente une famille de protéines dont la classification s'appuie sur les masses moléculaires. C'est ainsi qu'on distingue les protéines HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, HSP de 20 à 30 kDa (par exemple : HSP27), et HSP10. HSP60 est une protéine dont la fonction varie selon sa localisation. Dans la cellule, HSP60 peut être retrouvée dans le cytosol, la mitochondrie et le chloroplaste [242]. Quand elle est présente dans la cellule, elle possède une activité chaperonne aidant au repliement des protéines [243]. A la surface des cellules ou libérée dans le milieu extracellulaire [9], elle sert de signal de danger pour les cellules stressées ou endommagées et agit comme stimulateur du système immunitaire [244,245].

5.2.La famille HSP60

Ce n'est qu'en 1989 que HSP60 a été découverte dans la mitochondrie des cellules de mammifères. Les chercheurs ont alors mis en évidence son implication dans l'aide au repliement des protéines au sein de la mitochondrie [246]. HSP60 est connue aussi sous le nom de chaperonin 60 kDa (Cpn60), ou GroEL chez les bactéries [247]. Les premières expériences ont été menées sur GroEL [248] et elles ont montré que pour que GroEL soit fonctionnelle la présence d'une autre protéine de la même famille des HSP, appelée GroES, est nécessaire [249,250]. GroES a été considérée comme une co-chaperonne. La structure de GroEL est très proche de GroES [251]. Par la suite, le rapprochement a été fait chez l'Homme, et cette co-chaperonne a également été découverte sous le nom de HSP10 ou Cpn10. Du fait de la grande similitude de la séquence du gène entre l'homme et la bactérie, il existe des ressemblances structurales et fonctionnelles entre GroEL/GroES et HSP60/HSP10 présent dans les mitochondries [252,253].

Une autre protéine proche de HSP60, comportant environ 60% homologie de séquence, a été découverte dans le cytoplasme [254,255]. Suite à la découverte chez les eucaryotes des homologues de HSP60 dans le cytoplasme des cellules, une nouvelle nomenclature a été mise en place pour définir la famille HSP60 [256]. HSP60 de manière générale fait référence à la forme mitochondriale (mtHSP60), la plus abondante dans les cellules eucaryotes. La forme présente dans le cytosol est appelée chaperonne contenant le complexe T de polypeptide 1 (CCT). Il existe de nombreux homologues de CCT chez les différentes espèces. Les protéines CCT forment un hétéro-oligomère appelé TCP-1 ring complexe (TRiC). TRiC est impliqué dans la synthèse de l'actine et de la tubuline [257,258], mais également dans le repliement de nombreuses autres protéines [259,260]. Aucun des CCT n'est connu pour être induit par des chocs thermiques.

Chaque CCT est codé par son propre gène. Le nombre d'homologues de CCT dans un organisme augmente en fonction de la complexité de l'organisme, par exemple chez la drosophile il en existe 4 et chez l'homme il en existe 9. L'évolution des organismes s'accompagne de l'évolution de la propriété chaperonne de TRiC facilitant

ainsi le repliement des protéines de plus en plus complexes dans les cellules eucaryotes [261]. Ceci peut être expliqué par les phénomènes de duplication et de dérivation des gènes au cours de l'évolution.

Il existe ainsi différents types de HSP60 divisé en 2 groupes de chaperonnes. Un premier groupe renferme GroEL et mtHSP60. On positionne également dans ce groupe une HSP60 végétale connue sous le nom de RBP (Rubisco binding protein) localisée dans les chloroplastes [262,263]. Un second groupe comprend les HSP60 présents dans le cytosol (les CCT) des cellules eucaryotes et des archèes qui possèdent plusieurs homologues en fonction de l'espèce. Nous allons nous intéresser ici uniquement à la protéine HSP60 du groupe 1, et dans le deuxième groupe nous présenterons quelques exemples de CCT.

5.3.HSP60 dans la cellule, une protéine chaperonne mais pas seulement.

La famille HSP60 est principalement décrite comme des protéines chaperonnes, aidant au repliement des protéines. Elle aide également au dépliement et repliement des protéines mal repliées. La famille HSP60 est aussi impliquée dans de nombreux autres processus intracellulaires. Elle est impliquée dans la réplication, la transmission de l'ADN mitochondriale [264], dans le trafic intracellulaire de protéines [265,266] et d'hormones [267]. HSP60 est essentielle dans l'importation des protéines dans la mitochondrie, nécessitant ici aussi la co-chaperonne HSP10 et également HSP70 [268].

Il est intéressant de noter que les souris HSP60 KO, ne sont pas viables et meurent au bout de 7 jours de gestation [269]. Les souris hétérozygotes sont viables mais présentent des déficits dans la fonction mitochondriale conduisant à des désordres au niveau du cerveau [270], cela montre bien l'importance de HSP60 dans l'organisme.

5.3.1. La structure et les modifications de HSP60 dans la cellule

HSP60 est une protéine codée par le gène HSPD1 qui est conservé chez un très grand nombre d'êtres vivants tels que l'Homme, les singes, les poissons, les insectes, les plantes, et les bactéries. Il en est de même pour HSP10 codé par le gène HSPE1. Ces gènes sont présents côte à côte sur le génome [271]. Ils sont transcrits puis traduits dans le cytosol, la protéine HSP60 qui en résulte possède 573 acides aminés et porte une séquence signal de localisation mitochondriale de 26 acides aminés en position N-terminale qui lui permet d'être transportée dans la mitochondrie [272]. Une fois synthétisée, elle est présente dans le cytoplasme en état de transit vers la mitochondrie, mais elle possède déjà son activité chaperonne au cours de ce transit [273]. Une fois dans la mitochondrie, cette séquence signal est clivée, suivie ensuite d'une série de modifications post traductionnelles modulant la fonction de HSP60 (phosphorylation [274], ubiquitination [275], sumonylation [276], acétylation [277], malonylation [278], glycosylation [279] ...).

La structure a initialement été décrite chez les bactéries. Cette chaperonne est formée de 14 sous-unités identiques de GroEL divisées en deux anneaux de 7 sous-unités superposées. La co-chaperonne est composée aussi de 7 sous-unités de GroES identiques (Figure 15). GroEL comporte de nombreuses régions et résidus très conservés, principalement impliqués dans la liaison du substrat [246,280], de l'ATP /ADP [281,282], Mg^{2+}/K^{+} [280] et de GroES [283]. En présence d'ATP et de Mg^{2+} , GroEL et GroES constituent rapidement un complexe de chaperonne GroEL/ATP/GroES. Ce complexe peut également récupérer une co-chaperonne supplémentaire dans des conditions particulières de concentration de Mg^{2+}/K^{+} et de ratio ATP/ADP [284]. L'ensemble forme un tonneau (GroEL) avec un couvercle (GroES) à l'une ou aux deux extrémités (Figure 15).

Chez l'Homme, la chaperonne HSP60 existe sous forme de 7 sous-unités identiques formant un anneau [285], néanmoins on la retrouve également sous forme de deux anneaux de 7 sous unités comme GroEL [286].

L'oligomérisation dépend de la concentration en protéine chaperonne et en ATP [287]. L'existence de deux formes peut être expliquée par le fait que HSP60 contient seulement 2 des 4 résidus impliqués dans la formation du double anneau de GroEL [253], ce qui induit une diminution de la stabilisation de la forme double anneau. De plus il a été montré que la formation du double anneau nécessite également la présence d'ATP et/ou de la co-chaperonne HSP10 [288,289]. Comme pour GroES, la co-chaperonne HSP10 est formée de 7 sous-unités [251] (Figure 17).

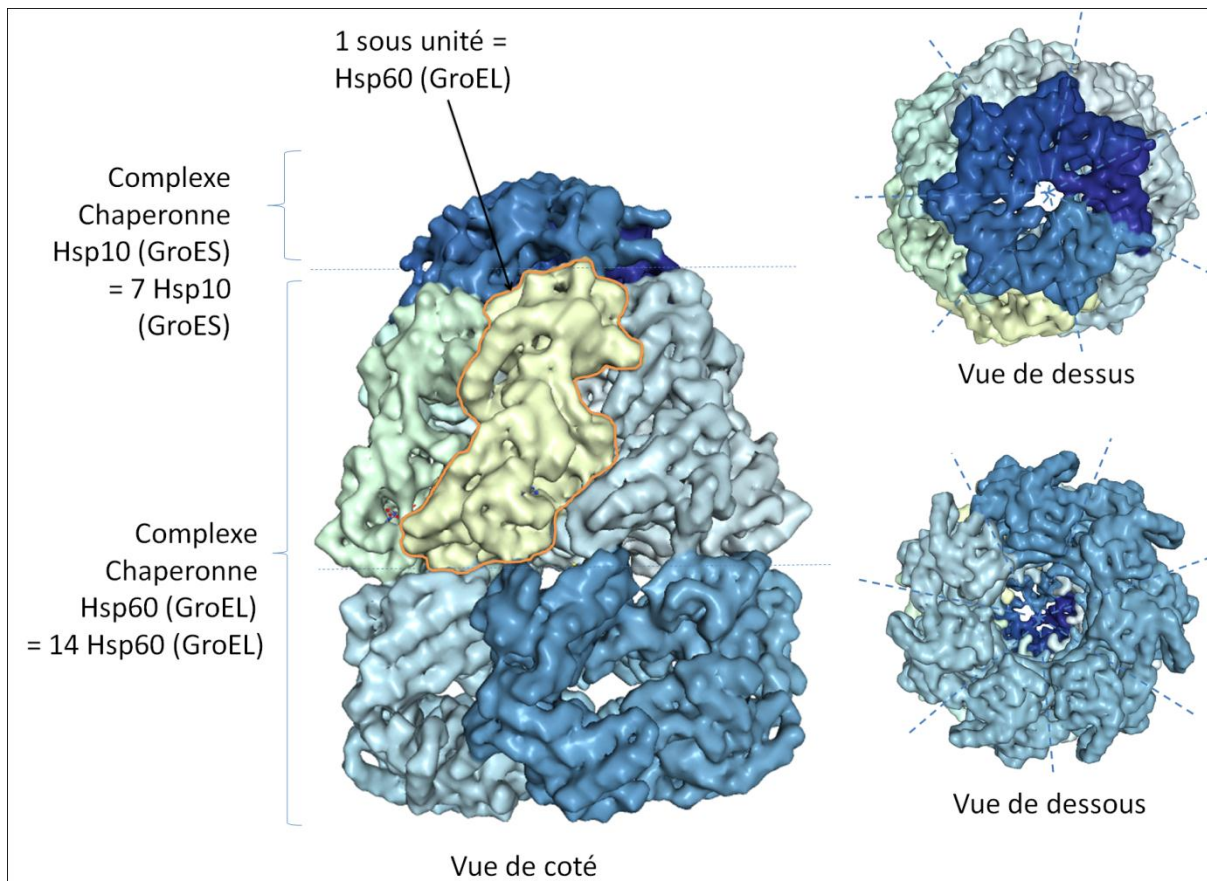


Figure 15. Structure 3D du complexe chaperonne HSP60/Hsp10 (GroEL/GroES). RCSB PDB 3D view 1AON

Dans le cytosol des cellules eucaryotes, la structure est légèrement différente pour le complexe de chaperonne TRiC, le complexe comporte 8 sous-unités de CCT différentes [290]. Les premières interprétations ont révélé que TRiC agit sans la présence de co-chaperonne [291]. Récemment il a été montré que HSP60 peut se retrouver dans le cytosol, indépendamment des CCT, mais avec des fonctions particulières (voir après).

5.3.2. L'activité chaperonne de HSP60 dans la cellule

L'activité chaperonne de la famille HSP60 (mtHSP60, GroEL, et TRiC) a pour principale fonction le repliement des protéines nouvellement formées. Elle comporte une « chambre » dans laquelle se replient les protéines qui adoptent leurs structures tertiaires et ceci de manière ATP dépendante. La synthèse des HSP est induite suite à une forte température. Certaines protéines sensibles à des hautes températures se replient mal ou forment des agrégats. HSP60, en plus de sa capacité d'aide au repliement des protéines, a également la

capacité de déplier les protéines. Elle a la faculté de reconnaître les protéines mal repliées et même certains agrégats de protéines, elle va ensuite les déplier pour permettre le repliement correct de ces protéines [292,293]. Ce mécanisme permet ainsi de défendre l'organisme contre une accumulation anormale et délétère de protéines non fonctionnelles et d'agrégats de protéines, potentiellement toxiques. Elle favorise donc une résistance accrue à de fortes températures [294]. Cette activité nécessite de l'énergie provenant de l'hydrolyse des molécules d'ATP, et également la présence de leur co-chaperonne GroES ou HSP10 [295] (Figure 18).

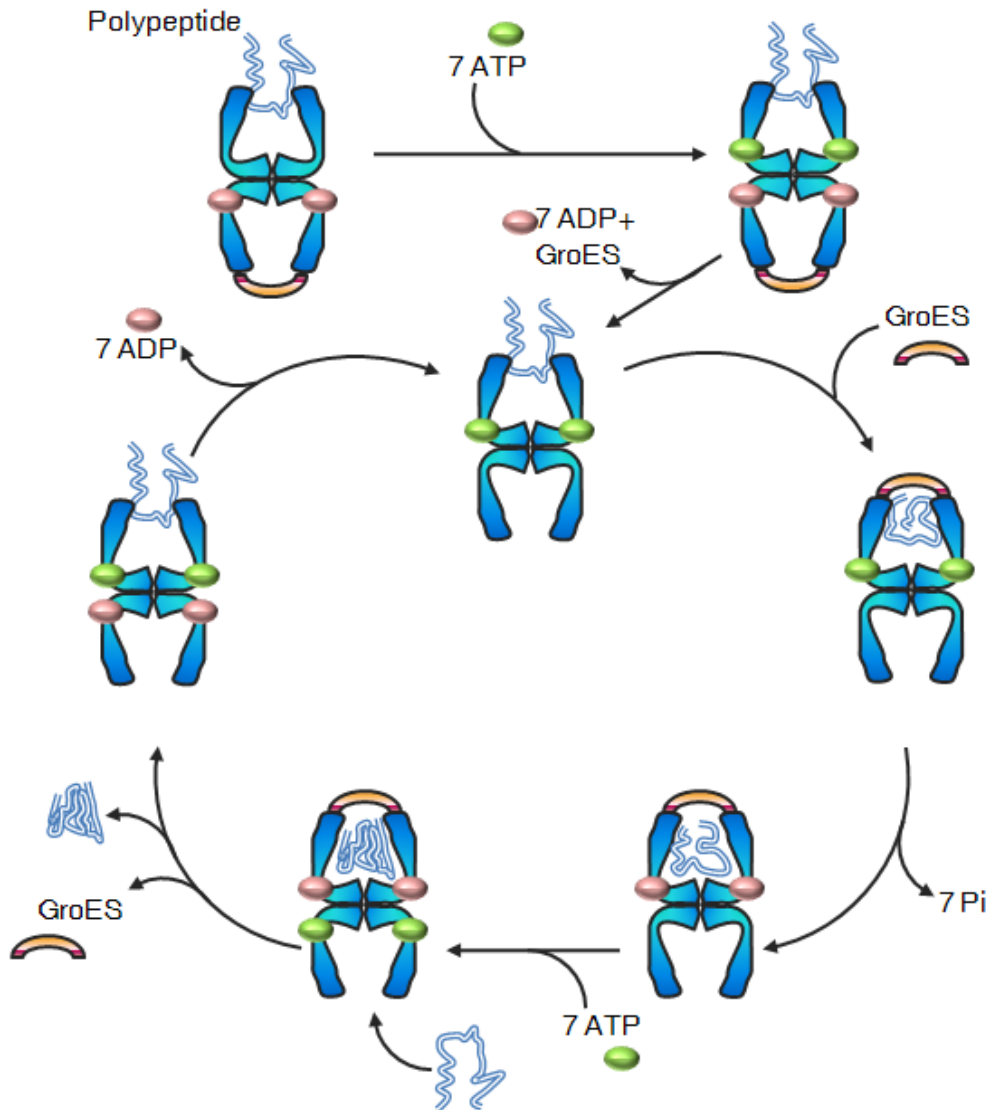


Figure 16. Activité chaperonne de GroEL/GroES. (Extrait de <http://pds-lab.biochem.iisc.ernet.in/hspir/hsp60.php>)

5.3.3. HSP60 dans l'apoptose

HSP60 en interagissant avec la pro-caspase-3 joue un rôle dans l'apoptose. En fonction de son origine, HSP60 peut avoir une action pro- ou anti-apoptotique (Figure 17) [296]. Si elle est d'origine mitochondriale et libérée dans le cytosol suite à un stress ou à une perte de potentiel transmembranaire, elle active la pro-caspase-3 et

intervient alors comme facteur pro-apoptotique. Si la forme cytosolique de HSP60 est directement néo-produite sous l'effet d'un stress, elle inhibe la pro-caspase 3 et est anti-apoptotique [296]. La co-chaperone HSP10 est également impliquée [297], avec HSP60 elle participe à l'inhibition de l'apoptose [298]. HSP60 forme avec la pro-caspase 3 et HSP10 un complexe pré-apoptotique. Ce complexe se dissocie suivi de l'activation de la caspase-3 et de l'apoptose. Il est intéressant de noter la participation de HSP10 dans sa fonction unique de protéine anti-apoptotique.

D'autres protéines sont également impliquées dans ce phénomène d'apoptose. La forme mitochondriale de HSP60 interagit avec p53, une autre protéine impliquée dans l'apoptose [299,300]. HSP60 se fixe à p53 et agit comme un inhibiteur [301]. p53 est un facteur de transcription, il active l'expression du gène de Bax. La protéine Bax participe au processus de perméabilisation de la membrane mitochondriale entraînant ainsi sa destruction. Cela a pour conséquence la libération du cytochrome c et de HSP60. La sortie du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol est un événement central dans le processus apoptotique intrinsèque. Ainsi la séparation de HSP60 et de p53 conduit à la double action d'induction de l'apoptose, via l'action p53 et Bax et via l'action de HSP60 et la pro-caspase 3. De plus, HSP60 interagit également avec Bax en l'inhibant [302]. Un mécanisme de modification post traductionnelle de type O-linked N-acétylglucosamine serait impliqué dans cette interaction. Un taux élevé de HSP60 O-linked N-acétylglucosamine empêcherait sa liaison à Bax conduisant à l'activation de l'apoptose [303].

La survivine (pro-survie) est une autre protéine impliquée dans l'apoptose et identifiée comme interagissant avec HSP60. Cette protéine participe à la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose. HSP60 intervient en stabilisant cette protéine [301]. Une diminution de l'expression de HSP60 entraîne une chute du taux de survivine et une entrée de la cellule en apoptose.

Une troisième protéine, la cyclophiline D est également impliquée dans la régulation de l'apoptose. Cette protéine est une composante des pores impliquée dans la perméabilité membranaire de la mitochondrie [304]. Uniquement décrite dans les cas de cancer, une diminution de la surexpression de HSP60 entraîne une déstabilisation de la perméabilité membranaire par la cyclophiline D, entraînant l'apoptose.

Du fait de son implication ambivalente dans l'apoptose, son rôle ambigu se retrouve également dans les cancers. HSP60 interviendrait dans certains cancers en jouant soit un rôle pro-apoptotique soit un rôle de pro-survie dans certains cancers [301,305–308]. Comme dans un grand nombre de cas de cancers où HSP60 est surexprimée, cette fonction inhibitrice de l'apoptose est responsable de sa capacité pro-survie des cancers. Cela implique en particulier l'action directe de HSP60 sur la stabilisation de la survivine, la répression de p53, l'inhibition de Bax, la perméabilité membranaire de la mitochondrie via la cyclophiline D et l'action de HSP60 sur la pro-caspase 3. Néanmoins le mécanisme exact de l'action de HSP60 au niveau de la pro-caspase-3 n'est pas encore défini. Cependant, il a été décrit qu'il existait une corrélation entre le grade de la tumeur et le taux de HSP60 [309].

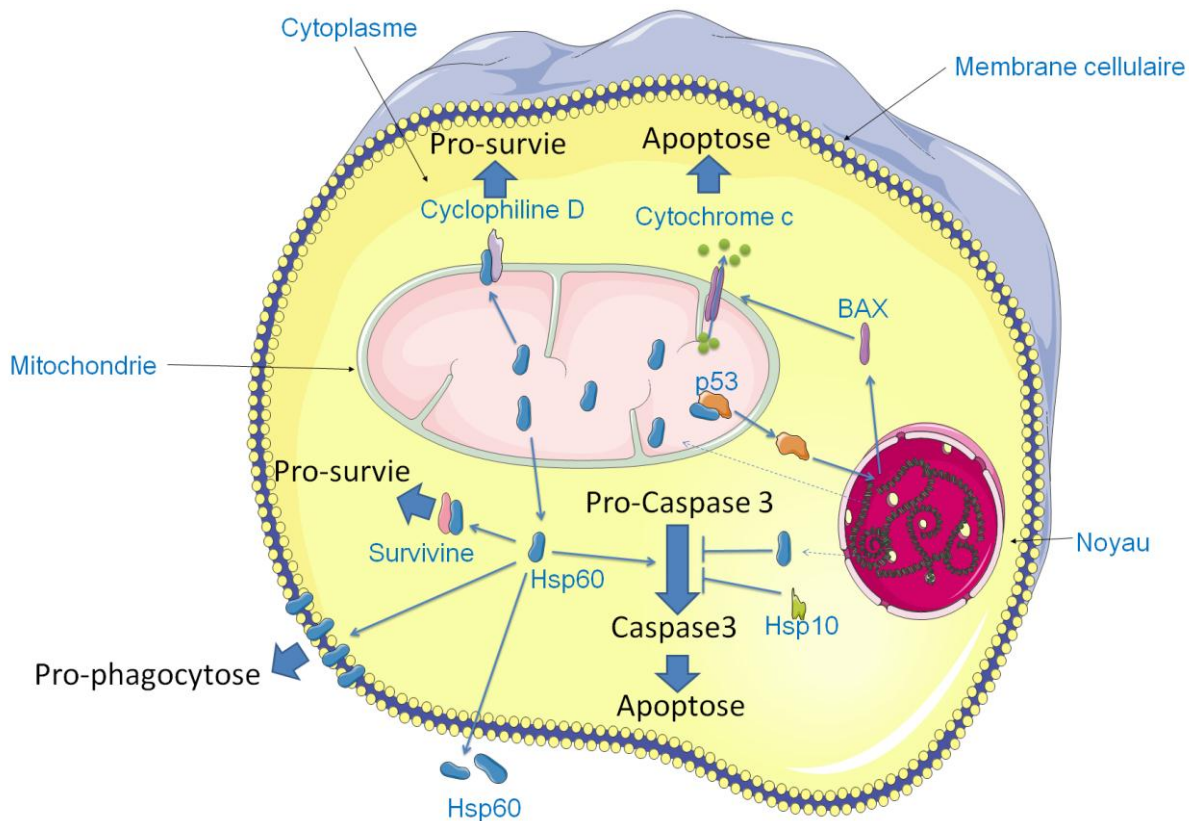


Figure 17. Les fonctions de HSP60 dans l'apoptose.

5.4.HSP60 membranaire et extracellulaire, une protéine impliquée dans la réponse immunitaire

HSP60 peut se retrouver à la surface des cellules mais également dans le milieu extracellulaire. Membranaire ou extracellulaire, HSP60 agit comme stimulateur du système immunitaire et intervient dans la réponse immunitaire innée et adaptative. On retrouve HSP60 dans le milieu extracellulaire et dans la circulation sanguine dans les conditions physiologiques normales de personnes saines. Cela est contraire à l'idée que HSP60 est une molécule entièrement dédiée à un signal de danger. L'action de HSP60 est très variable en fonction de son origine, des cellules et des cofacteurs impliqués. HSP60 peut ainsi avoir des effets pro- et anti-inflammatoires en dehors de la cellule. Il est nécessaire ainsi de bien connaître le contexte de l'étude pour établir les propriétés de la protéine HSP60.

Il est intéressant de noter qu'il n'existe pour HSP60, qu'un seul gène, un seul ARNm et une seule protéine traduite. La protéine produite possède une séquence signal destinée à la mitochondrie. Comme on retrouve HSP60 dans le cytosol, la mitochondrie et en dehors de la cellule, il a été supposé que le système de ciblage de HSP60 se déroule dans les étapes post-traductionnelles de la protéine.

5.4.1. HSP60 membranaire

Un lien a été fait entre la présence de HSP60 sur les membranes et des pathologiques. C'est ainsi qu'à la surface des cellules cancéreuses on observe plus de HSP60 que sur les cellules non-cancéreuses [301]. La surexpression de HSP60 à la surface des cellules peut également être la conséquence d'un stress. Par exemple,

suite à une stimulation par du LPS, les cellules endothéliales de l'aorte expriment à la surface du HSP60 [310]. Ce stress conduit également à l'adhésion de monocytes principalement mais également de lymphocytes T sur les cellules endothéliales de la paroi de l'aorte [240].

HSP60 présent à la surface des cellules est une protéine complète, identique à la protéine présente dans la mitochondrie [311]. Une des hypothèses de l'origine de HSP60 membranaire serait que HSP60 soit d'abord passée par la mitochondrie puis le cytoplasme et enfin la membrane plasmique [311].

Il a également été décrit un lien entre HSP60 présent à la surface des cellules et l'apoptose. L'expression de HSP60 augmente durant l'apoptose. HSP60 est transporté du cytoplasme jusqu'à la membrane plasmique durant ce processus. Une partie de ce HSP60 participe à l'interaction avec Bax [302]. La membrane des vésicules apoptotiques possède une grande concentration de HSP60. Ainsi, HSP60 se présente à la surface des cellules durant les premiers stades de l'apoptose et persiste jusqu'à la perte d'intégrité de la membrane dans les étapes finales de l'apoptose. La migration de HSP60 vers la membrane n'est pas retrouvée dans les cas de nécrose. En plus de cela, HSP60 présent à la surface des vésicules apoptotiques est impliquée dans le nettoyage des corps apoptotiques par phagocytose. L'exposition de HSP60 induit une augmentation de l'activité de phagocytose des monocytes, ce qui implique son rôle important dans l'homéostasie cellulaire [312].

La présence de HSP60 à la surface des cellules est associée à un état pro-inflammatoire. Dans les cas de crise cardiaque, HSP60 migre à la surface des myocytes en cours d'apoptose. On observe également une augmentation de HSP60 et d'anticorps anti-HSP60 dans le sang, indiquant ainsi que HSP60 a bien une activité immunogène [313].

5.4.2. La libération de HSP60 dans le milieu extracellulaire

En plus de sa présence sur les membranes des cellules, HSP60 peut également être retrouvée en dehors de la cellule. Il existe différents types de libération connus pour HSP60 (Figure 18). Elle peut être libérée soit de manière active par un mécanisme cellulaire de sécrétion, soit de manière passive lors de l'apoptose ou de la nécrose. L'activité de HSP60 sera différente en fonction de son origine et de la manière dont elle a été libérée.

Un des mécanismes impliqué dans la sécrétion active de HSP60 est la voie classique de sécrétion de protéines via le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi [279,314], dans laquelle la protéine est néo-synthétisée et passe directement par la voie de sécrétion. Lorsque HSP60 passe par la voie classique de sécrétion, elle subit une modification post-traductionnelle de type N-glycanes [279]. Toutefois, le signal initial de passage dans cette voie de sécrétion n'est pas encore décrit.

Un second mécanisme actif de sécrétion de HSP60 implique la participation d'exosomes et de canaux lipidiques [315,316]. HSP60 est ancrée à la membrane des exosomes, on peut ainsi supposer qu'elle était présente à l'origine à la surface des cellules. Ainsi, la nécessité d'avoir du HSP60 présent à la surface des cellules est peut être une condition pour ce type de sécrétion [317]. Il a été décrit une modification post-traductionnelle de type mono-ubiquitination de la protéine qui peut être le signal de transport de HSP60 membranaire vers la formation d'exosome.

En plus de ces mécanismes de sécrétion active, HSP60 peut être libérée passivement par nécrose [318]. La libération extracellulaire de HSP60 est plus importante lors de la nécrose que lors de l'apoptose [318]. Il a été décrit pour la famille des HSP, des propriétés pro-inflammatoires des HSP libérées lors de nécrose mais pas

lors de l'apoptose [7]. Cependant, les premières expériences ont montré qu'il n'y avait pas de différence d'action sur les neurones entre HSP60 issue de nécrose et d'apoptose [318]. Des études supplémentaires sont nécessaires pour définir l'effet inflammatoire de HSP60 issue d'apoptose et de nécrose.

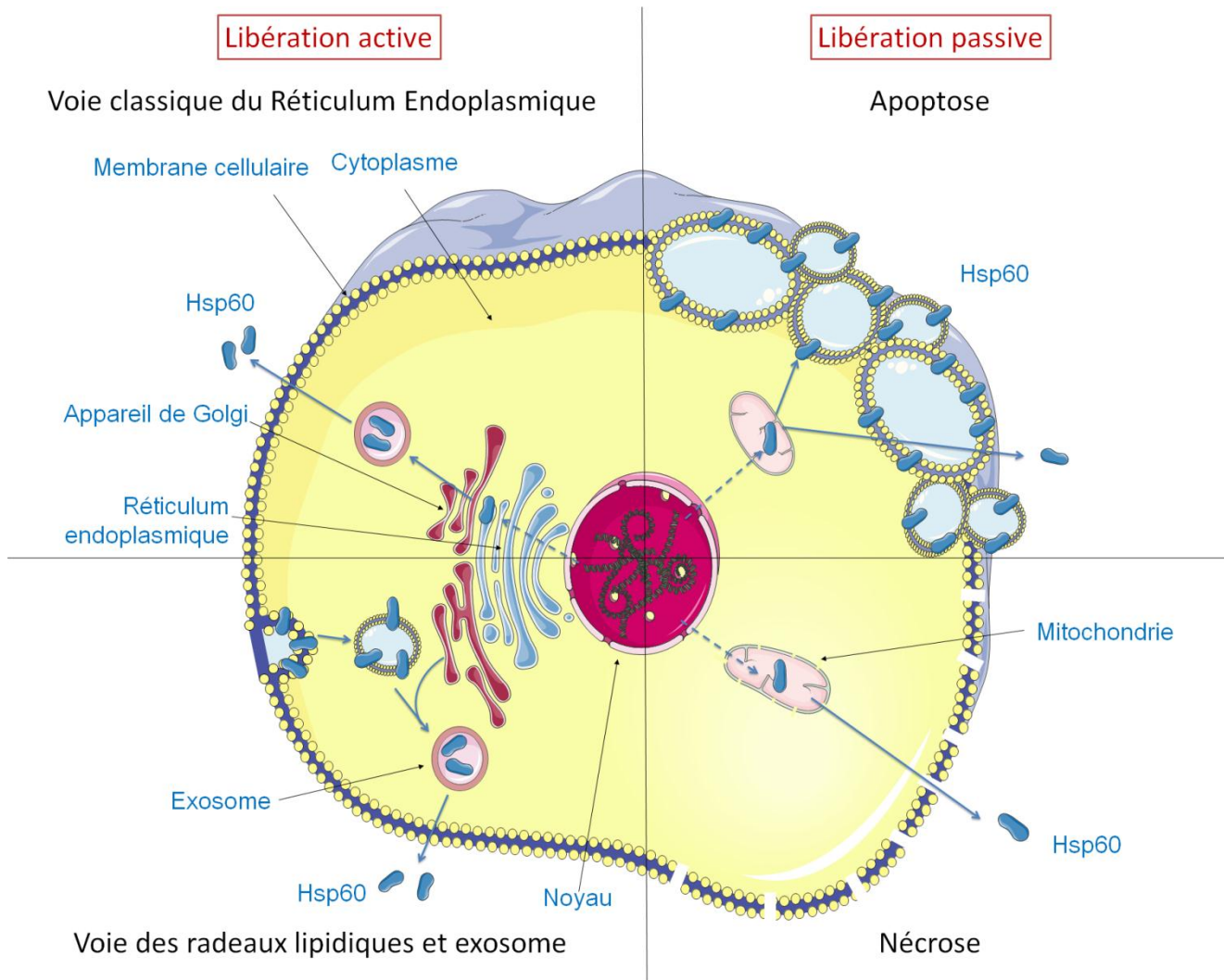


Figure 18. Les différentes voies de libération de HSP60.

5.4.3. HSP60 présent dans le milieu extracellulaire

HSP60 ainsi libérée peut se retrouver dans la circulation et peut être présente dans le plasma de patients [319–322]. Le profil de sécrétion de HSP60 varie énormément en fonction des personnes [322–324], et des types cellulaires [325]. De nombreux facteurs peuvent influencer la sécrétion de HSP60. L'âge par exemple est un de ces facteurs. En effet, il a été montré que plus la personne est âgée plus le taux de HSP60 dans le sang diminue [326,327]. Une augmentation du taux de HSP60 dans le sérum est associée à de nombreuses pathologies, en particulier les pathologies impliquant une nécrose des tissus, par exemple les infarctus conduisant à une ischémie du tissu puis une nécrose [328]. Néanmoins cela entraîne une libération passive de HSP60 due à la nécrose. La fonction de HSP60 libérée lors de la nécrose et celle libérée de manière active peuvent être très différente [7], sans pour autant avoir été démontré actuellement.

La principale caractéristique décrite pour HSP60 est sa capacité à activer le système immunitaire. Elle se traduit par l'activation de la voie inflammatoire chez les cellules immunitaires. HSP60 induirait donc la production de nombreux facteurs pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, MCP-1, RANTES, MIP-2, NO, IL-1 β ...) [240,329,330]. Cet effet cytokine de HSP60, comparé à sa fonction chaperonne, ne requière en aucun cas de l'ATP, de cofacteur ou de complexe protéique. Elle active ainsi un grand nombre de cellules immunitaires. Par exemple, HSP60 active les cellules dendritiques [7,240,329] en augmentant l'expression du CMH II et des protéines de costimulation (CD40, CD54 et CD86) [329,330]. HSP60 active également les granulocytes favorisant leur dégranulation, et ainsi leur activité anti-microbienne. Elle active les monocytes/macrophages en induisant une cascade de signalisation pro-inflammatoire et une augmentation de la phagocytose [240,312,331].

Dans le milieu extracellulaire, HSP60 est connue pour interagir avec les protéines réceptrices CD14, CD40, TLR2 et TLR4 [240,332–334], conduisant à l'activation des voies de signalisation intracellulaire JNK-1/2, MAPK, ERK-1/2, NF- κ B [330,334,335] et de MyD88 [240,336]. Cette cascade de signalisation aboutit à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, IL-12, IL-15, IL-1 β , MCP-1 et TNF- α . De plus, HSP60 agit dans une boucle rétroactive positive, induisant sa propre production. Il a été montré que l'expression de HSP60 est augmentée suite à une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 β , IL-6, et TNF- α [337]. L'expression de HSP60, comme toutes les protéines de la famille HSP, est sous le contrôle du facteur de transcription NF- κ B [338,339].

Il a été décrit très récemment le rôle de HSP60 dans la régénération cellulaire [340]. HSP60 libérée au niveau des sites concernés agirait comme chimiokine en attirant les cellules immunitaires et participerait à la résolution de l'inflammation en induisant la régénération des tissus touchés. Cela implique une fonction anti-inflammatoire du HSP60 sur les macrophages avec une polarisation de type M2 (anti-inflammatoire).

5.4.4. Action de HSP60 sur les Lymphocytes T

L'action de HSP60 sur les différents types de lymphocytes T (Figure 19) est très intéressante. L'action des lymphocytes T est basée sur la reconnaissance entre le soi et le non-soi. En fonction de cela, il induira une cascade de signalisation de type anti-inflammatoire ou pro-inflammatoire respectivement. L'action de HSP60 sur les lymphocytes T s'accompagne d'une inhibition de la réponse immunitaire :

- HSP60 joue un rôle dans l'activation et la prolifération de lymphocytes T régulateurs impliqués dans l'inhibition du système immunitaire et présents souvent lors d'une rémission suite à un stress cellulaire. Avec l'activation des lymphocytes T régulateurs intervient également l'inhibition des lymphocytes T cytotoxiques [341,342].
- HSP60 agit également au niveau des lymphocytes T gamma delta (LT $\gamma\delta$), lymphocytes non conventionnels, à cheval entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Ils sont les premiers activés lors d'une infection virale ou bactérienne, induisant une réponse pro-inflammatoire. HSP60 induirait un phénomène d'apoptose chez les cellules LT $\gamma\delta$ [343].
- HSP60 agit également au niveau des lymphocytes T auxiliaires appelés aussi lymphocytes T helper. Ils aident et régulent les autres fonctions lymphocytaires. Il a été montré que lors d'une réponse immunitaire qui induisait l'augmentation de l'expression et de la sécrétion de HSP60 de manière active, cela conduisait à la conversion des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T auxiliaires [344]. De plus HSP60 induit un profil d'expression de cytokines IL-4 et IL-10, et oriente donc les lymphocytes T

auxiliaires vers le type de lymphocyte Th2 [345,346] dit anti-inflammatoire. De plus il a été démontré que cette action de régulation de HSP60 vers le Th2 passe par le récepteur TLR2 [240].

Néanmoins cela est à nuancer en fonction de la source de HSP60. L'action de GroEL sur des cellules humaines de lymphocyte T auxiliaire est totalement différente. GroEL induit l'orientation des lymphocytes vers le type Th1, avec la production d'IFN- γ [346] dit pro-inflammatoire, ainsi que l'activation des lymphocytes T cytotoxiques et des LT $\gamma\delta$. Cette différence peut s'expliquer par la présence des protéines exogènes, donc une réponse immunitaire par du non soi, plutôt que GroEL lui-même.

HSP60 est capable également d'activer les lymphocytes B. Cela conduit à la prolifération des Lymphocytes B, l'induction de molécules de co-stimulation (CD40, CMH II, ...) et la production de cytokine de type Th2 (IL-10) [240]. De plus, une diminution de l'apoptose des lymphocytes B a été observée suite à la stimulation par HSP60 [347], en concordance avec l'augmentation de la prolifération. HSP60 se positionne ainsi entre un effet pro- et anti-inflammatoire. Il est intéressant de noter que la stimulation des lymphocytes B par GroEL, ou HSP60 du non-soi, ne conduit pas à la prolifération des lymphocytes B [240].

La capacité anti-inflammatoire de HSP60 a principalement été remarquée en lien avec les lymphocytes T et B. Les lymphocytes seraient ainsi le type cellulaire permettant le basculement entre pro- et anti-inflammatoire. La réponse immunitaire serait ainsi un rapport pro- et anti-inflammatoire de HSP60 dont les contrôleurs du système en faveur de l'un ou de l'autre, seront les lymphocytes T et les lymphocytes B.

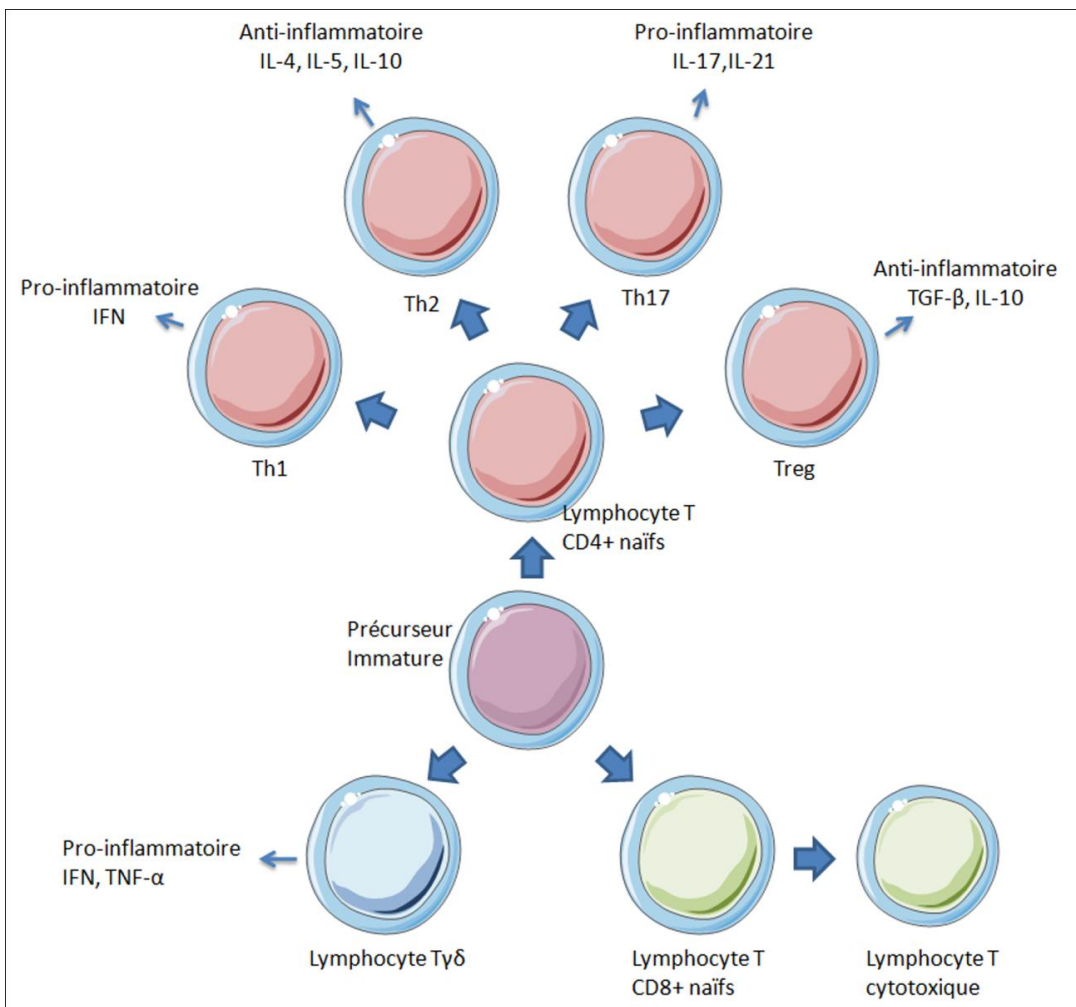


Figure 19. La différenciation des lymphocytes T.

5.5.HSP60 inflammation et LPS

HSP60 est connue pour interagir avec le LPS, la région spécifique de cette interaction est située entre les acides aminés 351 et 370 [348]. Toutefois HSP60 peut induire une stimulation immunitaire par différents mécanismes de manière dépendante ou indépendante au LPS. L'effet cytokine de HSP60 est similaire à l'effet du LPS et des lipoprotéines bactériennes. Il est important de souligner que les protéines HSP60 recombinantes bactériennes et humaines sont produites dans des *Escherichia coli*, la préparation finale peut donc être contaminée par des produits de bactéries. Il est intéressant de faire le rapprochement entre les récepteurs de HSP60 et ceux du LPS qui sont les mêmes, TLR4 et son corécepteur CD14, et également TLR2 dans certains cas. Il a été mis en avant que les propriétés pro-inflammatoires de HSP60, seraient dues à l'effet du LPS [349]. Cette question de la présence de contaminant par du LPS ou des molécules associées aux bactéries s'est posée dans tous les cas de la famille des HSP [240,240].

Différentes techniques pour montrer l'absence de LPS dans les préparations de HSP60 ont été mises en place. La première s'appuie sur la différence de résistance à la température, le LPS étant plus résistant à des températures élevées que HSP60. Les chercheurs ont également utilisé l'activité inhibitrice de la polymyxine B pour le LPS [240,350,351]. Des études plus rares font état de l'utilisation d'anticorps bloquants, anti-HSP60

[240,352]. Suite à ces traitements les chercheurs ont supposé que les préparations de HSP60 étaient exemptes de LPS.

Ces critères d'absence de LPS ont été réfuté par le fait que LPS et les autres contaminants peuvent aussi être dégradés et perdre leur activité cytokine par de fortes températures. Donc le fait d'inactiver par la température HSP60 inactive aussi le LPS, et donc que l'activité cytokine de HSP60 est due au LPS. En plus de la contamination par du LPS d'autres molécules associées au LPS peuvent également être impliquées dans cette réponse inflammatoire qui sont elles aussi inactivées par la température [353]. Cela vient également remettre en cause l'action de la polymyxine B. Si d'autres contaminants que le LPS sont présents dans les préparations, l'utilisation de la polymyxine B n'aura aucun effet ou un effet partiel sur la diminution de la propriété pro inflammatoire de HSP60 [240,350,353].

Un autre critère renforçant cette idée est basé sur les concentrations utilisées par les chercheurs. Le LPS est très réactif, quelques centaines de pg.mL^{-1} suffisent pour induire une réponse inflammatoire des monocytes et macrophages. Ainsi une faible contamination pourrait être responsable de cette activité pro inflammatoire, cela a été vérifié avec HSP70 [354]. Donc le fait d'utiliser de la protéine HSP60 avec même très peu de LPS présent serait suffisant pour induire une réponse inflammatoire.

L'action de HSP60 purifiée sur les monocytes/macrophages a été par la suite plus précise, les chercheurs ont démontré une absence d'activité inflammatoire et une incapacité à activer des cellules immunitaires [353,355]. Néanmoins, il a été vu qu'un prétraitement avec du HSP60 pure entraîne une réponse inflammatoire plus importante qu'un traitement avec du LPS seul sur les monocytes/macrophages [356]. Cela montre que HSP60 agit au niveau des monocytes/macrophages mais dans une autre voie.

Il est intéressant de noter que ces protéines HSP60 sans aucun LPS et contaminant conservent leur activité chaperonne et l'activité ATPase [353], et donc que l'absence de l'activité cytokine observée n'est pas due à une protéine non fonctionnelle ou un problème de purification.

Contrairement aux monocytes/macrophages, l'activation des lymphocytes T est possible en présence de HSP60 contaminée ou non par des endotoxines [357]. De plus l'activation des lymphocytes T par HSP60 ne passe pas par le récepteur TLR4 et MyD88 [358]. Lors de l'activation par HSP60 les lymphocytes T produisent de l'INF- α , alors que celui-ci n'est pas produit dans les cas où HSP60 est contaminée par du LPS. Il a été montré que l'INF- α était important dans la régulation de la réponse immunitaire [359]. HSP60 induit ainsi une grande variété de réponses immunitaires en fonction des cellules impliquées (Figure 20).

L'action du LPS dans la fonction cytokine de HSP60 est également à prendre en compte d'un point de vue du système immunitaire. Une infection bactérienne entraîne une libération de HSP60 capable d'interagir avec le LPS des bactéries présents. Cela facilitera la reconnaissance des microbes en diminuant le seuil de détection des PAMP. HSP60 a de plus un effet synergique sur le LPS, ni les préparations de HSP60 hautement purifiées ni le LPS seul à des concentrations correspondant à celles trouvées dans des préparations HSP60 contaminées ne peuvent induire une production de cytokine pro-inflammatoire équivalente aux préparations HSP60 contaminées [349,360]. HSP10 serait capable d'inhiber la réponse inflammatoire du LPS, et cela via l'interaction avec HSP60 [240].

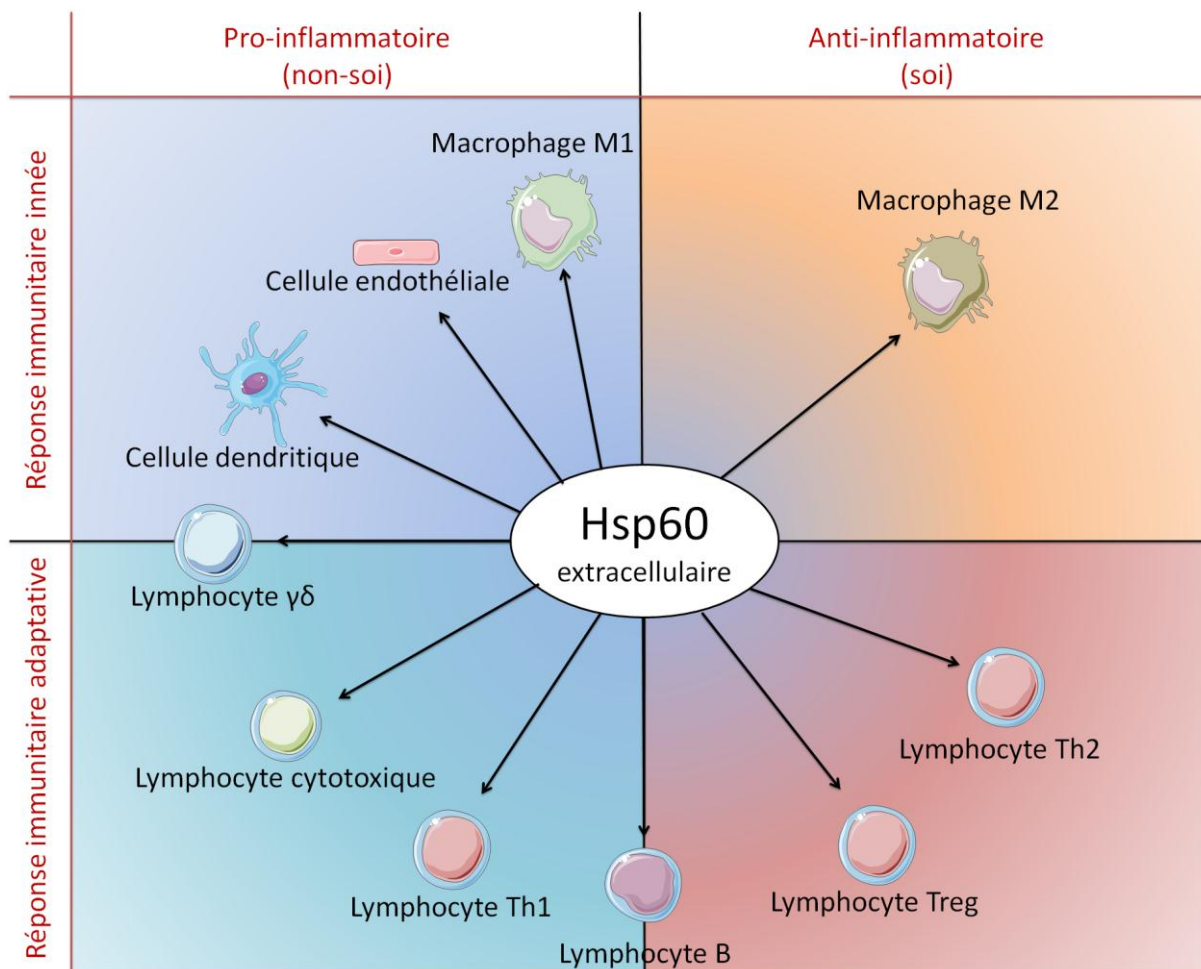


Figure 20. Réponse immunitaire différentielle de HSP60.

5.6.Conclusion

Les protéines de la famille HSP60 sont impliquées dans la réponse cellulaire suite à un choc thermique. Ces protéines ont des fonctions différentes selon leur localisation. Dans la cellule, HSP60 est connue principalement pour son rôle de chaperonne, mais elle est aussi impliquée dans l'apoptose. On la retrouve au niveau membranaire, à la suite de l'apoptose favorisant ainsi la phagocytose des corps apoptotiques ; ou à la suite d'un stress favorisant l'adhésion des cellules immunitaires. Dans le milieu extracellulaire, HSP60 a une influence sur le système immunitaire. De nombreuses études ont montré la capacité pro-inflammatoire de HSP60. Les dernières découvertes ont mis en évidence que cette activité nécessite également la présence d'autres facteurs inflammatoires comme le LPS. Cependant dans des conditions physiologiques normales, HSP60 endogène peut avoir des propriétés anti-inflammatoires. D'un point de vue cellulaire cette activité anti-inflammatoire a été principalement décrite dans les cas des lymphocytes T et dans une moindre mesure des lymphocytes B et des macrophages. L'action pro-inflammatoire de HSP60 a pu quant à elle être observée dans de nombreux autres types cellulaires spécialisés ou non. Les lymphocytes T joueraient un rôle prépondérant dans l'action immunitaire de HSP60. HSP10 a également montré une activité inhibitrice de l'inflammation via son interaction avec HSP60. HSP60 fait partie d'un réseau complexe au sein du système immunitaire permettant la régulation et la résolution d'événements inflammatoires.

6. CD93 un potentiel nouveau récepteur de la famille des CLR

6.1.Introduction

CD93 fait partie de la grande famille des lectines de type C dans laquelle on retrouve les CLR (C-type lectin receptors). Les lectines de type C sont des récepteurs impliqués dans un large éventail de fonctions, par exemple, l'adhérence cellule-cellule et l'apoptose [19], mais également dans de nombreuses fonctions du système immunitaire, telles que la reconnaissance des agents pathogènes, l'inflammation, et l'immunité [361]. Elles sont également impliquées dans la reconnaissance des cellules infectées par des virus [362]. Les CLR contiennent un domaine de liaison aux glucides capable d'interagir avec les glucides des virus, bactéries et champignons. Ce domaine nécessite également la fixation du calcium. En général, la nature exacte des ligands de ces CLR est inconnue [16].

Dans la réponse inflammatoire, différents mécanismes impliquant les lectines de type C sont requis pour recruter les éléments de défense au niveau du site d'inflammation. Les lectines de type C interviennent surtout dans la fixation de cellules immunitaires au niveau d'un tissu enflammé. Les lectines de type C possèdent au moins un domaine CTLD (C-type lectin-like domain).

Les protéines contenant un domaine CTLD ont été triées de deux façons différentes. Dans une première approche, les séquences des CTLD sont comparées, et les groupes sont établis en fonction de l'analyse par « cluster ». Dans une deuxième approche, les protéines sont triées en fonction de l'organisation structurale de leurs domaines. Les deux approches donnent essentiellement les mêmes résultats, indiquant que les membres de chaque groupe sont issus d'un ancêtre commun, qui avait déjà acquis l'architecture du domaine et qui est caractéristique du groupe. Une première classification des lectines de type C a été faite par Drickamer et al. d'abord en 7 sous-groupes (I à VII) [363]. Cette classification a par la suite été mise à jour en 2002, rajoutant 7 autres groupes (VII à XIV) [364]. Plus récemment, trois autres sous-groupes ont été ajoutés (XV à XVII) [365], chaque groupe possédant une organisation structurale spécifique.

CD93 fait partie des lectines de type C du groupe 14 qui contient 4 membres : CD93 (C1qRp, AA4 antigène), l'endosialine (CD248), la thrombomodulin (TM, CD141), et Clec14A (Figure 21). Cette famille constitue un cas particulier des lectines de type C, car c'est la seule qui ne requiert pas la fixation du calcium.

Les gènes de ces protéines sont paralogues. Ils sont issus d'un même gène ancestral qui se serait dupliqué, transloqué, et aurait dérivé pour ainsi avoir des fonctions différentes. L'évolution au sein de ce gène ancestral peut se voir au niveau du nombre de domaines EGF (Epidermal Growth Factor). Ce domaine peut avoir été ainsi dupliqué ou supprimé. En raison de leur forte homologie et leur proximité sur le chromosome 20, les gènes de CD93 et de TM sont le résultat de duplication [366], et sont plus proches phylogénétiquement l'un de l'autre que des autres, une fonction commune peut être ainsi envisagée.

CD93 a initialement été découvert sous le nom de C1qRp ou AA4. Les homologues de CD93 chez les souris et rats sont appelés AA4, et possèdent une forte homologie de séquence : 70% d'homologie entre humain et souris [367,368], 67% entre humain et rat et 87% entre souris et rat [369]. CD93 a été initialement découvert comme étant le récepteur pour le complément C1q d'où son nom initial de C1qRp [370–372]. Aujourd'hui des études ont démontré que CD93 ne se lie pas au C1q [373–375], l'utilisation de ce nom C1qRp a été ainsi abrogée pour donner place à CD93.

Différents types de cellules expriment abondamment CD93. On le retrouve aussi au niveau des cellules souches [376]. Son expression est toutefois plus importante dans les cellules endothéliales et les cellules de la lignée myéloïde (granulocytes, plaquettes et monocytes/macrophages principalement) [374,377] et de manière plus ponctuelle dans la lignée lymphoïde. Néanmoins tous les macrophages n'expriment pas CD93, c'est le cas par exemple de ceux résidant dans le tissu [366]. Certains cas de lignée lymphoïde peuvent aussi exprimer CD93 (NK, lymphocyte T et B) mais dans certaines conditions [366,369]. CD93 est aussi connu pour être impliqué dans l'adhésion, la phagocytose et l'angiogenèse.

6.2. Structure

CD93, dont la structure a été étudiée en 1987 [371], est une protéine membranaire de type 1, c'est-à-dire avec une seule traversée membranaire. Elle comporte un domaine lectine de type C (CTLD) aussi appelé domaine de reconnaissance des carbohydrates. La protéine comporte également un domaine sushi, 5 domaines EGF, un domaine mucine-like fortement glycosylé, ainsi qu'un domaine transmembranaire et une courte queue intra cellulaire portant un domaine tyrosine kinase [378–380]. La partie intracellulaire de la protéine interagit avec la moésine, qui est à l'interface entre les protéines de surface et le cytosquelette, et participe au remodelage du cytosquelette (Figure 21).

CD93 peut être présent sous forme membranaire et sous forme soluble (sCD93) ; la forme soluble est une partie tronquée de la forme membranaire [381].

La partie codante de l'ARNm du gène CD93 mesure 1959pb, il en résulte une protéine de 652aa. Les ponts disulfures connus présents dans cette protéine sont ceux des 5 domaines EGF comportant chacun 3 ponts disulfures et le pont disulfure du profil du CTLD entre la position 141 et 165. La masse moléculaire prédite pour CD93 est de 68 kDa et sa migration relative sur gel SDS-PAGE sous condition réduite est de 126kDa, cette différence est due à sa forte glycosylation. CD93 est en effet une protéine fortement O-glycosylée [382]. Ces glycosylations permettent de stabiliser la protéine à la surface des cellules, et dans le cas d'une diminution de cette glycosylation, elle se retrouve préférentiellement sous forme soluble [383].

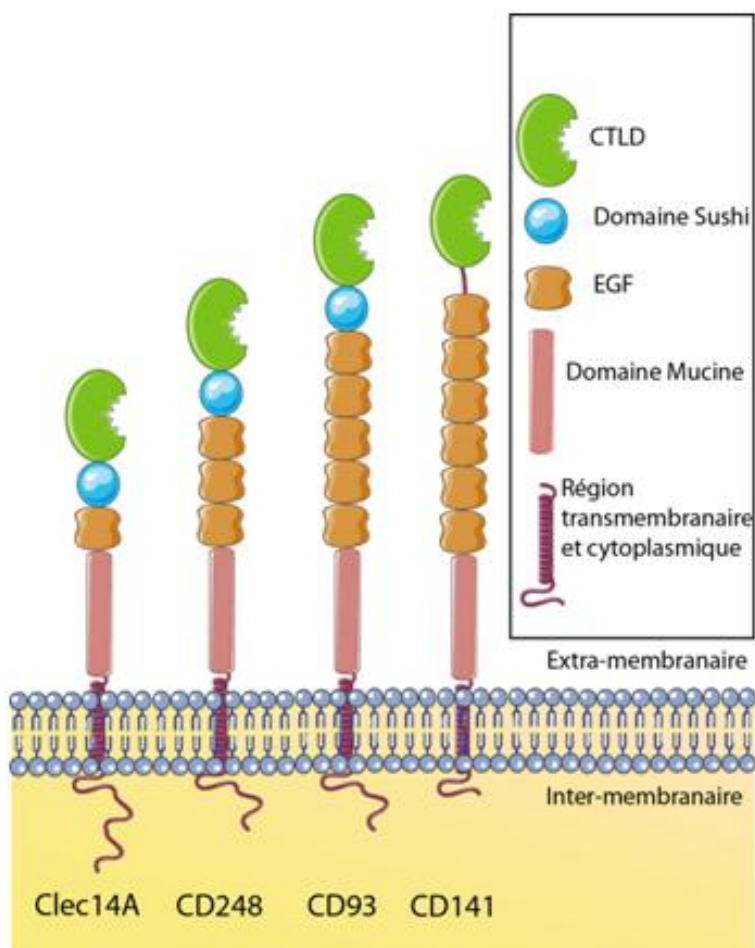


Figure 21. Structure de CD93 et de sa famille (CD2148, CD141 et Clec14A).

6.3. CD93 soluble

CD93 présent à la surface des cellules, principalement des monocytes et neutrophiles, est hydrolysé en réponse à un signal de danger. La libération de CD93 est induite par des métalloprotéinases (MMP). Cette réponse se fait rapidement suite une stimulation (environ 20 minutes) [381]. Les protéines kinases C ont également montré une activité de clivage de CD93 [384]. Ce mécanisme de clivage de protéines membranaires par des MMP, qui par la suite induit différentes activités biologiques, est très répandu, c'est par exemple le cas pour le TNF- α [385], CD44 [386,387], ou encore la L-sélectine [388,389]. D'ailleurs, ce mécanisme de sécrétion est également retrouvé chez un autre membre de la famille, la TM [390,391].

La forme sCD93 se retrouve dans le plasma de personnes saines [381], toutefois les concentrations de sCD93 sont plus importantes chez les personnes atteintes de maladies inflammatoires. Cependant, il est impossible de savoir si la libération de sCD93 a une fonction spécifique dans le milieu extracellulaire, ou si la libération de ce fragment est de permettre au reste intracellulaire d'induire une réponse face à un stress cellulaire.

6.4. CD93 et ses fonctions

Les recherches récentes ont montré que CD93 pourrait être impliqué dans l'angiogenèse [392]. On a montré que CD93 était exprimé dès le début de l'embryogénèse, et au niveau des cellules souches hématopoïétiques [380].

6.4.1. Hématopoïèse

CD93 est impliqué dans le développement et la maturation des cellules hématopoïétiques (Figure 22). On le retrouve au niveau des PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell), (lymphocyte, monocyte et granulocyte). Il est présent dès les premiers stades de l'hématopoïèse et est exprimé par les cellules souches hématopoïétiques, et également au sein des lignées myéloïde et lymphoïde [376,378] :

- Lignée myéloïde : l'expression de CD93 à la surface des cellules de la lignée myéloïde, se passe du début de l'hématopoïèse jusqu'au stade de la cellule différenciée : monocytes/macrophages, plaquettes et granulocytes [374]. Néanmoins lors de l'activation de ces cellules et sur les macrophages résidant dans les tissus, la protéine n'est plus retrouvée à la surface de ces cellules [377].
- Lignée lymphoïde : au cours de la différenciation des cellules de la lignée lymphoïde, CD93 joue un rôle au début de la maturation de ces cellules. La présence de CD93 a été décrite sur les lymphocytes T immatures, mais pas dans les lymphocytes présents dans la circulation [393]. Au cours de la maturation des lymphocytes B, un taux important de CD93 est retrouvé au début du processus chez les pré-cellules B, juste avant d'être diminué lors de l'entrée des pré-cellules B dans la rate [394]. Toutefois il n'est pas présent chez les lymphocytes B circulants. De plus CD93 serait ré-exprimé durant la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes [395]. En effet, CD93 est fortement exprimé par les plasmocytes à longue durée de vie. Des chercheurs ont également montré que l'absence de CD93 entraîne une inefficacité dans le maintien de la production d'anticorps. Ceci est en relation directe avec la diminution du nombre de plasmocytes et surtout de plasmocyte à longue durée de vie dans la moelle osseuse des souris CD93 KO. De plus, ces chercheurs ont mis en évidence que lors de la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes, CD93 était important pour le maintien des plasmocytes dans la moelle osseuse.

Il est intéressant de noter qu'une forte proportion de CD93 est retrouvée sur les lymphocytes de nouveau nés (60%), l'expression de CD93 diminue au cours du développement de l'enfant (27%) à l'adulte (3%). Le taux d'expression de CD93 à la surface des monocytes (92%) et des granulocytes (85%) lui n'est pas être modulé au cours du développement [396]. Il n'y a également pas de modulation du taux de sCD93 dans le sang.

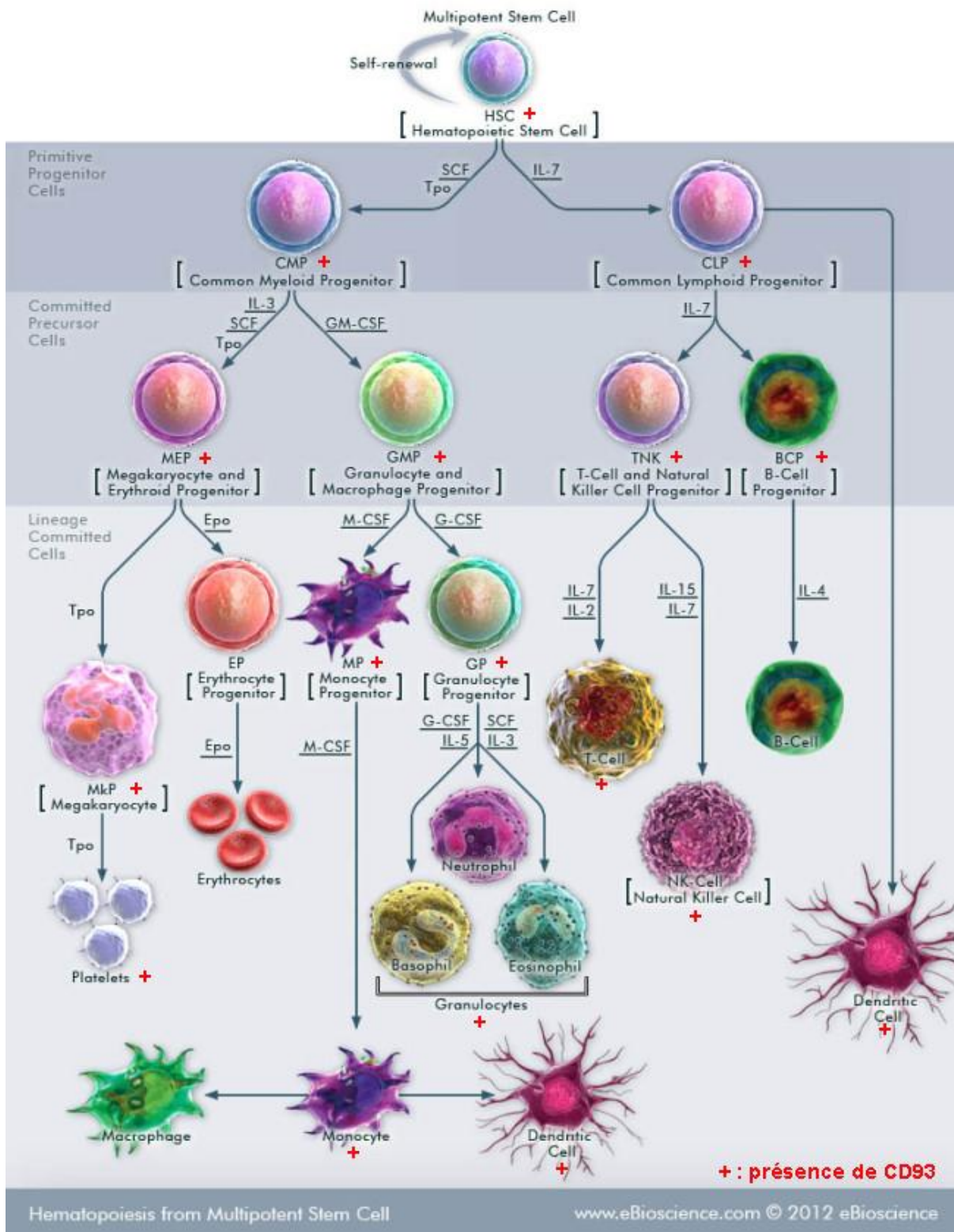


Figure 22. Hématopoïèse (www.eBioscience.com)

6.4.2. Angiogenèse

CD93 est principalement présent dans l'endothélium vasculaire et cardiaque dès le 9^{ème} jour d'embryogenèse. Il est ensuite présent durant le remodelage de l'arbre vasculaire dans tous les organes. Il est exprimé spécifiquement durant le modelage des vaisseaux sanguins. Ceci montre que CD93 est impliqué dans la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants (l'angiogenèse) et non pas dans la création de nouveaux vaisseaux à partir de précurseur de cellules endothéliales (vasculogénèse) [380]. Des études ont montré que les 5 domaines EGF présents dans la structure de CD93 sont principalement impliqués dans son activité angiogénique et que le CTLD n'a aucun effet sur cette activité, au contraire il diminuerait cet effet [392]. L'implication des domaines EGF dans la prolifération de cellules a également été montrée pour la thrombomoduline [397]. Néanmoins les souris CD93 KO ne présentent pas de développement anormal des vaisseaux sanguins [375], ce qui suggère que CD93 n'est pas essentiel dans l'angiogenèse et le développement embryonnaire. D'autres protéines possédant des domaines EGF peuvent compenser l'absence de CD93 (comme la TM).

CD93 est lié à l'angiogenèse, et l'angiogenèse est liée au développement et à la prolifération des cancers. Il existe une corrélation entre le taux de CD93 et la sévérité des cancers [398] montrant une quantité plus faible de CD93 dans le sang des patients atteints de cancer [399]. CD93 aide à la formation de nouveaux vaisseaux au sein de la tumeur. L'utilisation d'anticorps anti-CD93 comme inhibiteur de tumeur a également fait l'objet de différentes études. L'utilisation d'anticorps anti-CD93 conduit à une diminution de la prolifération, de la migration et à l'apparition de nouveaux vaisseaux [400].

A ce jour, on ne connaît aucun ligand de la forme membranaire de CD93 ni aucun récepteur pour la forme soluble de CD93. Une étude récente a mis en avant une interaction possible entre le CD93 et le dystroglycane (DG) [401]. DG est une protéine impliquée dans l'adhésion des cellules à la matrice extra cellulaire et dans l'angiogenèse [402]. L'expression de DG dans les cellules endothéliales est augmentée lors de l'angiogenèse et diminuée dans les cellules endothéliales différenciées ou quiescentes. DG est également surexprimé dans les tumeurs et les tissus enflammés [403,404]. Les chercheurs ont montré que CD93 et DG agissent ensemble pour l'adhésion et la migration des cellules. De plus, l'absence de l'un entraîne une surexpression de l'autre, ceci dans l'hypothèse de compenser les effets de la diminution de l'adhésion [401]. Aussi, ces chercheurs ont mis en évidence un système de régulation de CD93 par sa phosphorylation conduisant à l'adhésion et la migration des cellules endothéliales.

6.4.3. Adhésion cellulaire

Un mécanisme important dans l'angiogenèse et l'hématopoïèse est l'adhésion cellulaire. La présence de CD93 au niveau de la surface des cellules endothéliales peut jouer un rôle dans la régulation de l'adhésion cellulaire et dans le maintien des cellules. Les expériences menées suggèrent que CD93 peut être impliqué dans l'adhésion cellulaire lors de l'hématopoïèse lorsque les cellules migrent dans les tissus pour leur maturation [395] et lors de l'angiogenèse, en facilitant l'adhésion cellulaire des cellules endothéliales pour le développement des vaisseaux sanguins [366,380,398]. Des études ont montré que CD93 est essentiel dans :

- le contact entre cellules ou entre cellules et matrice extracellulaire,
- la migration cellulaire et la formation des vaisseaux sanguins.

Bien que CD93 possède au niveau de ses domaines EGF un site de fixation du Ca^{2+} , il semblerait que le Ca^{2+} ne soit pas nécessaire pour la liaison avec les cellules endothéliales [373].

D'autres études ont mis en lumière la fonction de protéines d'adhésion pour CD93. En effet, lorsque des anticorps sont utilisés contre la partie CTLD de CD93 (mNI-11), on observe une agrégation des monocytes [405] et une augmentation de l'adhésion et de la prolifération cellulaire sur des cellules endothéliales [406]. Cela suggère que l'expression de CD93 sur les cellules endothéliales peut jouer un rôle dans la régulation de l'adhésion et le maintien des cellules inflammatoires [366,373,377].

Les premières expériences ont révélé que CD93 peut être impliqué dans une redistribution du cytosquelette d'actine. Des chercheurs ont démontré que la partie intracellulaire de CD93 était capable de se lier à la moésine [407]. Aussi, la liaison de protéines de la membrane plasmique au cytosquelette par la moésine contribue à la redistribution du cytosquelette, ce qui est essentiel pour la phagocytose, la migration et l'adhésion [408]. Ceci pourrait expliquer la diminution de la migration et de l'adhésion cellulaire observée chez les souris CD93 KO. De manière similaire, la TM contrôle également la morphologie et la migration des cellules épithéliales via ces mêmes types de protéines [409].

6.4.4. Phagocytose

La régulation de la phagocytose par CD93 est une fonction essentielle pour le développement, la réparation et le maintien de l'homéostasie tissulaire. CD93 intervient dans le nettoyage des cellules apoptotiques, en augmentant la phagocytose des macrophages [371,375]. CD93 était initialement connu pour être le récepteur de C1q et C1q est connu pour son activité phagocytaire [410]. Il a été supposé que l'activité phagocytaire de C1q nécessitait CD93 comme récepteur, mais des études ont montré que CD93 n'est pas requis pour l'activité phagocytose de C1q [375]. Néanmoins il est décrit que CD93 intervient de manière indirecte dans l'activité hémolytique de C1q, mais son action exacte n'est pas encore connue [411].

Les macrophages des souris CD93 KO ont des capacités de phagocytose réduites *in vivo* mais pas *in vitro* [375]. Les conditions d'analyse entre les expériences *in vitro* sont différentes de celles de l'expérience *in vivo*, principalement sur le fait de la mise en culture des macrophages qui peuvent induire une activation préalable de ces cellules. De plus, cette différence peut être expliquée par la redondance et la complexité des mécanismes mis en place pour la reconnaissance et la capture des cellules apoptotiques par les macrophages [412,413].

Du fait de la fonction de CD93 dans la modulation du cytosquelette via son interaction avec la moésine [407], l'implication de cette interaction dans la phagocytose peut également être mise en avant [408]. La partie intracellulaire de CD93 interagit également avec la GIPC (GAIP interacting protein, C terminus). La GIPC, une protéine intra-cellulaire, souvent en association avec d'autres protéines, est impliquée principalement dans la stabilisation des protéines transmembranaires ou cytosoliques [414–417]. Cette interaction est connue pour avoir un rôle dans la modulation de la phagocytose [418]. L'interaction de la partie intracellulaire de CD93 avec ces deux protéines pourrait expliquer la diminution de la phagocytose observée chez les souris CD93 KO.

Cette partie intracellulaire de CD93 serait ainsi importante pour la transduction du signal pour permettre la modulation de la phagocytose. D'autres études ont montré que le blocage de cette partie intracellulaire de CD93 par des anticorps conduisait à une inhibition de la phagocytose des macrophages [368,419].

CD93 pourrait ainsi agir en faisant la liaison entre les cellules apoptotiques et les macrophages, comme démontré pour C1q et ses récepteurs [420,421]. En effet, cela induirait une modulation au niveau de la partie intra-cellulaire de CD93, conduisant à la mise en place des mécanismes de phagocytose. Cependant, le mécanisme exact de l'action de phagocytose de CD93 n'est pas défini.

6.5. CD93 et LPS dans l'inflammation

Les phénomènes inflammatoires observés par exemple en présence de TNF- α ou de LPS sont capables d'induire l'expression de CD93 [384] et le clivage de CD93 membranaire [381,411]. Il est montré également que la forme soluble de CD93 est élevée durant l'inflammation [422].

Les premières expériences *ex vivo* ont révélé que les neutrophiles et les macrophages sont la source prédominante de sCD93, lorsqu'on récupère ces cellules en culture suivie d'une stimulation par des facteurs inflammatoires. Dans les macrophages activés, le clivage de CD93 ne se fait que dans les conditions inflammatoires et non pas en condition normale [422]. Néanmoins, la même équipe a montré, quelques années plus tard, que la source prédominante de sCD93 étaient les cellules endothéliales, et cela sur un même modèle de péritonite chez des souris Wild Type ou CD93 KO mais cette fois *in vivo* [411]. Cependant, le clivage de CD93 dans des conditions inflammatoires est bien connu, mais son action n'est pas bien décrite.

Des études ont montré une activité anti-inflammatoire du domaine CTLD de CD93, comme pour TM. Différents groupes ont remarqué que le TM possède des capacités anti-inflammatoires et que cette capacité anti-inflammatoire était principalement due au domaine CTLD [423,424]. Ce domaine est capable de séquestrer le LPS [423] et HMGB1 [425] et de diminuer l'action du complément [426]. De plus, dans une autre étude CD93 est décrit comme un régulateur de l'inflammation. Chez des souris CD93 KO, dans lesquelles on a induit une ischémie cérébrale, on observe une augmentation de l'infiltration de leucocytes, une augmentation de l'inflammation et la destruction des tissus du cerveau [427]. Les chercheurs ont émis l'hypothèse que CD93 pourrait avoir pour effet de diminuer l'inflammation.

L'action de sCD93 a également été notée dans l'activation et la différenciation des monocytes en macrophages, avec une augmentation de l'adhérence, une modification morphologique et une augmentation de la phagocytose des monocytes [428]. De plus, le prétraitement des monocytes avec du sCD93, conduit à une réponse inflammatoire plus importante que lors d'une stimulation par des ligands de TLR comme le LPS.

Des chercheurs ont émis l'hypothèse que la différence entre ces études peut être expliquée par des différences de pathologie. Il existe des variations entre une réponse inflammatoire suite à une agression extérieure comme un pathogène ou du LPS (non-soi), et une réponse inflammatoire de type stérile (soi). Ainsi, CD93 peut induire des réponses inflammatoires différentes selon le type d'agression [428].

6.6. Conclusion

CD93 est une protéine membranaire exprimée principalement par les cellules endothéliales et les cellules de la lignée myéloïde. Néanmoins elle peut être clivée et se présenter sous forme soluble, sCD93. Elle joue un rôle dans l'adhésion cellulaire, la phagocytose, l'hématopoïèse et l'angiogenèse. L'expression et le clivage de CD93 augmentent suite à l'induction d'une inflammation. sCD93 est capable d'induire une activation et une différenciation des monocytes en macrophages. De plus l'absence de CD93 entraîne un dérèglement de la phagocytose et donc un dérèglement de l'homéostasie tissulaire.

7. Les DAMP dans les maladies inflammatoires chroniques

7.1.HMGB1 dans les maladies inflammatoires

De nombreuses études ont montré l'implication de HMGB1 dans des pathologies liées à des conditions inflammatoires [145]. Ces pathologies sont souvent liées à la nécrose, l'apoptose ou l'activation de monocytes/macrophages, conduisant à la libération de HMGB1.

Différentes stratégies de lutte contre les propriétés pro-inflammatoires de HMGB1 ont été mises en place [145], par l'utilisation :

- d'anticorps anti-HMGB1 [429–432],
- du domaine Box-A [220,433,434],
- du récepteur soluble de RAGE (sRAGE) [435,436],
- de la Thrombomoduline (TM) [437–440],
- de glycyrrhizine [441,442],

Toutes ces stratégies visent à interagir avec HMGB1 et le bloquer [442–444]. Une autre technique est la rétention de HMGB1 dans la cellule [445–448].

7.1.1. Athérosclérose

HMGB1 est connu pour être impliqué dans l'athérosclérose. Dans les plaques d'athérome, HMGB1 est surexprimé et libéré par de nombreux types de cellules comme les cellules de muscles lisses, les cellules endothéliales, les cellules spumeuses, les macrophages et les plaquettes activés [449,450]. HMGB1 intervient dans la formation de la plaque dans les premiers stades de développement de la maladie, en stimulant la migration et l'activation des monocytes, et en modulant l'expression de médiateur pro-inflammatoire. De plus HMGB1 agirait également au niveau des autres cellules du corps, en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires. HMGB1 provoque aussi l'expression de protéines d'adhésion ICAM et VCAM chez des cellules endothéliales [451,452], favorisant l'adhésion de cellules immunitaires. HMGB1 libéré et présent sur les plaquettes activées contribue à l'adhérence des plaquettes aux cellules endothéliales et donc à la formation de thrombus [177]. Les cellules musculaires lisses prolifèrent à la suite d'une stimulation par du HMGB1 [453] favorisant la encore la formation du thrombus.

Dans un modèle murin d'athérosclérose, les souris Apo-E KO, HMGB1 et RAGE interviennent directement dans la formation de plaques d'athérome [454–456]. Il existe également une corrélation entre le taux de HMGB1 présent dans le sang et la sévérité de la maladie [457].

D'autres études ont montré que la teneur en HMGB1 était plus élevée suite à un infarctus du myocarde. Un taux élevé coïncide avec les complications les plus graves comme la mort [458]. Sur un modèle murin, l'ajout de HMGB1 suite à un infarctus entraîne une forte inflammation et un effet délétère sur la réparation tissulaire [459,460]. Néanmoins, l'inhibition totale de HMGB1 entraîne une réparation plus lente et affaiblie [461]. De plus, certains chercheurs ont montré que l'ajout de faible dose de HMGB1 entraîne un effet régénératif du tissu touché [204,461–463]. Nous pouvons conclure que l'effet de HMGB1 dépend des conditions et de sa concentration [464]. Ainsi, dans des concentrations normales, HMGB1 aide à un rétablissement et une réparation du tissu, et en concentration trop élevée sa présence devient délétère.

7.1.2. Diabète et obésité

HMGB1 est connu pour être impliqué également dans les pathologies du diabète et de l'obésité. Différentes études de population ont montré un lien direct entre HMGB1 et le diabète ou l'obésité.

L'obésité est connue pour être associée à une inflammation basale due à un excès de tissu adipeux. Chez les personnes obèses, le taux de HMGB1 et de cytokines pro-inflammatoires dans le sang est très élevé [465,466]. Il existe une corrélation entre le taux de HMGB1 et les paramètres corporels (IMC, rapport taille hanche) [465,466]. Le taux de HMGB1 et de cytokines inflammatoires produits par le tissu adipeux est plus important chez les personnes obèses que chez les personnes normo-pondérées [467]. Dans ce tissu adipeux, les adipocytes ne sont pas les seules cellules à produire ces facteurs inflammatoires, de nombreuses autres cellules le peuvent comme les cellules endothéliales, les fibroblastes, et les cellules immunitaires. L'une des principales cellules immunitaires productrices de HMGB1 sont les macrophages présents dans le tissu adipeux. Ils sont connus pour être une importante source de facteurs pro-inflammatoires et de HMGB1 [468]. Une autre source de HMGB1 sont les cellules nécrotiques présentes au sein du tissu adipeux [468].

Chez les personnes diabétiques de type 1 ou 2, le taux de HMGB1 et de cytokines pro-inflammatoires dans le sang est plus élevé [465,469]. De plus, une étude récente a montré que l'association du diabète et de l'obésité conduit à un taux plus important de HMGB1 dans le sang [465]. Le glucose induit la production de HMGB1 et de cytokines pro-inflammatoires. HMGB1 est fortement produit par les cellules β des îlots de Langerhans, et ceci est encore plus important suite à une stimulation par du glucose [470]. Les récepteurs TLR4 et RAGE sont impliqués dans ces phénomènes [470,471]. De plus HMGB1 induirait la production de l'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans [472]. Et à son tour l'insuline aurait pour effet de diminuer la quantité de HMGB1 dans le sang et dans le tissu adipeux de personnes obèses [472,473]. Ceci met en avant un système de régulation de la production de HMGB1.

7.1.3. Maladie liée à l'arthrite

Dans un modèle murin d'arthrite ou chez des patients atteints d'arthrite le taux de HMGB1 circulant est élevé. De même, il y a un fort taux de HMGB1 dans le liquide synovial autour de l'articulation des patients atteints d'arthrite rhumatoïde [474–476]. Ils ont montré que le HMGB1 présent était issu d'une sécrétion active de HMGB1 principalement, et ceci de manière dépendante et non-dépendante de l'acétylation de HMGB1 au niveau de son site NLS. Ils décrivent que les neutrophiles présents au niveau de l'articulation sont la source préférentielle de HMGB1. Des chercheurs se sont intéressés très récemment à la forme redox de HMGB1 présente dans le liquide synoviale de ces patients [477]. Les 3 formes redox de HMGB1 se retrouvent dans le liquide synoviale, décrivant ainsi les fonctions chimiokine et cytokine. C'est la seule étude disponible sur les formes redox de HMGB1 chez des patients.

Par ailleurs, l'injection de HMGB1 au niveau des articulations entraîne l'apparition de l'arthrite [478]. Les macrophages présents dans le liquide synovial, expriment de façon plus importante les récepteurs TLR2, TLR4 et RAGE, et libèrent des facteurs inflammatoires lorsqu'ils sont exposés à du HMGB1 [479]. Inversement ils libèrent du HMGB1 lorsqu'on les stimule. HMGB1 pourrait également intervenir dans l'activation de facteur dégradant le cartilage comme les métalloprotéinases et le plasminogène [480]. IL-1 β et son récepteur seraient impliqués avec HMGB1, dans le développement de l'arthrite. En effet des souris KO pour le récepteur de IL-1 β ne développent pas d'arthrite suite à une injection de HMGB1 [478]. De plus, les fibroblastes issus de patient atteints d'arthrite, stimulés avec du HMGB1/IL-1 β produisent plus de cytokines et de métalloprotéinase [481].

De même, les thérapies ciblant HMGB1 préviennent la progression de l'arthrite dans les modèles animaux [231,429,445,474].

7.2.HSP60 dans les maladies inflammatoires chroniques

HSP60 est impliquée dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques telles que les parodontites, le diabète, les maladies cardiovasculaires et l'athérosclérose. HSP60 agirait comme stimulateur de l'inflammation. Il est intéressant de noter que l'activité anti-inflammatoire de HSP60 aussi peut être impliquée dans certains cas de maladies inflammatoires chroniques.

7.2.1. L'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique de la paroi des vaisseaux sanguins. Les systèmes immunitaires inné et adaptatif sont impliqués dans le développement de cette pathologie. Une grande implication des macrophages, des lymphocytes T et B a été décrite dans le développement de l'athérosclérose.

Dans les premières étapes de la formation des plaques d'athérome, les cellules endothéliales peuvent être stressées par des molécules HSP60 exogènes ou endogènes. Ce stress peut ainsi provenir du HSP60 présent dans la circulation sanguine. Il a été décrit la présence de HSP60 à la surface des cellules endothéliales stressées [240]. En effet, les cellules endothéliales stressées induiraient l'expression à leurs surfaces de la protéine HSP60, et également d'autres molécules d'adhésions comme par exemple ICAM et VCAM conduisant à la fixation de cellule immunitaire [240]. En plus de cela, HSP60 induit un processus inflammatoire conduisant à la production de cytokines inflammatoires, aidant aussi au recrutement de cellules immunitaires [240]. HSP60 conduirait au final à la formation de cellules spumeuses [482].

Les lymphocytes T sont les premiers présents lors de la formation de plaque athérome, et sont très fortement impliqués dans son développement [483,484]. Là encore, l'implication des lymphocytes T peut être protecteur selon le profil d'expression Th2 modulé par HSP60 [485–487]. Les macrophages interviennent également dans cette pathologie, HSP60 régule l'activité des macrophages en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires mais également de métalloprotéines (MMP), qui seraient responsables par la suite de la rupture de la plaque.

Une des théories du développement de l'athérosclérose est l'implantation d'une inflammation du type auto-immun. HSP60 a également été ciblée comme responsable de cette auto-immunité [482,488]. Ce concept s'appuie sur le fait que des personnes saines possèdent une immunité adaptative protectrice contre le HSP60 qui était initialement issu de bactérie ou de HSP60 du soi modifiée [482,488]. De plus, il a été découvert dans les plaques d'athérome humain la présence de la protéine HSP60 de *Chlamydia* [331]. Une des explications mise en avant est la grande similarité de structure entre les HSP60 humains et bactériens (GroEL). On pourrait penser qu'il n'y aurait pas de forte réponse immunitaire lors de stimulations par GroEL chez l'Homme, alors que, cette réponse immunitaire est très forte, et que les anticorps contre le GroEL réagissent avec le HSP60 humain [489]. Ces anticorps dirigés contre HSP60 induisent une reconnaissance accrue au niveau des cellules de l'endothélium activées, exprimant HSP60 à leur surface, favorisant ainsi le développement de plaque d'athérome. De manière générale les maladies auto-immunes sont souvent associées à la présence d'anticorps anti-chaperonne.

Un autre facteur de risque dans le développement de l'athérosclérose est l'implication de parodontite. Trois modes d'action plausibles ont été proposés pour expliquer ce lien: une action directe des bactéries parodontales migrant jusqu'aux parois vasculaires par bactériémie, une action indirecte par les médiateurs de

l'inflammation, une action immuno-pathogène liée aux HSP. Les personnes atteintes de parodontites présentent un taux élevé de HSP60 dans le sang [490]. Il est intéressant de noter que le taux de HSP10 chez ces patients est faible, et qu'après traitement de cette parodontite on observe une élévation de HSP10 [490].

7.2.2. Diabète et obésité

HSP60 est connue pour être impliquée dans l'inflammation liée au tissu adipeux. HSP60 stimule les adipocytes et induit la production de cytokines inflammatoires [335,491–493]. Ainsi, chez les personnes obèses, où les adipocytes sont plus nombreux et auto-enflammés [494,495], une concentration plus élevée de HSP60 est observée dans le sang. De plus, il existe une corrélation entre l'indice de masse corporelle et le taux de HSP60 présent dans le plasma [496]. Le diabète également est lié à un taux élevé de HSP60 présent dans le plasma aussi bien pour le diabète de type 1 [497–499], que pour le diabète de type 2 [498–500]. Ceci est observé dans les cas de diabètes non associés à de l'obésité, mais l'obésité accentue le taux de HSP60. HSP60 est donc aussi lié à la résistance à l'insuline [496]. L'hyperglycémie provoque l'augmentation de HSP60 et également l'apoptose des cellules β [303]. L'action des lymphocytes T auto-immuns associée à HSP60 a également été décrite dans les cas de destruction des cellules β pancréatiques [501], ce qui conduirait là encore au développement du diabète. Ici aussi l'implication des lymphocytes T est à prendre en compte suivant son profil Th1 ou Th2. En effet, des études ont montré que la modulation des lymphocytes T par du HSP60 conduisant à un profil Th2 induit une protection des cellules β [502,503], et donc à une protection contre le diabète.

7.2.3. Maladies liées à l'arthrite

Il a été décrit que HSP60 était impliquée dans les maladies liées à l'arthrite. Il existe plusieurs modèles d'étude d'arthrite chez les rongeurs dans lequel les symptômes ressemblent à celui de l'arthrite rhumatoïde humaine. Dans ces modèles on injecte un adjuvant souvent associé à des constituants de bactérie [504–506]. L'induction de cette maladie est due à l'action du HSP60 de bactérie sur l'activation des lymphocytes T [349,507,508]. Certaines formes d'arthrites comme l'arthrite juvénile ont souvent des stades rémittents. La rémission est associée à la présence de lymphocytes T ayant réagi au HSP60 du soi et conduisant à la production de cytokines anti-inflammatoires, de type Th2 [509]. De plus, des lymphocytes T isolés, issus de patient atteint d'arthrite rhumatoïde, répondent à de l'HSP60 humain (du soi) en produisant des cytokines anti-inflammatoires de type Th2, alors que stimulés avec de l'HSP60 issue de bactérie (non-soi) ils induisent une réponse pro-inflammatoire de type Th1 [346]. Des observations similaires ont été faites sur des modèles murins d'arthrite [510,511].

7.3. CD93 dans les maladies inflammatoires chroniques

Il existe un rôle possible de CD93 dans les maladies inflammatoires chroniques. Les principales études menées portent sur la relation entre le taux de sCD93 présent dans le sang des patients et certaines pathologies inflammatoires comme les maladies coronariennes, l'arthrite rhumatoïde et le diabète. Néanmoins la fonction exacte de CD93 dans ces pathologies n'est pas connue.

7.3.1. Athérosclérose

L'infarctus du myocarde est une manifestation clinique d'une atteinte par de l'athérosclérose et de la thrombose [512]. Deux événements majeurs de thrombose sont la rupture de plaque et l'érosion de l'endothélium [513,514]. En effet, ceci est dû à la présence de plaques au niveau de l'artère coronaire. Dans un premier temps, l'étude du gène CD93 a permis de mettre en évidence son association avec certain type de maladie. Un polymorphisme du gène CD93 est associé à un risque accru d'infarctus du myocarde. Ce polymorphisme de CD93 entraîne une augmentation de sCD93 présent dans le sérum des patients, ainsi

qu'une augmentation d'ARNm de CD93 des cellules mononucléaires du sang périphérique, et ceci lié à la maladie coronarienne [515,516]. Une association entre le taux de sCD93 dans le plasma et l'infarctus du myocarde, ainsi que le taux d'incidence de maladie coronarienne a été mise en évidence dans deux cohortes indépendantes [517]. Ce taux de sCD93 était élevé chez les patients après un infarctus du myocarde, et ce taux était associé à la gravité des signes cliniques [518]. De plus, il a été montré que suite à un infarctus, le clivage de CD93 à la surface des monocytes était augmenté.

On peut ainsi émettre l'hypothèse que CD93 peut être un marqueur de l'athérosclérose en se penchant sur le rôle de CD93 dans l'immunité innée [378] et dans les conséquences liées à l'athérosclérose comme l'infarctus du myocarde et les maladies coronariennes. Premièrement, CD93 est exprimé préférentiellement par les cellules endothéliales et les monocytes/macrophages, connus pour participer à la mise en place et au développement de l'athérosclérose [519,520]. L'activation de macrophages au niveau de la plaque d'athérome entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires ainsi que d'autres molécules entraînant la déstabilisation et la rupture de cette plaque [513,514]. Deuxièmement, sCD93 entraîne la différenciation des monocytes en macrophages [428], entraînant une augmentation de la production de cytokines. Troisièmement, CD93 est impliqué dans la phagocytose, processus important dans la progression de la formation de plaque d'athérome [521,522]. Pour finir, CD93 est impliqué dans l'adhésion cellulaire et le maintien des cellules immunitaires, processus également importants dans le développement de l'athérosclérose [523].

7.3.2. Diabète

Récemment le gène codant CD93 a été identifié comme un potentiel régulateur des voies de signalisation associées aux pathologies du diabète et de maladies cardiovasculaires [524]. Dans une étude très récente, les chercheurs se sont focalisés sur les effets de la diminution de l'expression de sCD93 en utilisant des souris CD93^{+/-} [525], dans lesquelles ils observent une diminution d'environ deux fois du taux de sCD93 dans le sérum des souris. Dans ce modèle les chercheurs remarquent une diminution de la régulation métabolique. Les souris ont plus de mal à réguler leur taux de glucose et d'insuline suite à un repas riche en gras. Cette étude montre que la libération de sCD93 induite par un stress est altérée par l'hyperglycémie. De plus, ils observent la présence de CD93 au niveau des îlots pancréatiques. Aussi, chez les souris CD93^{+/-} les vaisseaux sanguins présents dans le pancréas sont plus perméables et fragiles. On peut néanmoins critiquer l'absence de test sur des souris CD93^{-/-}. Cette équipe a également montré de manière surprenante que la concentration de sCD93 est moins importante chez les personnes atteintes de diabète de type 2.

7.3.3. Maladie liée à l'arthrite

Deux études [428,526] ont montré que le taux de sCD93 est élevé dans le sang de patients atteints d'arthrite rhumatoïde. Néanmoins aucune fonction n'est connue pour CD93 dans cette pathologie. Une des hypothèses de cette augmentation de CD93 est son implication dans l'angiogenèse. L'angiogenèse est connue pour contribuer au développement de l'arthrite rhumatoïde [527] et CD93 est augmentée lors de l'angiogenèse.

8. Conclusion

Depuis longtemps les chercheurs se sont concentrés uniquement sur le non-soi comme source de molécules activatrices du système immunitaire, les PAMP. Il est maintenant démontré que des molécules endogènes représentent également une source importante de molécules induisant une réponse immunitaire. De nombreux mécanismes de signalisation des DAMP au sein du système immunitaire sont aujourd'hui décrits, impliquant leurs modes de libération et leurs récepteurs. Toutefois le nombre de nouveaux DAMP et de nouveaux récepteurs augmente chaque année, de même pour leurs mécanismes impliqués dans le système immunitaire.

8.1. Les PAMP

Le PAMP le plus connu et décrit dans la littérature aujourd'hui est le LPS, néanmoins il existe une grande variété de LPS au sein du monde bactérien. Ajouté à cela, les différentes techniques d'extraction et de purification qui permettent d'obtenir du LPS mais également d'autres constituants de la bactérie, cela donne un éventail d'effets biologiques sur le système immunitaire très varié. La présence de récepteurs TLR et de molécules accessoires est nécessaire pour fixer le LPS et induire la production de cytokines pro-inflammatoires.

Un autre PAMP connu est l'ADN bactérien, plus précisément les motifs CpG (Cytosine-phosphate-Guanine) de l'ADN bactérien. Les motifs CpG sont considérés comme des PAMP en raison de leur abondance dans les génomes microbiens et de leur rareté dans les génomes de vertébrés. De plus chez les vertébrés, le motif CpG lorsqu'il existe est très souvent méthylé. En effet, lorsque ces motifs CpG ne sont pas méthylés, ils agissent comme des immunostimulants [528]. Le PAMP CpG est reconnu par le récepteur TLR9 [529]. Aujourd'hui il existe des séquences synthétiques appelées oligodésoxynucléotides CpG (ou CpG ODN), ce sont des molécules courtes d'ADN synthétique monocaténaire qui contiennent différents motifs CpG. Certaines séquences stimulent TLR9 différemment en fonction des variations dans le nombre et l'emplacement des dimères de CpG, ainsi que des séquences flanquant les dimères de CpG. Il existe donc différentes classes de CpG qui possèdent différentes activités sur le système immunitaire [530].

8.2. Les DAMP

HMGB1 et HSP60 sont deux protéines bien décrites dans la littérature pour leurs rôles de DAMP. Elles ont toutes les deux de grandes similitudes de fonctionnement. Elles exercent des rôles différents en fonction de leur localisation, intracellulaire ou extracellulaire. HMGB1 et HSP60 sont issues d'un compartiment intracellulaire, noyau et mitochondrie respectivement, et sont libérées activement ou à la suite de nécrose ou d'apoptose. Elles interviennent en dehors de la cellule sur le système immunitaire et participent à la réponse inflammatoire stérile ainsi qu'à la réponse inflammatoire suite à une infection. Les dernières découvertes montrent que cette activité nécessite la présence d'autres facteurs inflammatoires comme le LPS. Ces protéines font partie d'un réseau complexe au sein du système immunitaire permettant la régulation et la résolution d'événements inflammatoires. Enfin, elles sont toutes les deux impliquées dans des pathologies liées à des conditions inflammatoires.

8.3. L'association entre DAMP et PAMP

Des signaux de danger endogènes ou exogènes peuvent coopérer pour induire des réponses immunitaires. Pour exemple, des études ont montré que HMGB1 peut se lier étroitement au LPS et amplifier son activité biologique [223–226]. Certains DAMP peuvent potentialiser l'effet inflammatoire de certains PAMP en interagissant avec son récepteur préférentiel et avec un second récepteur. Par exemple l'ADN sous la forme

d'un complexe avec HMGB1 interagit avec RAGE et TLR9, alors que seul il ne peut se lier qu'à TLR9. Cette association HMGB1-ADN permet d'augmenter l'activité de l'ADN [231].

Certains DAMP peuvent aider à la reconnaissance du LPS par les cellules immunitaires, comme par exemple HMGB1. Il est intéressant de noter qu'aujourd'hui une nouvelle théorie sur l'installation de maladie métabolique pourrait avoir pour origine le LPS qui agirait comme inducteur de l'inflammation.

Cette interaction entre les PAMP et les DAMP est très importante pour le système immunitaire. Elle permet d'augmenter l'efficacité de la réponse immunitaire, et également d'augmenter l'intensité de la réponse immunitaire face à une agression par des pathogènes.

Des hypothèses proposent une différence biologique entre l'activation par les PAMP et DAMP. Bien qu'il existe un certain chevauchement dans les mécanismes moléculaires, les DAMP et les PAMP possèdent des mécanismes d'action différents. Ainsi le LPS et HMGB1 sont tous les deux capables d'induire la production de cytokines inflammatoires, mais HMGB1 est capable de surcroît d'induire la production de protéines anti-apoptotiques (Bcl-XL) [174–176]. De même pour HSP60, qui en plus de son pouvoir synergique en association avec le LPS sur la production de cytokines inflammatoires, est capable d'induire la production de IFN [359].

8.4. Les PAMP et DAMP dans les cas de maladie inflammatoire.

La libération de DAMP peut aujourd'hui servir de marqueur dans la progression de maladies inflammatoires. Les DAMP sont connus pour être impliqués dans un grand nombre de maladies inflammatoires. La présence de DAMP dans la circulation est retrouvée chez les patients atteints de maladies inflammatoires. Ainsi, le fait de diminuer ou d'inhiber ces DAMP entraîne souvent une amélioration des symptômes de la maladie. Inversement l'ajout de DAMP a tendance à augmenter les symptômes des maladies inflammatoires dans des modèles *in vivo*. Les DAMP et leurs récepteurs sont des cibles thérapeutiques potentielles dans le cas de ces maladies [10]. Cependant, il est nécessaire de connaître les mécanismes d'action exacts de ces DAMP pour permettre le développement de thérapies ciblées ou même de thérapies généralisées pour ces maladies inflammatoires.

Les réactions immunitaires et inflammatoires aux infections incontrôlées, peuvent être à l'origine de nombreuses maladies, parmi lesquelles les maladies rhumatoïdes, l'athérosclérose et le diabète [531,532]. Différentes théories peuvent expliquer l'initiation de l'inflammation chronique par une infection. Effectivement, le maintien de l'inflammation peut provenir de la persistance du pathogène ou d'un PAMP dans l'hôte à un niveau très faible, qui induit une inflammation chronique. Par exemple dans les cas d'infection par le virus du Chikungunya, le virus persiste au niveau des articulations et induit une inflammation chronique rhumatoïde [533]. Un second exemple est l'implication de la bactérie *P.gingivalis* dans l'installation de nombreuses pathologies comme l'athérosclérose et la polyarthrite rhumatoïde. La bactérie peut induire et maintenir un état inflammatoire chronique [534]. Une autre hypothèse est l'installation d'une auto-immunité [535], par la mise en place d'un mimétisme moléculaire, l'altération des antigènes du soi qui les rendent immunogènes, ou des lésions qui libèrent des antigènes précédemment cachés. Par exemple dans le cas du diabète une théorie supporte l'idée que le diabète serait issu d'une maladie auto-immune induite par une infection virale [536,537]. Un autre point à prendre en considération est la potentielle implication des interactions PAMP/DAMP/PRR dans l'étude des thérapies pour ces maladies inflammatoires.

Il ne faut toutefois pas oublier que les DAMP sont à l'origine dans la cellule et sont des molécules nécessaires à la survie de l'organisme. Donc lors de la mise en place d'un éventuel traitement, il convient de cibler les DAMP

dans leurs rôles pathologiques sans entraver leurs fonctions initiales dans l'organisme. Les DAMP apparaissent donc comme une épée à double tranchant. Bien qu'ils soient vitaux pour la réparation des tissus, ils jouent également un rôle dans la pathogenèse de nombreuses maladies inflammatoires. En fait, dans ces maladies, des stimuli nuisibles causent des lésions tissulaires. Dans une tentative de guérison tissulaire, des réponses inflammatoires sont initiées et génèrent des DAMP qui induisent une boucle autocrine d'inflammation. Ainsi, comprendre pourquoi les mécanismes naturels qui initient l'inflammation induite par les DAMP n'arrivent pas à un retour à la normale dans ces maladies, peut éclairer notre approche de l'ingénierie des thérapies ciblées et efficaces conçues pour atténuer l'inflammation.

II. Objectif des travaux de thèse

Les maladies inflammatoires, caractérisées par le développement d'une inflammation persistante dans le temps et causant des dommages aux tissus, sont souvent associées à des PAMP et des DAMP. Ces derniers, permettent l'initiation et le maintien de cette inflammation. La compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans cette dérégulation du fonctionnement du système immunitaire au cours de ces maladies inflammatoires chroniques représente un enjeu scientifique et médical majeur. Plusieurs études indiquent les DAMP, PAMP et leurs récepteurs comme cible dans le cadre de stratégie visant à lutter contre la mise en place de cette inflammation chronique.

L'objectif du travail de thèse est d'explorer dans le contexte d'une réponse inflammatoire, les mécanismes moléculaires et cellulaires des DAMP et leur association avec un PAMP : le LPS. Pour ce faire, deux DAMP ont été étudiés, HMGB1 et HSP60, ainsi que l'interaction entre le LPS et HSP60. Les récepteurs impliqués dans la reconnaissance de ces PAMP et DAMP ont également été analysés, avec la mise en évidence d'un possible nouveau récepteur CD93. Enfin, le travail de thèse vise à comprendre les mécanismes de reconnaissance et d'induction de l'inflammation par les PAMP et DAMP.

Dans un premier temps, notre étude a porté sur les mécanismes moléculaires et cellulaires d'un PAMP, le LPS. Celui-ci est un composé de la paroi des bactéries Gram-. Les LPS de deux souches de bactéries, *Escherichia coli* et *Porphyromonas gingivalis*, ont été utilisés. *E. coli* est une bactérie très utilisée en laboratoire comme modèle classique de bactérie Gram-, ainsi que son LPS. *P.gingivalis* est une bactérie associée aux maladies parodontales et à l'athérosclérose. Nous avons étudié le LPS de *P.gingivalis* à différents degrés de purification pour son activité pro-inflammatoire. Les récepteurs impliqués dans cette réponse inflammatoire sont également analysés. Enfin, la comparaison entre la réponse inflammatoire induite chez l'homme et la souris a été réalisée. Les récepteurs associés à cette réponse inflammatoire ont également été analysés.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les mécanismes moléculaires et cellulaires d'un DAMP, le HMGB1. HMGB1 a été analysé dans le cadre de l'inflammation chronique du tissu adipeux observée chez les personnes obèses. Cette inflammation est responsable de l'installation d'autres pathologies comme le diabète. Nous nous sommes intéressés à HMGB1 produit par le tissu adipeux. Les pré-adipocytes sont des cellules présentes au sein de ce tissu adipeux. Nous avons évalué l'implication de ces pré-adipocytes dans l'inflammation du tissu adipeux par leur capacité à produire et à répondre à HMGB1, ainsi que le rôle de HMGB1 dans l'inflammation du tissu adipeux. Les récepteurs associés à cette réponse inflammatoire ont également été analysés.

Dans un troisième temps, l'étude a portée sur l'interaction entre un PAMP, le LPS et un DAMP, HSP60. Il existe de nombreuses ambiguïtés quant aux propriétés pro-inflammatoires de HSP60, qui dépendent des méthodes d'expression et de purification de HSP60. Nous avons donc analysé l'activité pro-inflammatoire de HSP60 dans une nouvelle approche d'expression de cette protéine. Nous avons également examiné son activité pro-inflammatoire en association avec différents LPS.

Pour finir, l'étude a porté sur une protéine membranaire CD93. CD93 est une protéine peu étudiée pour ses capacités inflammatoires. CD93 possède un domaine fonctionnel important le CTLD. Nous avons analysé les propriétés inflammatoires du domaine CTLD de CD93. Puis nous avons examiné sa capacité à interagir avec différents DAMP (HMGB1 et HSP60) et PAMP (LPS, ADN bactérien et CpG ODN) et à moduler leurs propriétés inflammatoires.

III. Approche expérimentale

D'un point de vue méthodologique, la première étape consiste à choisir les DAMP et PAMP à étudier. Pour les PAMP, nous nous sommes intéressés aux bactéries et principalement aux constituants de leurs membranes, car ils sont responsables de la plus forte activité immunogène chez les bactéries. Nous avons sélectionné celui qui est le plus étudié, connu et facile d'accès, le LPS. Pour les DAMP, nous nous sommes focalisés sur ceux dont la littérature définissait clairement leurs fonctions de DAMP. Nous avons donc sélectionné HMGB1 et HSP60. Parallèlement à cela, nous nous sommes également intéressés à une protéine peu étudiée CD93.

Concernant le LPS, nous avons obtenu du LPS directement dans le commerce. Souhaitant étudier l'influence de la purification sur les propriétés du LPS, nous nous sommes procurés les LPS de *P. gingivalis* et d'*E. coli* sous deux formes de purification ultra-pure et standard. En parallèle de cela, nous avons également purifié du LPS de bactéries. L'extraction du LPS s'est faite par la technique de phénol/eau chaud. Les bactéries sont lysées par sonication, qui dégrade également l'ADN de la bactérie. De la protéinase K, de la DNase et de la RNase sont utilisées avant l'extraction par du phénol/eau chaud pour éliminer les agents contaminants de type protéine ou acide nucléique. Le LPS est ensuite précipité [538]. La pureté des préparations de LPS est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose en présence de GelRed pour les contaminants ADN/ARN. Un gel SDS-PAGE coloré à l'argent est utilisé pour les contaminants protéiques. Le dosage du LPS a été réalisé grâce à la génération de chromophores lipidiques en présence d'acide sulfurique concentré [539].

En ce qui concerne les différentes protéines étudiées, leur production était nécessaire, pour cela différentes étapes ont été indispensables. En premier lieu, l'obtention des plasmides recombinants possédant le gène de la protéine étudiée était indispensable. Ils ont été obtenus par des collaborations (dans le cas de HSP60), ou créés par manipulation génétique (pour HMGB1 et CD93). Dans ce dernier cas, le gène ou la portion de gène est amplifié par PCR puis inséré dans un plasmide pour obtenir le plasmide recombinant. En second lieu, le plasmide recombinant est transfecté dans une bactérie qui assure la production de la protéine recombinante. Il faut noter que la production de protéine est soumise à un promoteur sous l'induction de l'IPTG (isopropyl beta-D-thiogalactoside).

La bactérie transfectée est ensuite lysée par l'intermédiaire d'un tampon de lyse et subit une sonication, qui dégrade également l'ADN de celle-ci. Après centrifugation, la protéine est purifiée des autres constituants de la bactérie grâce à une colonne d'affinité. Différentes étapes de purification supplémentaires pour éliminer les impuretés comme l'ADN en utilisant de la DNase I, ou le LPS en utilisant du triton X-114 sont effectuées.

La quantité de protéines est mesurée grâce à la technique de BCA. Les techniques de LAL assay ou de « HEK-Blue™ LPS Detection Kit2 » de chez InvivoGen, nous ont permis de vérifier que les extraits protéiques ont bien été débarrassés de toute trace de LPS. La migration sur un gel d'agarose et la coloration au du bromure d'éthidium ou au GelRed, a permis d'apprécier les contaminations éventuelles par des acides nucléiques. La présence de la protéine d'intérêt ainsi que les protéines contaminantes sont appréciées sur gel SDS-PAGE et visualisées par une coloration au bleu de Coomassie et un western blot.

Une fois l'ensemble de ces molécules purifiées (LPS, HSP60, HMGB1 et CTLD de CD93), leurs propriétés inflammatoires ainsi que les récepteurs impliqués ont été étudiés :

- La sécrétion de cytokines inflammatoires (MCP-1, TNF- α , IL-6) a été mesurée par ELISA

- L'activation des voies de signalisation NF- κ B et AP-1 a été mesurée grâce à des lignées cellulaires génétiquement modifiées pour sécréter la phosphatase alcaline (SEAP, Secreted Alkaline Phosphatase) sous la dépendance de l'activité des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1. L'exposition à un stimulus induit l'activation de la voie de signalisation sous la dépendance de NF- κ B ou AP-1. La présence de SEAP dans le milieu de culture est mise en évidence grâce au réactif de détection QUANTI-Blue™.
- Les récepteurs impliqués ont été étudiés grâce à l'utilisation d'anticorps bloquants, ou de lignées cellulaires reportrices pour les TLR. Ces lignées cellulaires sont conçues pour fournir une méthode rapide, sensible et fiable pour cribler et valider des agonistes ou antagonistes spécifiques de TLR.
- L'interaction entre CD93 et ses ligands a été analysée par dosage immuno-enzymatique sur support solide (« ELISA interaction »). La protéine CD93 ou son ligand sont fixés sur une plaque, puis l'autre protéine est incubée sur la plaque. La révélation se fait grâce à un anticorps dirigé contre la deuxième protéine non fixée, et puis un anticorps secondaire avec la HRP (horseradish peroxydase). Cette interaction est également analysée par fluorescence, en mesurant l'extinction de la fluorescence intrinsèque du tryptophane, ou des molécules couplées à la FITC. Nous avons également mis en place des techniques d'immuno-précipitation et de pull-down pour étudier ces interactions.

IV. Résultats

1. Etude 1: *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides act via TLR4 to induce a differential response in human and mouse models.

Article en révision

Introduction:

Les LPS sont des composants moléculaires de la paroi des bactéries à gram-négatif. La structure des LPS varie en fonction des bactéries. TLR4 est le principal récepteur connu pour le LPS. Néanmoins certains LPS, tel que celui de *Porphyromonas gingivalis*, peuvent se lier à TLR2. La liaison du LPS à son récepteur induit une cascade de signalisation impliquant la voie NF- κ B, activant la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, MCP-1, et TNF- α). Le but de cette partie est d'étudier les propriétés inflammatoires de deux souches de LPS en fonction de leur degré de purification. L'étude des récepteurs de LPS impliqués dans cette réponse inflammatoire a également été effectuée.

Méthodologie:

- Exploration de la réponse inflammatoire de différents modèles cellulaires stimulés par différentes souches de LPS. Pour cela nous mesurons la production de cytokines inflammatoires par la technique ELISA. Puis, l'activation de la voie NF- κ B par mesure de l'activité NF- κ B/SEAP est analysée.
- Exploration des récepteurs impliqués dans la reconnaissance des différentes souches de LPS. Pour cela nous étudions l'activation des récepteurs TLR2 et TLR4 dans les cellules reportrices en mesurant l'activité NF- κ B/SEAP.
- Exploration de la réponse inflammatoire de souris par les différentes souches de LPS. Pour cela nous mesurons la quantité de cytokines inflammatoires dans le sang des souris par ELISA.
- Exploration de la réponse inflammatoire de sang total humain par les différentes souches de LPS. Pour cela la mesure de la production de cytokines inflammatoires dans le sang humain par ELISA est effectuée.
- Exploration de l'activité endotoxine des différentes souches de LPS par la technique de LAL assay.

Résultats:

Nous avons mis en évidence que le LPS de *Porphyromonas gingivalis* avait des propriétés inflammatoires beaucoup plus faibles que le LPS de la bactérie *Escherichia coli*. Nous avons également montré que le LPS de *Porphyromonas gingivalis* dans sa forme standard était capable d'induire une réponse inflammatoire chez la souris et également chez l'homme, et ceci via les récepteurs TLR2 et TLR4, alors que dans sa forme ultra-pure le LPS de *Porphyromonas gingivalis* interagit uniquement avec le TLR4. De plus cette forme ultra-pure n'est pas capable d'induire une forte inflammation chez la souris, chez l'homme en revanche oui.

Conclusion:

Ces résultats nous montrent que le degré de pureté de la préparation du LPS de *Porphyromonas gingivalis* influence les récepteurs impliqués dans la réponse inflammatoire. De plus, l'espèce étudiée influence également la réponse inflammatoire, la souris est moins efficace à répondre au LPS ultra-pur de *Porphyromonas gingivalis*.

Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharides act via TLR4 to induce a differential response in human and mouse models.

Brice Nativel¹, David Couret^{1,2}, Olivier Meilhac¹, Christian Lefebvre d'Hellencourt¹, Wildriss Viranaïcken^{3b*} and Christine Robert Da Silva^{1b*}.

¹ Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète athérombose Thérapies Réunion Océan Indien (DÉTROI), Saint-Denis de La Réunion, France

² CHU de La Réunion, Unité de soins intensifs neurologiques, Saint Pierre de La Réunion, France.

³ Université de La Réunion, CNRS UMR9192, INSERM U1187, IRD UMR249, Unité Mixte Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), Plateforme Technologique CYROI, Sainte-Clotilde, La Réunion, France.

^b Senior co-authorship

* To whom correspondence should be addressed: Laboratoire PIMIT, Université de La Réunion, plateforme CYROI, 2, rue Maxime Rivière, 97490 Sainte-Clotilde, La Réunion, France. Telephone: +262 262 93 88 29 or Laboratoire DÉTROI, Université de La Réunion, plateforme CYROI, 2, rue Maxime Rivière, 97490 Sainte-Clotilde, La Réunion, France. Telephone: +262 262 93 88 00.

Email addresses: wildriss.viranaïcken@univ-reunion.fr; christine.robert@univ-reunion.fr

Abstract

Porphyromonas gingivalis is a key bacterium in chronic periodontitis which is associated with several chronic inflammatory diseases. Lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis* (*Pg* LPS) are able to stimulate pro-inflammatory cytokine secretion and represent an important virulence factor in periodontal disease. *Pg* LPS can activate different cell types via the production of pro-inflammatory cytokines. The major receptor for *Pg* LPS is reported to be TLR2 contrasting with the well-studied TLR4 receptor for *E. coli* LPS; this observation remains controversial as lipoproteins can be present in some LPS preparations, thus TLR2 can be challenge with this contaminant. In the present work, we aimed at determining whether TLR4 and/or TLR2 mediate *Pg* LPS pro-inflammatory activity using commercially available *Pg* LPS with different grades of purity. We first showed that *Pg* LPS act exclusively through TLR4 and second that a differential recognition occurs between mouse and human TLR4-CD14-MD2 for *Pg* LPS. Since mice are widely used as a model to understand involvement of *Pg* and *Pg* LPS in inflammatory diseases and pathologies, we examined the pro-inflammatory properties of *Pg* LPS in mice or mouse cell lines challenged with *Pg* LPS with different purification grade. Altogether, our results suggest that *Pg* LPS activity is mediated through TLR4 and weakly induces pro-inflammatory cytokines secretion in mouse models. Caution should be taken when interpreting data in mouse systems exposed to *Pg* or *Pg* LPS.

Key words: Lipopolysaccharides, *Porphyromonas gingivalis*, Cytokines, TLR4, NF- κ B, Human, Mouse

Abbreviation list

PRR: Pattern Recognition Receptor

PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern

LPS: Lipopolysaccharide

TLR: Toll Like Receptor

TLR2: Toll-Like Receptor 2

TLR4: Toll-Like Receptor 4

NF- κ B: Nuclear Factor kappa B

CD14: Cluster of Differentiation 14

MD2: Myeloid Differentiation 2

Ec LPS: Lipopolysaccharide from *Escherichia Coli*

Pg LPS: Lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*

UP *Ec* LPS: Ultrapure lipopolysaccharide from *Escherichia coli*

UP *Pg* LPS: Ultrapure lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*

STD *Pg* LPS: Standard lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

TNF- α : Tumor Necrosis Factor α

IL-6: Interleukine 6

MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein 1

LAL: Limulus Amebocyte Lysate

PMA: Phorbol 12-Myristate 13-Acetate

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

FBS: Fetal Bovine Serum

SEAP: Secreted Alkaline Phosphatase

1. Introduction

Periodontal disease is a very frequent chronic infectious disease characterized by the infiltration of inflammatory cells within the gum (1). *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) is a gram-negative bacterium, involved in the development of chronic periodontitis (2,3). *Pg* induces the production of pro-inflammatory cytokines by human gingival fibroblasts (4) and macrophages (5,6) that may lead to a systemic chronic inflammation. Periodontitis has been associated with several chronic diseases such as atherosclerosis (7,8). Intact bacteria or bacterial components such as lipopolysaccharides (LPS) may translocate into the blood stream and reach different tissues including the vascular wall (9). Both in vitro and in vivo data suggest that exposure to *Pg* induces an inflammatory response of endothelial and other vascular cells characterized by the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines leading to the recruitment and activation of monocytes/macrophages within the lesions (10,11). Similarly, periodontal pathogens or LPS may reach other tissues such as brain or adipose tissue. Periodontitis has been linked to neuro-inflammation (12) and *Pg* LPS was suggested to be a mediator of inflammatory signals between periodontitis site and the brain (13). Periodontitis contributes to adipose tissue inflammation and promote insulin resistance (14).

Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) induce innate immune responses through Toll like Receptors (TLRs). TLRs are expressed not only by immune cells (macrophages, dendritic cells, B cells, T cells) but also by non-immune cells (fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and adipocyte cells) (15). LPS are among the major PAMPs, LPS from *Escherichia coli* (*Ec* LPS) being the most characterized. TLR4 is involved in the recognition of lipopolysaccharide (LPS) (16,17). *Ec* LPS target TLR4 and activate the NF- κ B signaling pathway leading to the secretion of inflammatory cytokines such as Tumor Necrosis Factor α (TNF- α), Interleukin 6 (IL-6) and chemokines such as Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) (18). TLR2 ligands from gram-negative bacteria include peptidoglycan and lipoproteins.

Pg LPS exhibit an activity in C3H/HeJ mice, which are deficient for TLR4, suggesting that this effect was mediated by TLR2 (19,20). However, both structural and functional studies of synthetic lipid A of *Pg* LPS have revealed that they are able to activate cells through TLR4 (21); the TLR2 activity of *Pg* LPS may be attributed to a contaminant lipoprotein (22). Consequently, the interaction of *Pg* LPS with TLR2 or TLR4 remains controversial (23).

In this work, we aimed at determining whether TLR4 and/or TLR2 are responsible for *Pg* LPS pro-inflammatory activity. We also examined the pro-inflammatory properties of *Pg* LPS in mouse versus human models. *Pg* LPS appeared to mediate pro-inflammatory signaling exclusively through TLR4, whereas TLR2-dependent pathway was related to the presence of contaminants in LPS preparation. Finally we observed that *Pg* LPS only induced a weak activation of mouse relative to human TLR4. Taken together, these results suggest that experiments with mice and mouse cells to elicit *Pg* or *Pg* LPS involvement in pathology or signaling pathways should be taken with caution and cannot be translated to humans.

2. Material and methods

2.1. Drug, reagents and cell lines

Ultrapure *P. gingivalis* LPS (UP *Pg* LPS) (cat: tlr1-pgpls, lot: ?????) containing penta-acylated and tetra-acylated lipid A structures were purified from the strain ATCC 33227 using previously described methods (24,25) (Invivogen, personal communication). Standard *P. gingivalis* LPS (STD *Pg* LPS) (cat: tlr1-pgpls, lot: LPG 37-01) and Ultrapure lipopolysaccharide from *E. coli* O111:B4 (UP *Ec* LPS) (cat: tlr1-3pelps, lot: L3P 37-02) were from InvivoGen (France).

RAW264.7-Blue (RAW-Blue), HEK-Blue hTLR2-hCD14 (HEK-Blue hTLR2), HEK-Blue Null, HEK-Blue hTLR4-hCD14-hMD2 (HEK-Blue hTLR4), and HEK-Blue mTLR4-mCD14-mMD2 (HEK-Blue mTLR4) were from InvivoGen (France). BV2 was obtained as described before (25). J774.1 (TIB-67), 3T3-L1 (CL-173), bEnd.3 (CRL-2299) and RAW264.7 (TIB-71) were from ATCC (USA). TNF- α was from R&D systems (USA). Except when indicated, all other reagents were from Sigma-Aldrich (France).

2.2. Cell culture and treatment

All cell lines were cultured at 37°C with 5% CO₂ in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) supplemented with 2 mmol.L⁻¹ L-Glutamine, 1 mmol.L⁻¹ sodium pyruvate, 100 U.mL⁻¹ penicillin, 0.1 mg.mL⁻¹ streptomycin and 0.5 mg.mL⁻¹ amphotericin B (PAN Biotech, Germany).

Cells were plated at a density of 5.10⁵ cell.mL⁻¹ in a 96-well plate. For treatment, the medium was replaced by complete media with different LPS at 0 to 10 000 ng.mL⁻¹, for 20h. The culture media were collected and used for cytokine measurement directly by ELISA.

2.3. Human whole blood cell assay

Blood samples were obtained from 4 healthy male and female volunteers without medication, after informed consent. Blood was sampled in lithium heparin-containing tubes, diluted 1:10 with 100 μ L RPMI medium without FBS in a 96-well plate with different concentrations of LPS (from 0 to 10 000 ng.mL⁻¹) for 20h. The plate was then centrifuged at 1200g for 5 min, and the supernatant was collected for the cytokine quantification by ELISA.

2.4. Mouse stimulation

All procedures were performed in accordance with guidelines for care and use of laboratory animals, approved by the ethics committee of CYROI (A974001). C57BL/6 mice purchased from Charles River Laboratory (France) were fed with a standard diet ad libitum (26). Animals were randomly assigned to 1 of 4 groups (n=3 per group, 2 males and 1 female, 10-week old, approximately 25 g). Mice were anesthetized with Isoflurane[®], and

their body temperature was maintained at 37°C with a heating pad. Analgesia was controlled by subcutaneous injection of Buprenorphine®. The throat was shaved, disinfected and a 1–1.5 cm medio-lateral cervicotomy incision was made. The adjacent connective tissue was carefully stretched apart, exposing the external jugular vein. A tail vein catheter with a microinjection 30-gauge needle was used for intravenous injection. LPS solution was diluted with PBS at 100 µg.kg⁻¹, and the injection volume was adjusted to 0.1 mL. After removing the needle and verifying the absence of bleeding, the skin was then sutured. The whole procedure took less than 5 min. After recovery from anesthesia, the animals were observed and moved to individual cages with water, food and refinement for 3.5 hours. After this observational period, mice were anesthetized by Isoflurane® and euthanized by intracardiac puncture. Blood was drawn on heparin tubes, centrifuged at 4000g for 15 min and stored at -20°C.

2.5. ELISA/Cytokine assay

TNF-α, MCP-1 and IL-6 concentrations in supernatants of unfractionated whole media of cell culture or in the mouse serum were assessed using ELISA kits (eBiosciences, Austria), following the manufacturer's protocols. Human TNF-α (cat: 88-7346) sensitivity 4 pg.mL⁻¹. Human IL-6 (cat: 88-7066) sensitivity 2 pg.mL⁻¹. Human MCP-1 (cat: 88-7399) sensitivity 7 pg.mL⁻¹. Mouse TNF-α (cat: 88-7324) sensitivity 8 pg.mL⁻¹. Mouse IL-6 (cat: 88-7064) sensitivity 4 pg.mL⁻¹. Mouse MCP-1 (cat: 88-7391) sensitivity 15 pg.mL⁻¹. The optical absorbance at 450 nm and the background at 570 nm were measured with a microplate reader (TECAN Sunrise, Austria). The final concentrations were determined using a standard curve.

2.6. Statistical analysis

All values are expressed as mean +/-SEM resulting from at least 3 biological independent experiments. Comparisons between different treatments have been analyzed by one-way ANOVA test with Turkey post-test or two-way ANOVA test followed by a Dunnett's test. Values of p<0.05 were considered statistically significant. All statistical tests were done using the software Graph-Pad Prism version 6.01 (San Diego, CA, USA). Degrees of significance are indicated in the figure captions as follow: * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; ns = not significant.

3. Results

3.1. Ultrapure *Pg* LPS induces cell activation via TLR4 but not TLR2.

TLR4 seems to be involved in the response to most of LPS (27). However, both TLR2 and TLR4 have been reported to be involved in the recognition of *Pg* LPS (28,29). Since purification methods to obtain LPS are based on the lipid nature of this PAMP, lipoproteins, which are known to be TLR2 ligands, may co-purify with LPS. Ultrapure LPS preparations, which consist of lipoprotein removal by enzymatic digestion after classical purification step, are commercially available. Using both standard and ultrapure *Pg* LPS, we tested TLR2 and/or TLR4 activation pathways. HEK293 cells over-expressing human TLR2/CD14 (HEK-Blue hTLR2) or

TLR4/MD2/CD14 (HEK-Blue hTLR4) which stably contain NF- κ B/AP1-SEAP reporter gene were stimulated with different doses of standard *Pg* LPS (STD *Pg* LPS), ultrapure *Pg* LPS (UP *Pg* LPS) and ultrapure *E. coli* LPS (UP *Ec* LPS). These cell lines were incubated with increasing concentrations of LPS and TLR2 or TLR4 activation was monitored via NF- κ B/SEAP activity using Quanti-blue assay. Only STD *Pg* LPS significantly activated HEK-Blue hTLR2 cells (Figure 1A). All three types of LPS were able to induce hTLR4-signaling pathway but UP *Pg* LPS induced less activation than the others (Figure 1B). Of note, when both TLR2 and TLR4 were lacking (HEK-Blue Null), no activation was observed, whatever the type of LPS used (Figure 1C).

3.2. Mouse TLR4-MD2-CD14 complex is low competent to recognize *Pg* LPS

Mice or mouse cell lines are widely used to evaluate the biological effects of *Pg* or *Pg* LPS. We thus tested the capacity of mouse TLR4 to mediate *Pg* LPS response. HEK-Blue mouse TLR4 cells, which express TLR4/MD2/CD14 complex of mouse origin, were treated as described above. In contrast to HEK expressing human TLRs, a differential response dependent on the origin and the purity of LPS was observed (Figure 1D). The maximal response was obtained with UP *Ec* LPS whereas 50% and 70% loss of activity were observed with STD *Pg* LPS and UP *Pg* LPS, respectively. Mouse TLR4 seems to be less capable of recognizing *Pg* LPS relative to its human counterpart. The endotoxic capacity of the three types of LPS using LAL assay was evaluated (Figure S1). Surprisingly, the endotoxic capacity of UP *Pg* LPS was 250-fold higher than that of STD *Pg* LPS. This contrasts with the higher cell response obtained for STD *Pg* LPS than that of UP *Pg* LPS in both mouse and human TLR4-expressing HEK cells (Figure 1C and D). This last observation supports a potential synergistic effect of lipoprotein and *Pg* LPS for mediating TLR4 receptor response.

3.3. *Pg* LPS induces a low pro-inflammatory response in mice

In order to confirm that TLR4/MD2/CD14 could be less efficient to bind to *Pg* LPS in mice than in humans, we tested the pro-inflammatory action of *Pg* LPS *in vivo*, in mice. Mice were intravenously injected with a single dose of LPS at 100 μ g.kg⁻¹. Serum Blood was collected after 3.5 hours and quantification of TNF- α , IL-6 and MCP-1 proteins was performed by ELISA (Figure 2). Unlike for UP *Ec* LPS, only a weak response reflected by low cytokine production was obtained by STD *Pg* LPS injection. UP *Pg* LPS injection did not produce any significant difference in the cytokine production versus saline-injected mice.

3.4. *Pg* LPS induces activation of human blood cells

Since the above-mentioned results suggest that *Pg* LPS recognition and subsequent inflammatory response is specie-dependent (mouse vs human), we performed human whole blood assay to test *ex-vivo*, the human response to *Pg* LPS. Whole blood cells obtained from human donors have been treated with different concentrations of the three LPS for 20h (Figure 3). Plasma IL-6, TNF- α , MCP-1 concentrations were measured by ELISA after centrifugation. Stimulation with all 3 LPS resulted in an enhanced secretion of TNF- α , IL-6, and MCP-1 by human whole blood cells, in a dose-dependent manner. No difference was observed between

among the three types of LPS. The human leukocyte inflammatory response seems to be stronger to *Pg* LPS compare to mouse leukocytes.

3.5. Ultra-pure *Pg* LPS is unable to induce cytokine secretion by murine macrophages

To validate the weak response of mouse leukocytes to *Pg* LPS, we quantified the production of pro-inflammatory cytokines induced by *Pg* LPS by two mouse macrophage cell lines: RAW264.7 (Figure 4A-C) and J774.1 (Figure 4D-F).

STD *Pg* LPS induced a dose-dependent secretion of IL-6 (Figure 4A and 4D), TNF- α (Figure 4B and 4E), and MCP-1 (Figure 4C and 4F) in these two cell lines but to a lesser extent than UP *Ec* LPS. Interestingly, UP *Pg* LPS was not able to induce any production of pro-inflammatory cytokines, even at the highest dose tested.

3.6. Ultra-pure *Pg* LPS induces a weak inflammatory response in other murine cell lines: microglial cells, pre-adipocytes and endothelial cells.

Since *Pg* LPS can be involved as a mediator of neuro-inflammation (17,30), similar experiments were performed using the mouse microglial cell line BV2 (Figure 5). As observed with macrophage cell lines, UP *Ec* LPS induced a marked pro-inflammatory cytokine secretion. The concentration of secreted IL-6 (Figure 5A) was not significantly different from the basal levels after stimulation with both STD and UP *Pg* LPS. In contrast, TNF- α (Figure 5B) and MCP-1 (Figure 5C) secretion was clearly stimulated by STD *Pg* LPS but only weakly by UP *Pg* LPS when used at high doses.

Even if immune phagocytic cells are specialized to senses PAMPs, other cell types are also sensitive to these factors. For example, pre-adipocytes and adipocytes express functional TLR2 and TLR4 (31–33). Mouse pre-adipocyte cell line 3T3L1 (Figure 6A and 6B) was stimulated with increasing concentrations of the different LPS and cytokine secretion was then measured by ELISA. UP *Pg* LPS induced a weak, but statistically significant, dose-dependent cytokine secretion of IL-6 (Figure 6A) and MCP-1 (Figure 6B). As shown above, UP *Pg* LPS was much less effective than STD *Pg* LPS in stimulating the secretion of pro-inflammatory cytokine in this cell line.

Endothelial cells are also able to recognize LPS and elicit a pro-inflammatory pattern (34). To test capacity of mouse endothelial cells in sensing *Pg* LPS, we stimulated brain endothelial mouse cell line, Bend3, with different LPS and then measured cytokine secretion by ELISA. UP *Pg* LPS neither induced IL-6 nor MCP-1 secretion (Figure 6C and 6D). STD *Pg* LPS was able to induce the secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and MCP-1) in this cell line but to lesser extent than UP *Ec* LPS, used as a positive control. These results suggest that mouse non immune cell lines, such as pre-adipocytes and endothelial cells, weakly recognize and respond to *Pg* LPS.

4 Discussion

Pg is a gram negative bacterium associated with the pathogenesis of periodontitis (35). Periodontitis has been linked to numerous low grade inflammatory diseases such as obesity (14,36), atherosclerosis (10,11,37), and neuro-inflammatory diseases (Alzheimer) (12,13,38). LPS are the major inflammatory mediators for gram negative bacteria. *Pg* LPS are able to elicit cell inflammatory responses via interaction with TLRs (39). The lipid A is responsible for LPS binding to MD2, the resulting complex then binds to TLR4 and triggers a signaling cascade leading to the production and secretion of pro-inflammatory cytokines. Even if TLR4 is described as the canonic receptor for LPS, *Pg* LPS was reported to induce a pro-inflammatory in C3H/HeJ mice which are deficient for TLR4. TLR2-CD14 seems to be the major complex involved in the recognition of *Pg* LPS (19,20). Since synthetic *Pg* lipid A trans-activated cell through TLR4 (21), *Pg* LPS TLR2 binding and subsequent cell activation was attributed to contaminant bacterial lipoproteins (22). A study suggests that *Pg* LPS can interact with both (23).

LPS extraction and purification are based on organic extraction using phenol (40) that may lead to lipoproteins co-purification. Ultrapure *Pg* LPS, which is commercially available, is obtained after lipoprotein removal from the LPS preparation by an additional enzymatic digestion step. Using this ultrapure *Pg* LPS, we tested whether TLR2 and/or TLR4 were involved in *Pg* LPS recognition.

We used HEK 293 cells which overexpress hTLR2, hTLR4 or mTLR4 with MD2 and CD14 co-receptors treated with UP *Ec* LPS, STD *Pg* LPS and UP *Pg* LPS (Figure 1). Whereas hTLR4 showed the same sensitivity towards the different LPS, neither UP *Pg* LPS nor UP *Ec* LPS were able to activate TLR2. Since it has been shown that the signaling via TLR2 could be due to PG1828, a lipoprotein synthesized by *Pg* (41,42), the NF- κ B activation observed in the presence of STD *Pg* LPS could be attributed to contamination by lipoprotein contaminations.

We also observed that STD *Pg* LPS is a stronger NF- κ B activator than UP *Pg* LPS in both human and mouse TLR4 response. Using LAL assay, endotoxin activity of UP *Pg* LPS was 250-fold higher than STD *Pg* LPS. Endotoxin activity measured by LAL assay can be different from the pro-inflammatory activity (27). The extent of activation of the Limulus cascade cannot be directly correlated with the pyrogenic potential for humans. Taken together these observations suggest that lipoproteins present in STD *Pg* LPS may potentiate *Pg* LPS action through TLR4. Nevertheless, UP *Pg* LPS was much more efficient in the human TLR4/MD2/CD14 system relative to that observed for the mouse complex. This result was confirmed using human blood assay and in vivo, by challenging mice with *Pg* LPS (Figure 2 and 3). Of note, in our hands, the mouse whole blood assay did not produce any inflammatory response even with the positive control, *Ec* LPS (data not shown).

We show here a differential recognition of *Pg* LPS by human and mouse cells. This differential recognition could be due to the structural heterogeneity between *Pg* LPS and *Ec* LPS, mainly on the lipid A structure (27). *Pg* contains several different structures for the lipid A (23,43–45). Different lipid A can also be obtained according to the extraction procedure (23). It has been reported that a lipid A species with an m/z=1690 were the dominant structures found among multiple lipid A species from *Pg*. This lipid A is a penta-acylated lipid A and is known to induce inflammation, whereas the other forms do not (46,47). Interestingly, modification of the hexa-acylated lipid A of *E. coli* to penta-acylated lipid A, showed reduced immunogenicity (48). As UP *Ec* LPS induced the same NF- κ B activity with mouse and human TLR4/MD2/CD14, we can hypothesize that mouse MD2 may have a better affinity for the hexa-acylated lipid A relative to penta-acylated form. Thus, mouse MD2 affinity for LPS may be more sensitive to acylation levels of lipid A as compared to human MD2 (Figure 7).

Mice or mouse cell models are widely used to investigate the role of *Pg* and *Pg* LPS in different diseases. We clearly demonstrated that *Pg* LPS do not or weakly activate mouse cells. The difference between mouse and human cell models to be activated by *Pg* LPS could be related to the expression levels and differential affinity of MD2 to penta-acylated *Pg* lipid A. Altogether our results show that *Pg* LPS act through TLR4 and that mouse cell are less sensitive to *Pg* LPS relative to human cells. These results highlight that the use of mouse models for testing *Pg* and *Pg* LPS in different pathological situations may dangerously underestimate the role of these bacteria and associated endotoxins in human pathology.

Author contributions

B.N., O.M., C.RDS., and W.V. designed research; B.N.,W.V. performed research; B.N. and D.C. performed the animal experiment, B.N., W.V. contributed new reagents/analytic tools; B.N., , O.M., C.LH., C.RDS.,and W.V. analyzed data; B.N., O.M.,C.RDS., and W.V. wrote the paper.

Acknowledgements

We thank Pr. Philippe Gasque and Philippe Desprès for helpful discussion. We thank the members of the CYROI animal facility for their advices.

This work was supported by Federation BioST of University of La Reunion and a grant from Philancia Fondation. BN hold a fellowship (DIRE 20131515) from Regional council of Reunion Island.

References

1. El-Shinnawi U, Soory M. Associations between periodontitis and systemic inflammatory diseases: response to treatment. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.* sept 2013;7(3):169- 88.
2. Guglielmetti MR, Rosa EF, Lourenção DS, Inoue G, Gomes EF, De Micheli G, et al. Detection and quantification of periodontal pathogens in smokers and never-smokers with chronic periodontitis by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol.* oct 2014;85(10):1450- 7.
3. Al-Hebshi NN, Shuga-Aldin HM, Al-Sharabi AK, Ghandour I. Subgingival periodontal pathogens associated with chronic periodontitis in Yemenis. *BMC Oral Health.* 2014;14:13.
4. Imatani T, Kato T, Okuda K. Production of inflammatory cytokines by human gingival fibroblasts stimulated by cell-surface preparations of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol.* avr 2001;16(2):65- 72.
5. Lam RS, O'Brien-Simpson NM, Holden JA, Lenzo JC, Fong SB, Reynolds EC. Unprimed, M1 and M2 Macrophages Differentially Interact with *Porphyromonas gingivalis*. *PloS One.* 2016;11(7):e0158629.
6. Hung S-L, Lee N-G, Chang L-Y, Chen Y-T, Lai Y-L. Stimulatory effects of glucose and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on the secretion of inflammatory mediators from human macrophages. *J Periodontol.* janv 2014;85(1):140- 9.
7. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, et al. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res.* 2014;2014:476068.
8. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Links between atherosclerotic and periodontal disease. *Exp Mol Pathol.* févr 2016;100(1):220- 35.
9. Bein A, Zilbershtein A, Golosovsky M, Davidov D, Schwartz B. LPS Induces Hyper-Permeability of Intestinal Epithelial Cells. *J Cell Physiol.* févr 2017;232(2):381- 90.
10. Huang C-Y, Shih C-M, Tsao N-W, Lin Y-W, Shih C-C, Chiang K-H, et al. The GroEL protein of *Porphyromonas gingivalis* regulates atherogenic phenomena in endothelial cells mediated by upregulating toll-like receptor 4 expression. *Am J Transl Res.* 2016;8(2):384- 404.
11. Li L, Bian T, Lyu J, Cui D, Lei L, Yan F. Human β -defensin-3 alleviates the progression of atherosclerosis accelerated by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Int Immunopharmacol.* sept 2016;38:204- 13.
12. Wu Z, Nakanishi H. Connection between periodontitis and Alzheimer's disease: possible roles of microglia and leptomeningeal cells. *J Pharmacol Sci.* 2014;126(1):8- 13.
13. Liu Y, Wu Z, Zhang X, Ni J, Yu W, Zhou Y, et al. Leptomeningeal cells transduce peripheral macrophages inflammatory signal to microglia in reponse to *Porphyromonas gingivalis* LPS. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:407562.
14. Huang Y, Zeng J, Chen G, Xie X, Guo W, Tian W. Periodontitis contributes to adipose tissue inflammation through the NF- κ B, JNK and ERK pathways to promote insulin resistance in a rat model. *Microbes Infect.* 23 août 2016;
15. Vaure C, Liu Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol.* 2014;5:316.
16. Park BS, Lee J-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med.* 2013;45:e66.
17. Ntoufa S, Vilia MG, Stamatopoulos K, Ghia P, Muzio M. Toll-like receptors signaling: A complex network for NF- κ B activation in B-cell lymphoid malignancies. *Semin Cancer Biol.* 9 juill 2016;
18. Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* mai 2008;42(2):145- 51.

19. Kirikae T, Nitta T, Kirikae F, Suda Y, Kusumoto S, Qureshi N, et al. Lipopolysaccharides (LPS) of oral black-pigmented bacteria induce tumor necrosis factor production by LPS-refractory C3H/HeJ macrophages in a way different from that of Salmonella LPS. *Infect Immun.* avr 1999;67(4):1736- 42.
20. Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, et al. Signaling by Toll-Like Receptor 2 and 4 Agonists Results in Differential Gene Expression in Murine Macrophages. *Infect Immun.* 3 janv 2001;69(3):1477- 82.
21. Ogawa T, Asai Y, Makimura Y, Tamai R. Chemical structure and immunobiological activity of Porphyromonas gingivalis lipid A. *Front Biosci J Virtual Libr.* 2007;12:3795- 812.
22. Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 juill 2000;165(2):618- 22.
23. Darveau RP, Pham T-TT, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, et al. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun.* sept 2004;72(9):5041 - 51.
24. Tapping RI, Akashi S, Miyake K, Godowski PJ, Tobias PS. Toll-Like Receptor 4, But Not Toll-Like Receptor 2, Is a Signaling Receptor for Escherichia and Salmonella Lipopolysaccharides. *J Immunol.* 15 nov 2000;165(10):5780- 7.
25. Awada R, Saulnier-Blache JS, Grès S, Bourdon E, Rondeau P, Parimisetty A, et al. Autotaxin downregulates LPS-induced microglia activation and pro-inflammatory cytokines production. *J Cell Biochem.* déc 2014;115(12):2123- 32.
26. Richmond J. Refinement, reduction, and replacement of animal use for regulatory testing: future improvements and implementation within the regulatory framework. *ILAR J Natl Res Council Inst Lab Anim Resour.* 2002;43 Suppl:S63-68.
27. Dehus O, Hartung T, Hermann C. Endotoxin evaluation of eleven lipopolysaccharides by whole blood assay does not always correlate with Limulus amebocyte lysate assay. *J Endotoxin Res.* 2006;12(3):171 - 80.
28. Bainbridge BW, Darveau RP. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide: an unusual pattern recognition receptor ligand for the innate host defense system. *Acta Odontol Scand.* 1 janv 2001;59(3):131- 8.
29. Kassem A, Henning P, Lundberg P, Souza PPC, Lindholm C, Lerner UH. Porphyromonas gingivalis Stimulates Bone Resorption by Enhancing RANKL (Receptor Activator of NF-κB Ligand) through Activation of Toll-like Receptor 2 in Osteoblasts. *J Biol Chem.* 14 août 2015;290(33):20147- 58.
30. Miyake K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. *Int Immunopharmacol.* janv 2003;3(1):119- 28.
31. Bès-Houtmann S, Roche R, Hoareau L, Gonthier M-P, Festy F, Caillens H, et al. Presence of functional TLR2 and TLR4 on human adipocytes. *Histochem Cell Biol.* févr 2007;127(2):131 - 7.
32. Nativel B, Marimoutou M, Thon-Hon VG, Gunasekaran MK, Andries J, Stanislas G, et al. Soluble HMGB1 is a novel adipokine stimulating IL-6 secretion through RAGE receptor in SW872 preadipocyte cell line: contribution to chronic inflammation in fat tissue. *PLoS One.* 2013;8(9):e76039.
33. Davis JE, Gabler NK, Walker-Daniels J, Spurlock ME. The c-Jun N-terminal kinase mediates the induction of oxidative stress and insulin resistance by palmitate and toll-like receptor 2 and 4 ligands in 3T3-L1 adipocytes. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab.* juill 2009;41(7):523- 30.
34. Dauphinee SM, Karsan A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* janv 2006;86(1):9- 22.
35. Condorelli F, Scalia G, Cali G, Rossetti B, Nicoletti G, Lo Bue AM. Isolation of Porphyromonas gingivalis and detection of immunoglobulin A specific to fimbrial antigen in gingival crevicular fluid. *J Clin Microbiol.* août 1998;36(8):2322- 5.
36. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P, et al. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet Lond Engl.* 5 nov 2005;366(9497):1640- 9.

37. Roth GA, Moser B, Roth-Walter F, Giacona MB, Harja E, Papapanou PN, et al. Infection with a periodontal pathogen increases mononuclear cell adhesion to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*. févr 2007;190(2):271- 81.
38. Poole S, Singhrao SK, Kesavalu L, Curtis MA, Crean S. Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *J Alzheimers Dis JAD*. 2013;36(4):665- 77.
39. Gibson FC, Genco CA. Porphyromonas gingivalis mediated periodontal disease and atherosclerosis: disparate diseases with commonalities in pathogenesis through TLRs. *Curr Pharm Des*. 2007;13(36):3665- 75.
40. Westphal O, Lüderitz O, Bister F. Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Z Für Naturforschung B*. 1952;7(3):148-155.
41. Asai Y, Hashimoto M, Fletcher HM, Miyake K, Akira S, Ogawa T. Lipopolysaccharide preparation extracted from Porphyromonas gingivalis lipoprotein-deficient mutant shows a marked decrease in toll-like receptor 2-mediated signaling. *Infect Immun*. avr 2005;73(4):2157- 63.
42. Jain S, Coats SR, Chang AM, Darveau RP. A Novel Class of Lipoprotein Lipase-Sensitive Molecules Mediates Toll-Like Receptor 2 Activation by Porphyromonas gingivalis. *Infect Immun*. avr 2013;81(4):1277- 86.
43. Reife RA, Coats SR, Al-Qutub M, Dixon DM, Braham PA, Billharz RJ, et al. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide lipid A heterogeneity: differential activities of tetra- and penta-acylated lipid A structures on E-selectin expression and TLR4 recognition. *Cell Microbiol*. mai 2006;8(5):857- 68.
44. Herath TDK, Darveau RP, Seneviratne CJ, Wang C-Y, Wang Y, Jin L. Tetra- and penta-acylated lipid A structures of Porphyromonas gingivalis LPS differentially activate TLR4-mediated NF- κ B signal transduction cascade and immunoinflammatory response in human gingival fibroblasts. *PLoS One*. 2013;8(3):e58496.
45. Ogawa T. Chemical structure of lipid A from Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis lipopolysaccharide. *FEBS Lett*. 11 oct 1993;332(1- 2):197- 201.
46. Zhang Y, Gaekwad J, Wolfert MA, Boons G-J. Synthetic tetra-acylated derivatives of lipid A from Porphyromonas gingivalis are antagonists of human TLR4. *Org Biomol Chem*. 21 sept 2008;6(18):3371- 81.
47. Sawada N, Ogawa T, Asai Y, Makimura Y, Sugiyama A. Toll-like receptor 4-dependent recognition of structurally different forms of chemically synthesized lipid As of Porphyromonas gingivalis. *Clin Exp Immunol*. juin 2007;148(3):529- 36.
48. Bäckhed F, Normark S, Schweda EKH, Oscarson S, Richter-Dahlfors A. Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications. *Microbes Infect*. oct 2003;5(12):1057- 63.

Figure legend

Figure 1. NF κ B-AP1/SEAP activity in HEK-Blue cells stimulated with LPS. HEK-Blue Null, HEK-Blue hTLR2, HEK-Blue hTLR4 or HEK-Blue mTLR4 cells were treated with different doses of UP *Ec* LPS, STD *Pg* LPS or UP *Pg* LPS (0 to 10 000 ng.mL⁻¹) for 20h. TNF- α at 10 ng.mL⁻¹ was used as positive control for HEK-Blue Null. SEAP activity in the culture supernatants was measured using Quanti-blue. Comparisons between different treatments have been analyzed by two-way ANOVA test followed by a Dunnett's test. Data are expressed as mean \pm SEM (n=3 per group). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to 0 ng.mL⁻¹ LPS.

Figure 2. Cytokine production in serum of mice stimulated with LPS. Mice were treated with 100 μ L of UP *Ec* LPS, STD *Pg* LPS or UP *Pg* LPS (100 μ g.kg⁻¹) for 3.5h. Control mice received saline. Serum levels of TNF- α , IL-6, and MCP-1 were measured by ELISA. Comparisons between different treatments have been analyzed by one-way ANOVA test with Turkey post-test. Data are expressed as mean \pm SEM (n=3 per group). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 3. Cytokine production in human whole blood cells challenged with LPS. Human whole blood cells were treated with different doses of UP *Ec* LPS, STD *Pg* LPS or UP *Pg* LPS (0 to 10 000 ng.mL⁻¹) for 20h. TNF- α , IL-6, and MCP-1 levels were measured by ELISA in culture supernatants. Comparisons between different treatments have been analyzed by two-way ANOVA test followed by a Dunnett's test. Data are expressed as mean \pm SEM (n=3 per group). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to 0 ng.mL⁻¹ LPS.

Figure 4. Cytokine production in RAW264.7 and J774.1 cells stimulated with LPS. RAW264.7 (Figure 4A-C) and J774.1 (Figure 4D-F) cells were treated with different doses of UP *Ec* LPS, STD *Pg* LPS or UP *Pg* LPS (0 to 10 000 ng.mL⁻¹) for 20h. IL-6 (Figure 4A and 4D), TNF- α (Figure 4B and 4E), and MCP-1 (Figure 4C and 4F) levels were determined by ELISA in culture supernatants. Comparisons between different treatments have been analyzed by two-way ANOVA test followed by a Dunnett's test. Data are expressed as mean \pm SEM (n=3 per group). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to 0 ng.mL⁻¹ LPS.

Figure 5. Cytokine production in BV2 cells stimulated with LPS. BV2 cells were treated with different doses of UP *Ec* LPS, STD *Pg* LPS or UP *Pg* LPS (0 to 10 000 ng.mL⁻¹) for 20h. IL-6, TNF- α , and MCP-1 levels were measured in the culture medium by ELISA. Comparisons between different treatments have been analyzed by two-way ANOVA test followed by a Dunnett's test. Data are expressed as mean \pm SEM (n=3 per group). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to 0 ng.mL⁻¹ LPS.

Figure 6. Cytokine production in 3T3-L1 and bEnd.3 cells stimulated with LPS. 3T3-L1 (Figure 6A-C) and bEnd.3 (Figure 6D-F) cells were treated with different doses of UP *Ec* LPS, STD *Pg* LPS or UP *Pg* LPS (0 to 10 000 ng.mL⁻¹) for 20h. IL-6, TNF- α , and MCP-1 levels were measured in the culture medium by ELISA. Comparisons between different treatments have been analyzed by two-way ANOVA test followed by a Dunnett's test. Data are expressed as mean \pm SEM (n=3 per group). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to 0 ng.mL⁻¹ LPS.

¹) for 20h. TNF- α , IL-6, and MCP-1 concentrations were measured in the culture supernatants by ELISA. Comparisons between different treatments have been analyzed by two-way ANOVA test followed by a Dunnett's test. Data are expressed as mean \pm SEM (n=3 per group). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to 0 ng.mL⁻¹ LPS.

Figure 7. Differential recognition of lipid A on *Pg* LPS and *Ec* LPS. LPS recognition by TLR4 is based on the lipid A structure. Lipid A is different between *Ec* LPS and *Pg* LPS. Lipid A binding to MD2 induced dimerization of TLR4 and then led to the transduction of stimulatory signals and the secretion of pro-inflammatory cytokines. Our result suggests that recognition of lipid A structures by mouse and human TLR4 is different. Hexa-acylated *E. coli* lipid A is recognized as a strong agonist by both mouse and human TLR4, and induced a important production of pro-inflammatory cytokines. Penta-acylated *P. gingivalis* lipid A is recognized as an agonist by human TLR4 through MD2, and induces a production of pro-inflammatory cytokines, whereas it was weakly recognized by mouse MD2 and induces a low production of pro-inflammatory cytokines. Penta-acylated *P. gingivalis* lipid A does not interact with TLR2.

Supplemental figure 1. *Pg* LPS Ultra-pure have a significant endotoxin activity. Endotoxin levels were determined in LPS using a Limulus Amebocyte Lysate (LAL) assay (Hycult biotech, The Netherlands). The assay was performed according to the manufacturer's protocol and measurable levels of LPS were expressed as EU.mL⁻¹. In brief, LPS were incubated for 30 min with LAL reagent at room temperature. Samples were then treated with stabilizer reagents. Endotoxin levels were determined by absorptions at 405 nm with a microplate reader (TECAN Sunrise, Austria). We based our experiment on the internal control dosage of 100 EU.mL⁻¹ of UP *Ec* LPS, which correspond to 100 ng.mL⁻¹ of LPS as described by the supplier. And when we dose the UP *Ec* LPS correspond to we have 85 +/- 8 EU.mL⁻¹. The dosage of STD *Pg* LPS did not show any activity have are next to 2.5 +/- 0.5 EU.mL⁻¹, whereas the dosage of UP *Pg* LPS are 257 +/- 13 EU.mL⁻¹. Comparisons between different treatments have been analyzed by one-way ANOVA test with Turkey post-test. Data are expressed as mean \pm SEM (in triplicate). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

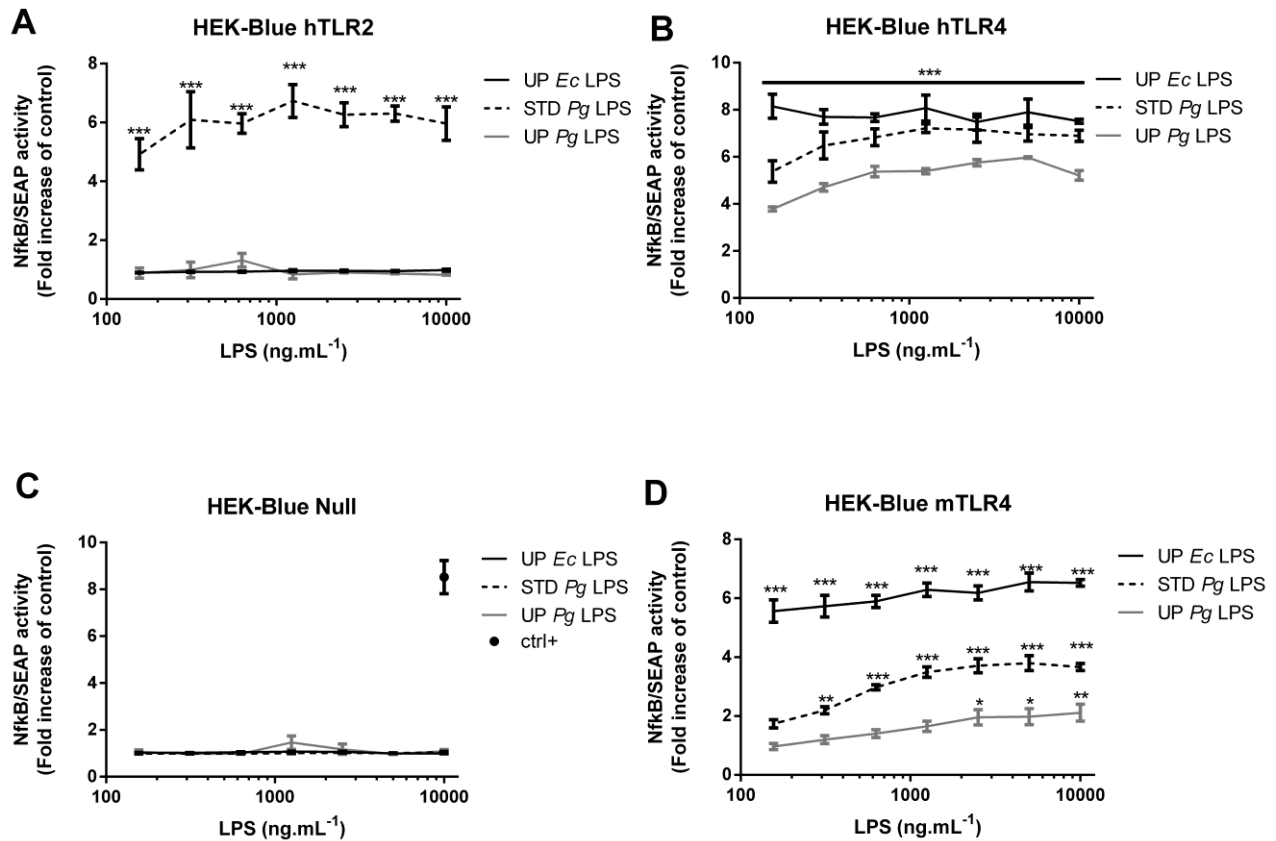


Figure 1. NFκB-AP1/SEAP activity in HEK-Blue cells stimulated with LPS. HEK-Blue Null, HEK-Blue hTLR2, HEK-Blue hTLR4 or HEK-Blue mTLR4 cells were treated with different doses of UP *Ec* LPS, STD *Pg* LPS or UP *Pg* LPS (0 to 10 000 ng.mL⁻¹) for 20h. TNF-α at 10 ng.mL⁻¹ was used as positive control for HEK-Blue Null. SEAP activity in the culture supernatants was measured using Quanti-blue. Comparisons between different treatments have been analyzed by two-way ANOVA test followed by a Dunnett's test. Data are expressed as mean ± SEM (n=3 per group). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to 0 ng.mL⁻¹ LPS.

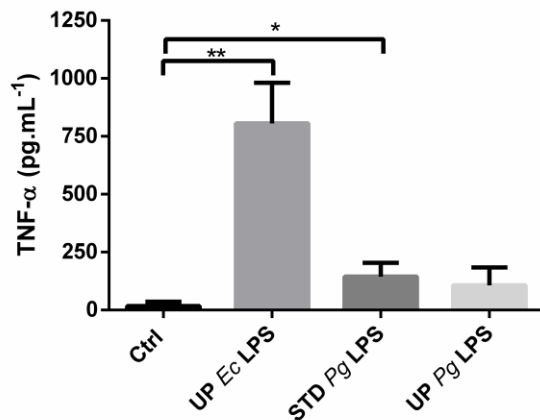
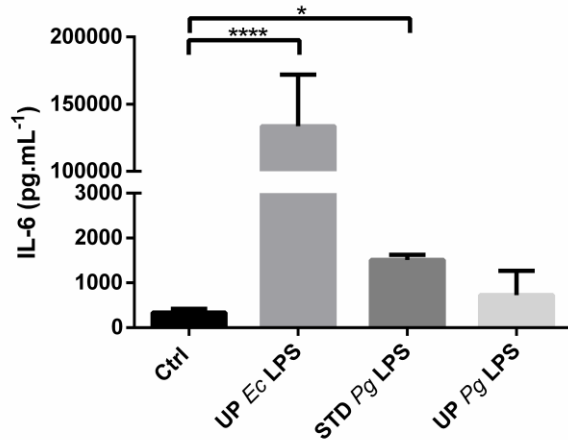
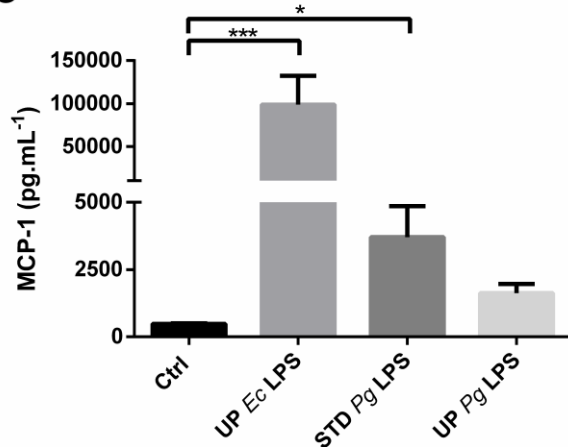
A**B****C**

Figure 2. Cytokine production in serum of mice stimulated with LPS. Mice were treated with 100 μ L of UP *Ec* LPS, STD *Pg* LPS or UP *Pg* LPS (100 μ g.kg⁻¹) for 3.5h. Control mice received saline. Serum levels of TNF- α , IL-6, and MCP-1 were measured by ELISA. Comparisons between different treatments have been analyzed by one-way ANOVA test with Turkey post-test. Data are expressed as mean \pm SEM (n=3 per group). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

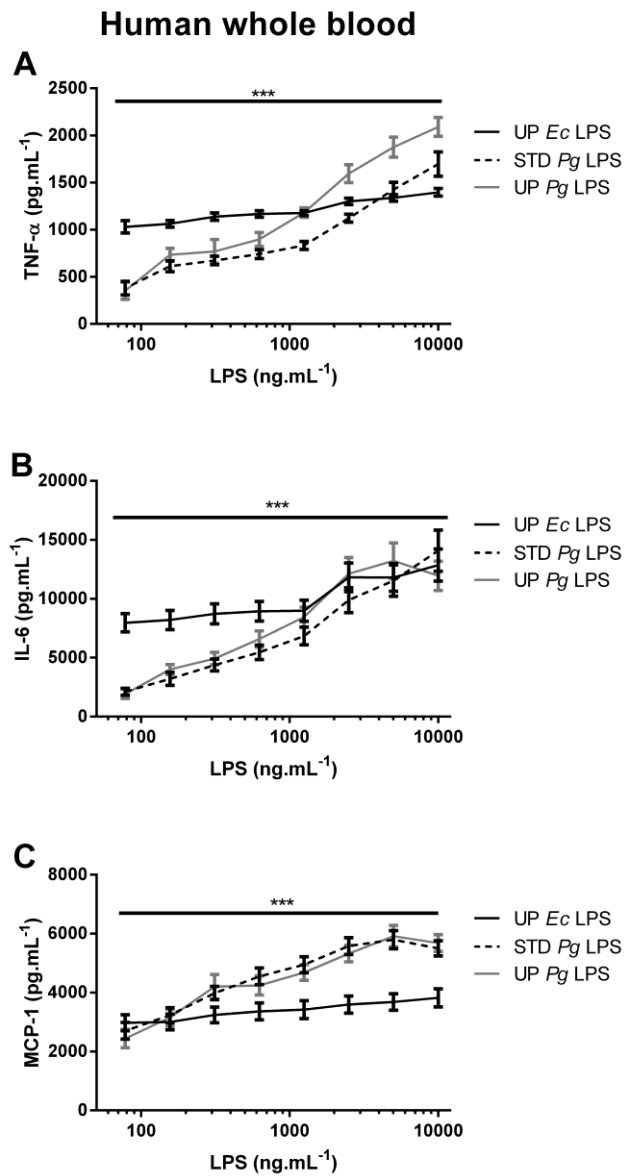


Figure 3. Cytokine production in human whole blood cells challenged with LPS. Human whole blood cells were treated with different doses of UP *Ec* LPS, STD *Pg* LPS or UP *Pg* LPS (0 to 10 000 ng.mL⁻¹) for 20h. TNF- α , IL-6, and MCP-1 levels were measured by ELISA in culture supernatants. Comparisons between different treatments have been analyzed by two-way ANOVA test followed by a Dunnett's test. Data are expressed as mean \pm SEM (n=3 per group). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to 0 ng.mL⁻¹ LPS.

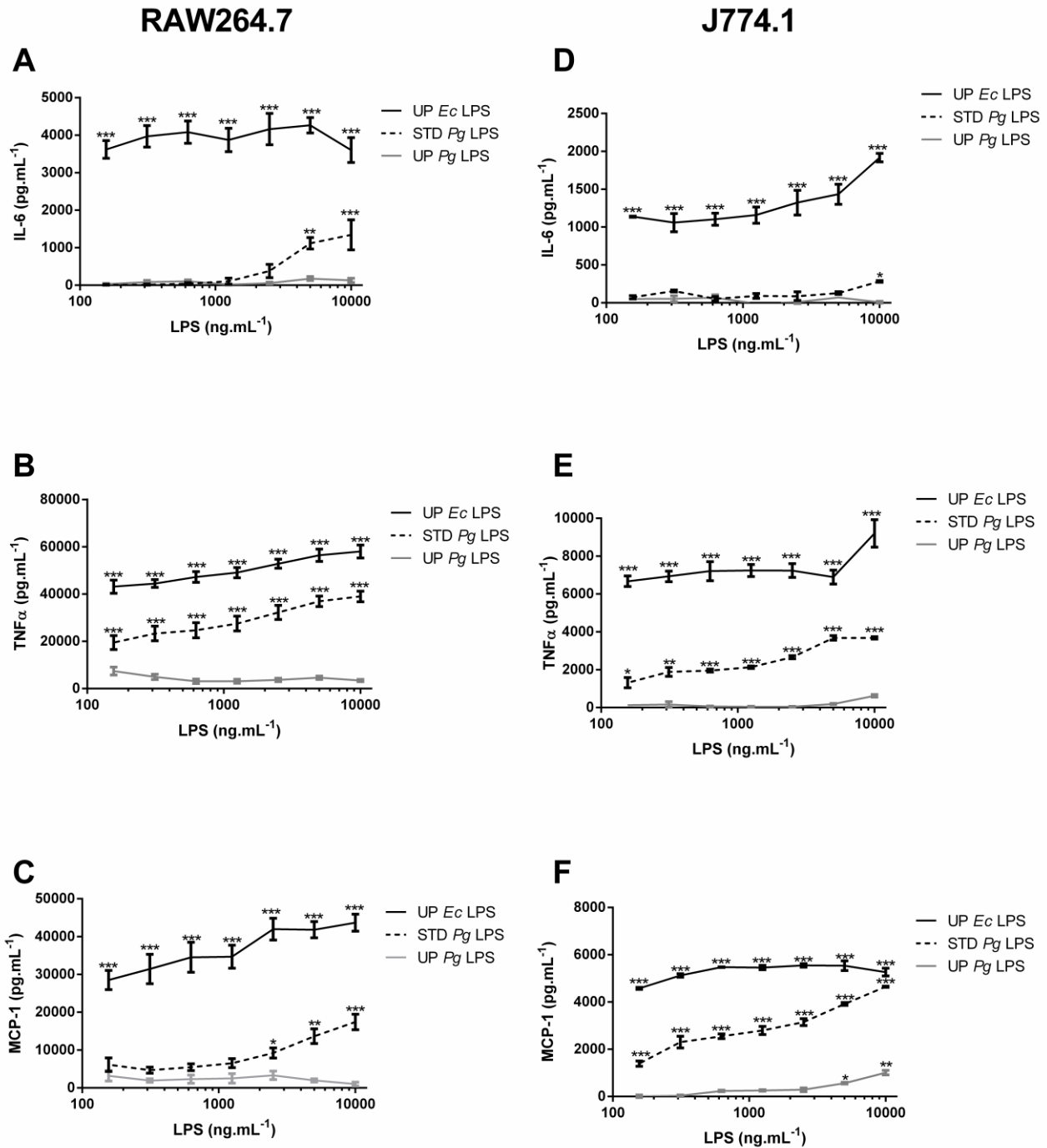


Figure 4. Cytokine production in RAW264.7 and J774.1 cells stimulated with LPS. RAW264.7 (Figure 4A-C) and J774.1 (Figure 4D-F) cells were treated with different doses of UP *Ec* LPS, STD *Pg* LPS or UP *Pg* LPS (0 to 10 000 ng.mL⁻¹) for 20h. IL-6 (Figure 4A and 4D), TNF- α (Figure 4B and 4E), and MCP-1 (Figure 4C and 4F) levels were determined by ELISA in culture supernatants. Comparisons between different treatments have been analyzed by two-way ANOVA test followed by a Dunnett's test. Data are expressed as mean \pm SEM (n=3 per group). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to 0 ng.mL⁻¹ LPS.

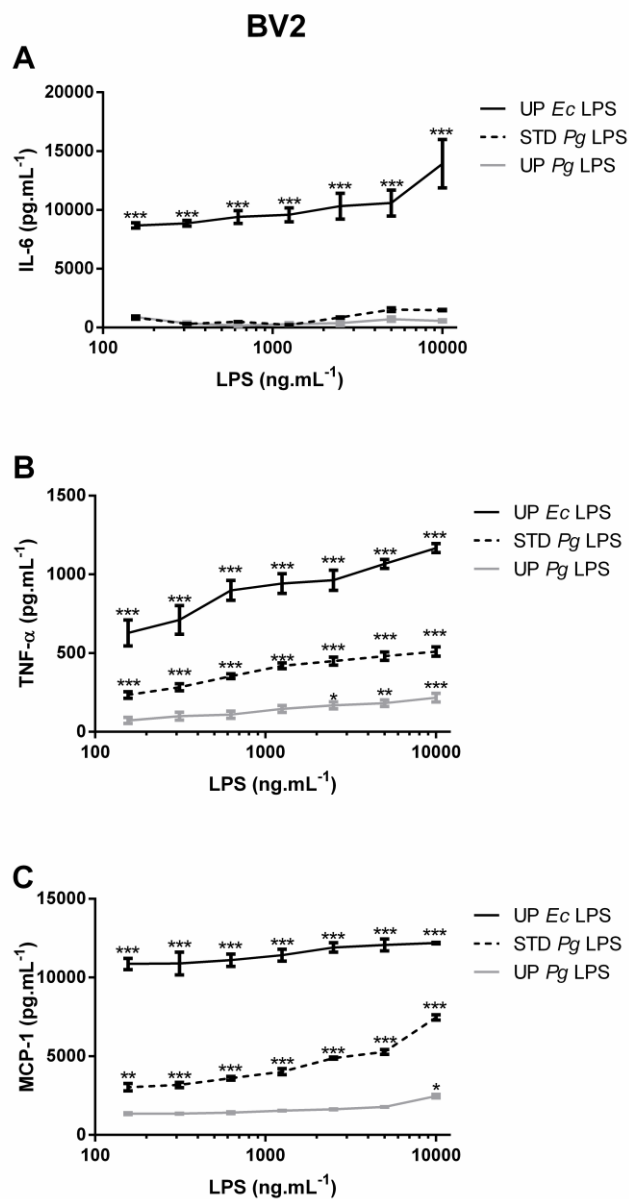


Figure 5. Cytokine production in BV2 cells stimulated with LPS. BV2 cells were treated with different doses of UP *Ec* LPS, STD *Pg* LPS or UP *Pg* LPS (0 to 10 000 ng.mL⁻¹) for 20h. IL-6, TNF- α , and MCP-1 levels were measured in the culture medium by ELISA. Comparisons between different treatments have been analyzed by two-way ANOVA test followed by a Dunnett's test. Data are expressed as mean \pm SEM (n=3 per group). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to 0 ng.mL⁻¹ LPS.

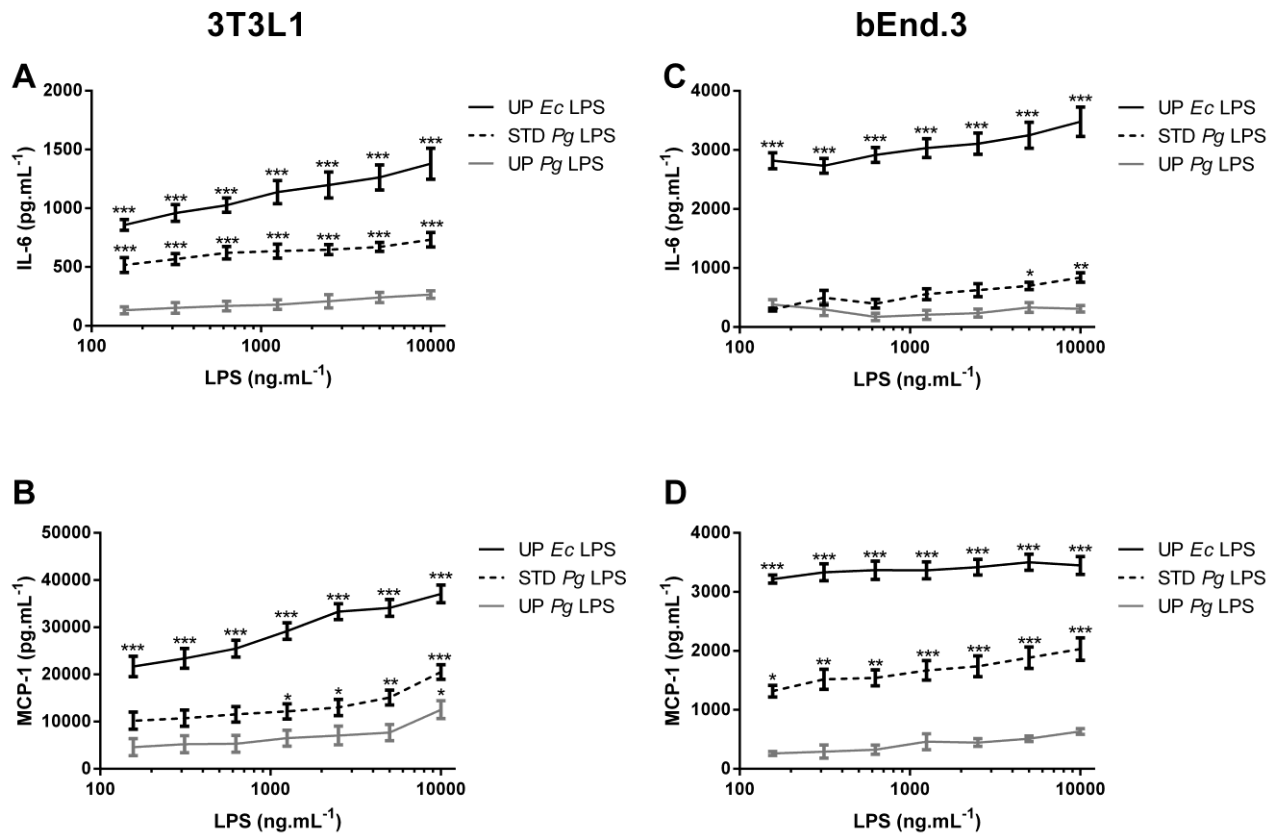


Figure 6. Cytokine production in 3T3-L1 and bEnd.3 cells stimulated with LPS. 3T3-L1 (Figure 6A-C) and bEnd.3 (Figure 6D-F) cells were treated with different doses of UP *Ec* LPS, STD *Pg* LPS or UP *Pg* LPS (0 to 10 000 ng.mL⁻¹) for 20h. TNF- α , IL-6, and MCP-1 concentrations were measured in the culture supernatants by ELISA. Comparisons between different treatments have been analyzed by two-way ANOVA test followed by a Dunnett's test. Data are expressed as mean \pm SEM (n=3 per group). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to 0 ng.mL⁻¹ LPS.

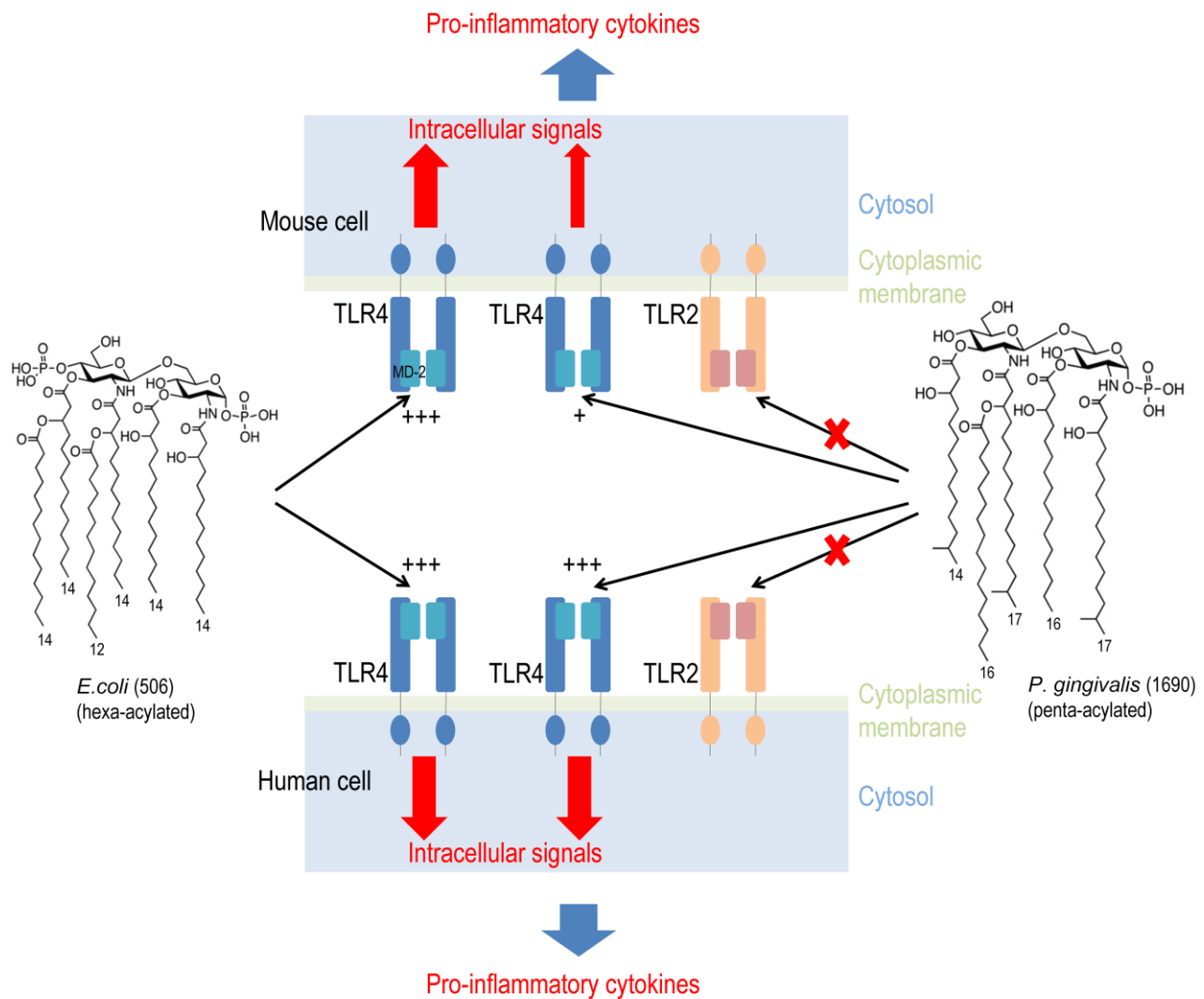
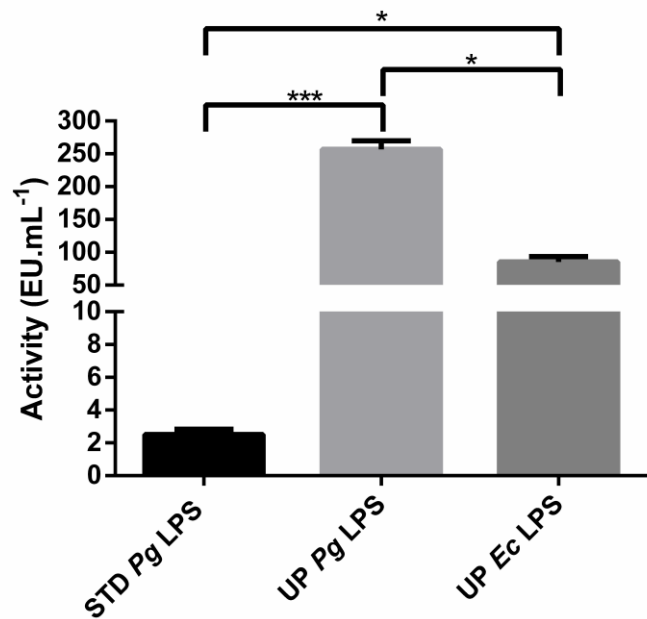


Figure 7. Differential recognition of lipid A on *Pg* LPS and *Ec* LPS. LPS recognition by TLR4 is based on the lipid A structure. Lipid A is different between *Ec* LPS and *Pg* LPS. Lipid A binding to MD2 induced dimerization of TLR4 and then led to the transduction of stimulatory signals and the secretion of pro-inflammatory cytokines. Our result suggests that recognition of lipid A structures by mouse and human TLR4 is different. Hexa-acylated *E. coli* lipid A is recognized as a strong agonist by both mouse and human TLR4, and induced an important production of pro-inflammatory cytokines. Penta-acylated *P. gingivalis* lipid A is recognized as an agonist by human TLR4 through MD2, and induces a production of pro-inflammatory cytokines, whereas it was weakly recognized by mouse MD2 and induces a low production of pro-inflammatory cytokines. Penta-acylated *P. gingivalis* lipid A does not interact with TLR2.



Supplemental figure 1. *Pg* LPS Ultra-pure have a significant endotoxin activity. Endotoxin levels were determined in LPS using a Limulus Amebocyte Lysate (LAL) assay (Hycult biotech, The Netherlands). The assay was performed according to the manufacturer's protocol and measurable levels of LPS were expressed as EU.mL⁻¹. In brief, LPS were incubated for 30 min with LAL reagent at room temperature. Samples were then treated with stabilizer reagents. Endotoxin levels were determined by absorptions at 405 nm with a microplate reader (TECAN Sunrise, Austria). We based our experiment on the internal control dosage of 100 EU.mL⁻¹ of UP *Ec* LPS, which correspond to 100 ng.mL⁻¹ of LPS as described by the supplier. And when we dose the UP *Ec* LPS correspond to we have 85 +/- 8 EU.mL⁻¹. The dosage of STD *Pg* LPS did not show any activity have are next to 2.5 +/- 0.5 EU.mL⁻¹, whereas the dosage of UP *Pg* LPS are 257 +/- 13 EU.mL⁻¹. Comparisons between different treatments have been analyzed by one-way ANOVA test with Turkey post-test. Data are expressed as mean ± SEM (in triplicate). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

2. Etude 2: Soluble HMGB1 Is a Novel Adipokine Stimulating IL-6 Secretion through RAGE Receptor in SW872 Pre-adipocyte Cell Line: Contribution to Chronic Inflammation in Fat Tissue

Article publié

Introduction:

L'inflammation de bas grade est un phénomène central dans les pathogénités de l'obésité et de la résistance à l'insuline. Elle se traduit par la présence de cytokines inflammatoires dans le sérum des patients atteints de ces pathologies. Cette inflammation de bas grade est principalement attribuée à l'activation des macrophages. Il est maintenant acquis que les pré-adipocytes et les adipocytes participent aussi à cette inflammation de bas grade. HMGB1 est une cytokine produite par les macrophages responsables de la production de molécules inflammatoires via ses récepteurs RAGE, TLR2 et TLR4. Le but de cette partie est d'étudier la sécrétion et l'action paracrine et autocrine de HMGB1 par les cellules pré-adipocytes et d'étudier la contribution de HMGB1 sur l'inflammation au niveau du tissu adipeux. L'étude des récepteurs de HMGB1 impliqués dans cette réponse inflammatoire a également été effectuée.

Méthodologie:

- Construction d'un plasmide recombinant codant pour HMGB1 par génie génétique.
- Production et purification du HMGB1 recombinant en bactérie.
- Analyse de l'expression et de la réponse inflammatoire des cellules par HMGB1. Nous allons également utiliser des inhibiteurs de HGMB1 (anticorps bloquant, éthyl-pyruvate et glycyrrhizine). Nous allons mesurer la production de cytokines inflammatoires par ELISA.
- Transfection des cellules avec des sh-RNA contre HMGB1, et analyse de l'expression de cytokines inflammatoires par ELISA.
- Analyse de l'expression des récepteurs de HMGB1 (RAGE, TLR2 et TLR4) par la technique de cytométrie en flux.
- Utilisation d'anticorps bloquants contre les récepteurs de HMGB1 (RAGE, TLR2 et TLR4), et stimulation par HMGB1. Nous allons mesurer la production de cytokines inflammatoires par ELISA.

Résultats:

Nous avons mis en évidence dans notre modèle de cellules pré-adipocytes, leurs capacités à sécréter activement HMGB1. De plus, nous avons montré le lien entre l'expression de cytokine inflammatoire (IL-6 et MCP-1) et le taux de HMGB1 sécrété. Nous avons produit de l'HMGB1 recombinant pour l'étude. Pour résumé, HMGB1 recombinant induit sur les pré-adipocytes une production de cytokine inflammatoire (IL-6 et MCP-1) et ceci via le récepteur RAGE.

Conclusion:

Ces résultats nous montrent que les pré-adipocytes peuvent être impliqués dans l'inflammation bas grade du tissu adipeux. Cette inflammation serait induite par HMGB1 qui agirait de manière autocrine et paracrine au sein du tissu adipeux. Nous pouvons considérer que HMGB1 soluble serait une nouvelle adipokine sécrétée par les pré-adipocytes et contrôlant l'inflammation en se liant à son récepteur RAGE.

Soluble HMGB1 Is a Novel Adipokine Stimulating IL-6 Secretion through RAGE Receptor in SW872 Preadipocyte Cell Line: Contribution to Chronic Inflammation in Fat Tissue

Brice Nativel^{1°}, Mery Marimoutou^{2°}, Vincent G. Thon-Hon¹, Manoj Kumar Gunasekaran², Jessica Andries¹, Giovédie Stanislas¹, Cynthia Planesse², Christine Robert Da Silva², Maya Césari², Thomas Iwema¹, Philippe Gasque¹, Wildriss Viranaicken^{1*}

1 Groupe de Recherche Immunopathologie et maladies Infectieuses, Université de La Réunion, Réunion, France, 2 Groupe d'Etude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité, Université de La Réunion, Réunion, France

Abstract

Low-grade inflammation (LGI) is a central phenomenon in the genesis of obesity and insulin-resistance characterized by IL-6 in human serum. Whereas this LGI was initially thought to be mainly attributed to macrophage activation, it is now known that pre-adipocytes and adipocytes secrete several adipokines including IL-6 and participate to LGI and associated pathologies. In macrophages, HMGB1 is a nuclear yet secreted protein and acts as a cytokine to drive the production of inflammatory molecules through RAGE and TLR2/4. In this paper we tested the secretion of HMGB1 and the auto- and paracrine contribution to fat inflammation using the human preadipocyte cell line SW872 as a model. We showed that 1) human SW872 secreted actively HMGB1, 2) IL-6 production was positively linked to high levels of secreted HMGB1, 3) recombinant HMGB1 boosted IL-6 expression and this effect was mediated by the receptor RAGE and did not involve TLR2 or TLR4. These results suggest that HMGB1 is a major adipokine contributing to LGI implementation and maintenance, and can be considered as a target to develop new therapeutics in LGI associated pathologies such as obesity and type II diabetes.

Citation: Nativel B, Marimoutou M, Thon-Hon VG, Gunasekaran MK, Andries J, et al. (2013) Soluble HMGB1 Is a Novel Adipokine Stimulating IL-6 Secretion through RAGE Receptor in SW872 Preadipocyte Cell Line: Contribution to Chronic Inflammation in Fat Tissue. PLoS ONE 8(9): e76039. doi:10.1371/journal.pone.0076039

Editor: Xiaoli Chen, University of Minnesota - Twin Cities, United States of America

Received January 10, 2013; Accepted August 23, 2013; Published September 20, 2013

Copyright: 2013 Nativel et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from CPER-FEDER GR11, University of La Réunion and the the "Structure Fe'derative Environnement, Biodiversite', Sante'" University of La Réunion. BN holds a fellowship from the Biodiversite', Sante'" Environnement, Biodiversite', Sante'" University of La Réunion. MM and MKG hold fellowships from Regional Council of La Réunion. VGTH is a fellow from the French Ministry (contrat doctoral). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: wildriss.viranaicken@univ-reunion.fr

°These authors contributed equally to this work.

Introduction

HMGB1 is a non-histone nuclear protein which is a highly conserved, ubiquitous and is comprised of 215 amino acids that are organized in two globular DNA-binding domains, box A and box B, and with an acidic C-terminal tail [1,2]. HMGB1 can bind DNA, helps chromosome architecture organization and regulates transcription of genes. Outside the cell, HMGB1 can function as a chemokine or an alarmin to activate the immune system and mediate a wide range of physiological and pathological responses including autoimmunity, cancer, trauma, hemorrhagic shock and ischemia-reperfusion injury [3]. HMGB1 can be released in two conditions: an active secretion by immune cells or a passive secretion initiated by cellular damage like cell death [4]. The shuttling of HMGB1 between the nucleus and the cytoplasm is dependent of post-translational modifications that influence its traffic [5].

Once in the extracellular space, HMGB1 interacts with the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and/or members of the Toll-like family of receptors (TLRs) including TLR2 and TLR4. Activation of these receptors results in the activation of NF- κ B, which influences the production of pro-inflammatory cytokines [3]. Moreover, activation of NF- κ B induces the expression of HMGB1 receptors, and increases secretion of HMGB1 inducing a positive feedback loop of HMGB1-mediated inflammatory response [6].

The role of HMGB1 on macrophages is clearly described and stimulation of macrophages with HMGB1 induces a production of pro-inflammatory cytokines [7] which can lead to an increase of adipose tissue inflammation and insulin resistance.

Obese adipose tissue is characterized by low grade inflammation (LGI) [8] that is characterized by robust secretion of pro-inflammatory cytokines including IL-6 and active recruitment of leukocytes, mainly macrophages in the affected tissues [9]. These cytokines are known to be involved in insulin desensitization

Table 1. List of primers used in this study for RT-PCR on SW872 RNA.

Gene	Genre	Genbank	Primers	Sequences	Amplicon (pb)
GAPDH	human	NM_002046.4	Forward	5'- GCCTTCTCCATGGTGGTGAA -3'	151
			Reverse	5'- GCACCGTCAAGGCTGAGAGAAC -3'	
TLR2	human	NM_003264.3	Forward	5'- GCCTCTCCAAGGAAGAATCC -3'	329
			Reverse	5'- AGAAGAAAGGGGCTTGAACC -3'	
TLR4	human	NM_138557.2	Forward	5'- ACCCTTTAGCCCAGAACTGC -3'	227
			Reverse	5'- GTCTCACGCAGGAGAGCCAG -3'	
RAGE	human	NM_001136.4	Forward	5'- GCCAGAAGGTGGAGCAGTAG -3'	357
			Reverse	5'- AAGATGACCCCAATGAGCAG -3'	
HMGB1	human	NM_002128.4	Forward	5'- CCAAAGGGGAGACAAAAAAG -3'	193
			Reverse	5'- TCATAAGGCTGCTTGTCTATCT -3'	
IL-6	human	NM_000600.3	Forward	5'- ACCCCCAGGAGAAGATTCCA -3'	162
			Reverse	5'- GCCTCTTTGCTGCTTTCACA -3'	
MCP1	human	NM_002982.3	Forward	5'- CAATAGGAAGATCTCAGTGC -3'	188
			Reverse	5'- GTGTTCAAGTCTTCGGAGTT -3'	
TNF- α	human	NM_000594.3	Forward	5'- TCCAGGCGGTGCTTGTTCCT -3'	194
			Reverse	5'- TGGGCTACAGGCTTGTCACTCG -3'	

doi:10.1371/journal.pone.0076039.t001

phenomenon which could contribute to obesity and type 2 diabetes [10].

However long before the onset of obesity and macrophages infiltration, adipose tissue is able to implement and maintain LGI. Indeed it has been recognized that adipocytes also demonstrate significant inflammatory properties like IL-6 or TNF α production [11,12]. IL-6 expression in adipocytes is governed by an autocrine positive feedback loop and is upregulated by insulin. It has been shown that IL-6 upregulation in adipocytes leads to insulin resistance by activating SOCS3 in target cells like hepatocytes [13,14,15].

Moreover, pre-adipocytes contribute significantly to inflammation of the adipose tissue in obesity [16,17,18]. It has been demonstrated that pre-adipocytes can function as macrophage-like cells and may play a direct role in the inflammation response and obesity [19,20]. Expression profile of pro-inflammatory factors differs between adipocytes and pre-adipocytes and they may play different, but yet, complementary roles in inflammation of adipose tissues [18]. In addition, adipocytes can control the proliferation of pre-adipocytes [21] which accumulate thereby contributing further to inflammation of the adipose tissue. Pre-adipocytes and adipocytes produced mostly IL-8 and IL-6 pro-inflammatory cytokines and less TNF- α [22] which is mostly produced by macrophages. All of these observations show a central role of pre-adipocytes and adipocytes in the inflammatory status and LGI of adipose tissue mainly mediated by IL-6 secretion and its implication in insulin resistance.

A number of studies have demonstrated an autocrine and paracrine effect of HMGB1 on macrophages which can potent LGI. However, it is not known whether preadipocytes and adipocytes may secrete and respond to HMGB1. There is currently no published report regarding HMGB1 expression and functions in fat cells and possible links to LGI in obesity. In this study we investigated the implication of HMGB1 in the regulation of inflammation in preadipocytes using the human preadipocyte cell line SW872 as a model. We showed that HMGB1 is released actively by SW872 and that extracellular HMGB1 contributes to IL-6 secretion through RAGE. These results suggest that HMGB1

PLOS ONE | www.plosone.org

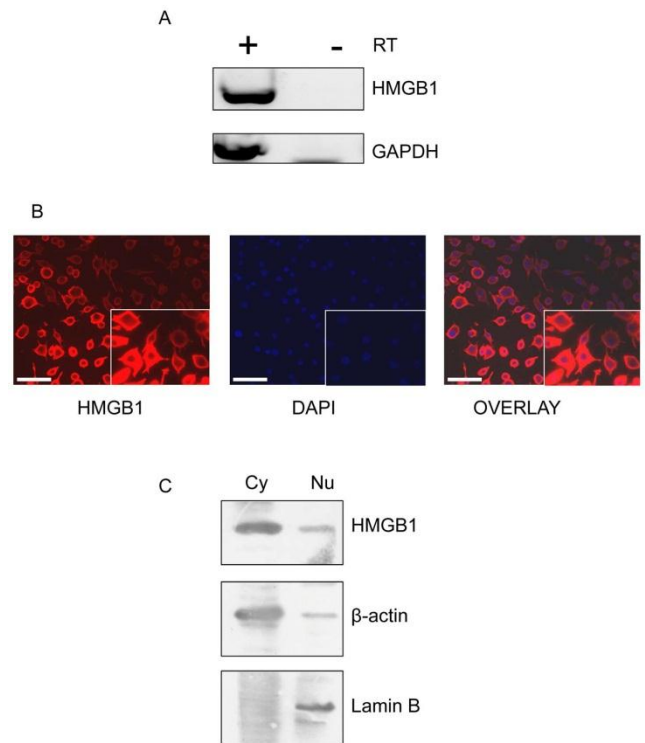


Figure 1. HMGB1 expression and localization in the human preadipocyte cell line SW872. A) Expression of HMGB1 by RT-PCR from total RNA obtained from SW872 cell after 12h of culture, with (+) and without (-) Reverse Transcriptase (RT). B) Detection of HMGB1 protein in different cell fraction by Western blot analysis. β -actin is a cytoplasmic protein (Cy) and lamin B a nuclear protein (Nu). C) Immunofluorescence of HMGB1 in SW872 cells (X 200). Cells were incubated with mouse anti-HMGB1 primary antibody (1:200), Alexa Fluor 594 linked secondary antibody (1:1000) and DAPI. Scale bar indicated 50 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0076039.g001

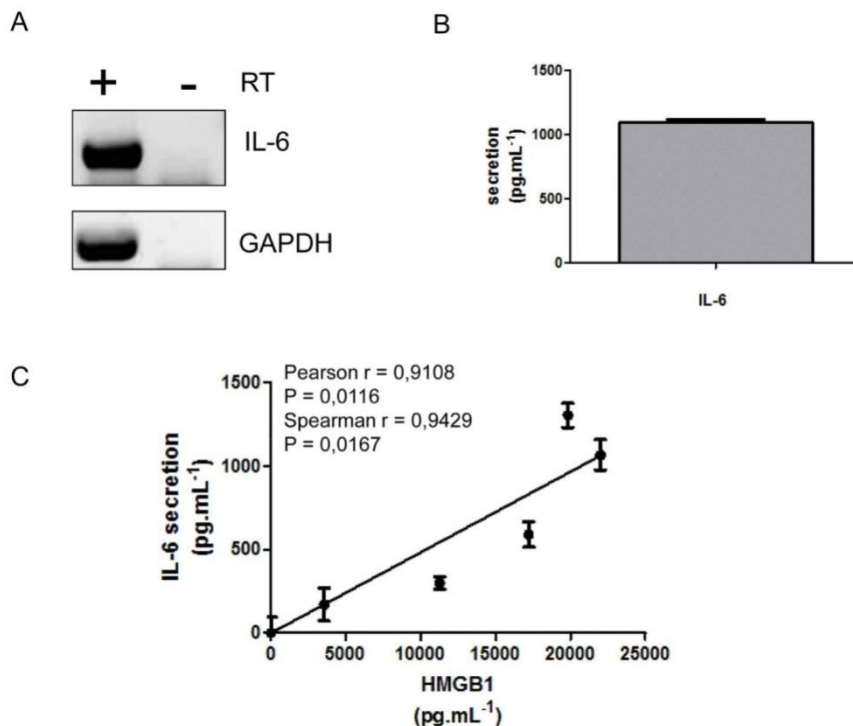


Figure 2. Secreted HMGB1 levels correlate with IL-6 secretion in SW872 cells. A) Expression of IL-6 by RT-PCR from total RNA obtained from SW872 cell after 12 h in culture, with (+) and without (-) Reverse Transcriptase (RT). B) IL-6 secretion by ELISA assay from SW872 supernatant culture 6h after media renewal (expressed in mean \pm SD) ($n = 3$). D) Correlation between IL-6 secretion and HMGB1 release in SW872 cell culture media after renewal of media ($n = 3$). Pearson's correlation coefficient ($r = 0.9108$, $p = 0.0116$) and Spearman's rank correlation coefficient ($r = 0.9429$, $p = 0.0167$). All values are expressed as means \pm SD. doi:10.1371/journal.pone.0076039.g002

and associated-signaling pathways could be used as targets for the development of new therapeutics against pathologies related to adipose tissue inflammation, insulin resistance and diabetes.

Materials and Methods

Drugs and reagents

Except when indicated, all drugs and reagents were from Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich, France).

Production of recombinant HMGB1 (rHMGB1)

The full length version of human HMGB1 (clone image 5268698, accession number BC066889) was modified by directed mutagenesis to remove the endogenous NdeI restriction site using 59- AGGCAAAATGTCATCTTATGCATTTTTTTGTG -39 and 59- CACAAAAATGCATAAGATGACATTTTGCCT -39. It was then amplified by PCR using primers 59- AACCATGGG-CAAAGGAGATCCTAA -39 and 59- TTTGAATTCTTGCTG CCGCGCGGCACCAGTTCATCATCATCTTCTT -39 and subsequently cloned in pET28 vector using NcoI and EcoRI sites. This lead to a sequence encoding HMGB1 – thrombin site – C-terminal his-tag. After transformation of BL21-codon plus *E. Coli* bacteria (Agilent), culture and induction were done as described [23]. Cells were harvested at 3,000 g for 15 min at 4°C. All subsequent steps were done at 4°C. The pellet was resuspended in 10 mL of 25 mmol.L⁻¹ Hepes (PAN Biotech, Germany). Cells were lysed by sonification (Misonix ultrasonic liquid processor, France) at 80% of amplitude for 2 min with 10 sec of burst and 10 sec of pause in the ice. Lysate was centrifuged at 15,000 g for 10

min at 4°C, the supernatant was submitted to the action of DNase I at 80 U/mL for 30 min at 25°C, then diluted to a final volume of 10 mL and mixed gently with 0.5 mL of agarose Ni-NTA (Qiagen, France). After 30 min, the column was washed with 10 mL of 25 mmol.L⁻¹ Hepes, 500 mmol.L⁻¹ NaCl, then with 10 mL of 25 mmol.L⁻¹ Hepes, 20 mmol.L⁻¹ imidazole, then with 25 mL of 25 mmol.L⁻¹ Hepes, 0.1% (v/v) Triton X-114, 20 mmol.L⁻¹ imidazole, then a final washing step with 10 mL of 25 mmol.L⁻¹ Hepes, 20 mmol.L⁻¹ Imidazole. HMGB1-His was eluted with 5 mL of 300 mmol.L⁻¹ imidazole in 25 mmol.L⁻¹ Hepes. The elute (1 mL) was dialyzed overnight at 4°C against 25 mmol.L⁻¹ Hepes. Levels of LPS and DNA in the preparation were evaluated respectively by LAL assay (HyCult Biotechnology, Uden, The Netherlands) and ethidium bromide (EtBr) coloration of DNA after gel electrophoresis. Level of LPS was under 1ng.L⁻¹ and no DNA was detected by EtBr coloration. Biochemical evaluation of rHMGB1 was conducted by SDS-PAGE with coomassie-blue staining and western blot (Figure S4A).

Cell culture and treatment

SW872 liposarcoma cells line (ATCC, HTB-92) were cultured at 37°C with 5% CO₂ in DMEM medium, supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum and 2 mmol.L⁻¹ L-Glutamine, 1 mmol.L⁻¹ sodium pyruvate, 100 U.mL⁻¹ of penicillin, 0.1 mg.mL⁻¹ of streptomycin and 0.5 mg.mL⁻¹ of fungi-zone (PAN Biotech, Germany). All experiments were done between passage 2 and 8 at 80% of confluence. For treatment, the media was replaced by fresh complete media (see above) containing drugs or rHMGB1 for 5 h or indicated time. Cells were harvested and kept as frozen pellet for further protein or mRNA analysis.

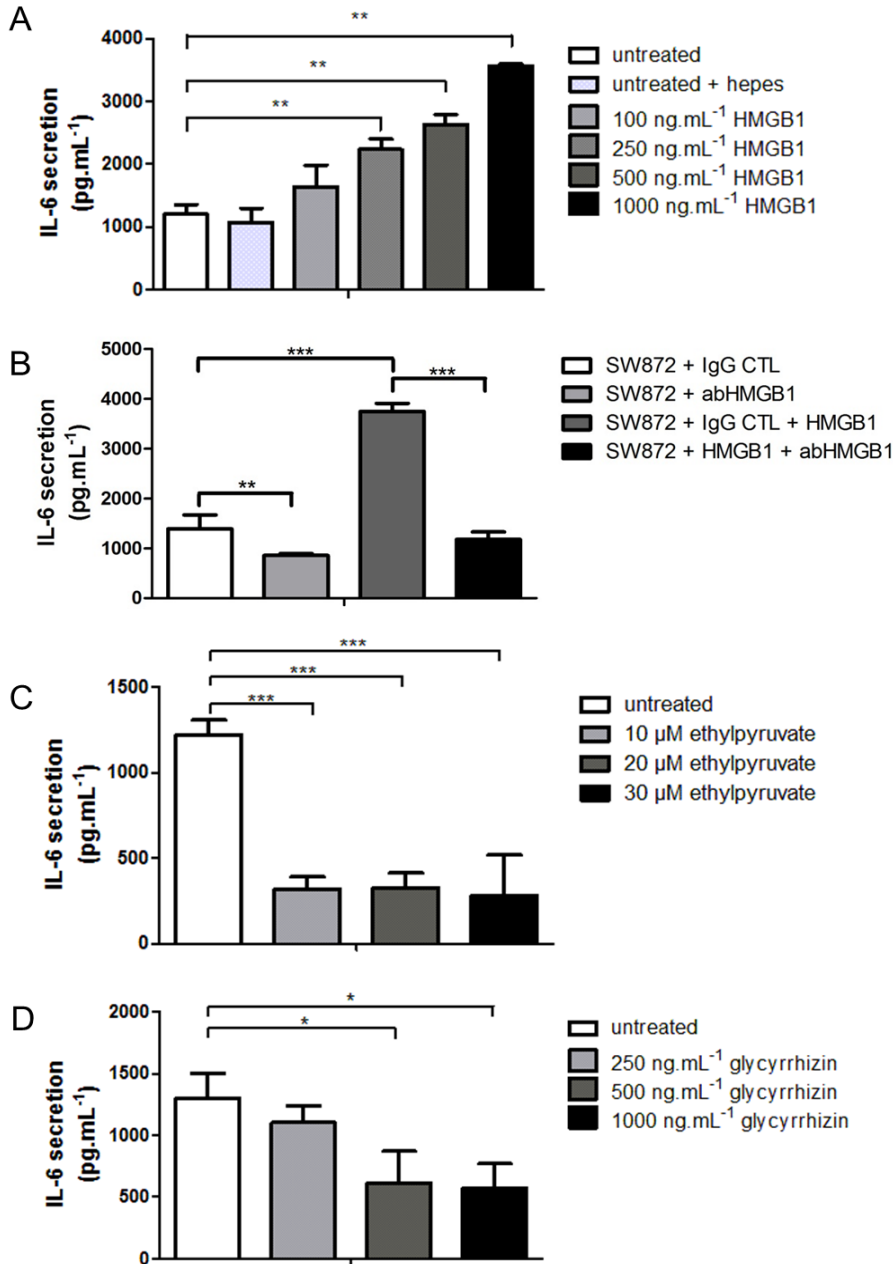


Figure 3. Secreted HMGB1 controls IL-6 production in SW872 cells. IL-6 levels were determined by ELISA from SW872 cells A) treated with increasing concentrations of recombinant HMGB1 for 5 h (n = 4) or B) treated or not with rHMGB1 with a dose of 1 μg.mL⁻¹ for 5 h in presence of either an irrelevant control rabbit IgG (CTL) or a rabbit monoclonal anti-HMGB1 (abHMGB1) (n = 4). Detection of IL-6 secretion in SW872 cells treated for 5 h with C) ethyl-pyruvate (n = 3) or D) glycyrrhizin (n = 3). All values are expressed as means +/- SD. Degrees of significance are indicated in the figure captions as follow, * p,0.05, ** p,0.01, *** p,0.001. doi:10.1371/journal.pone.0076039.g003

The media were centrifuged for 5 min at 800 g and supernatants were kept at -20°C until use for quantification by ELISA or Dot-Blot.

RNA interference and retroviral gene transfert

29mer shRNA constructs (TR316576) in retroviral untagged pRS vector, against HMGB1 were purchased from Origene (Clinsciences, France). Retroviral particule were produced in PT-67 packaging cell lines as described by manufacturer's instructions (Clontech, Ozyme, France). SW872 were stably infected using the tissue cell supernatant of transfected PT67 cells as before using puromycin (1 μg.mL⁻¹) as selection agent for twenty days [24].

Blocking antibody assay

SW872 cells were treated with rHMGB1 (1 μg.mL⁻¹) and incubated with control or blocking antibodies for 5 h at 1:20 dilution. Blocking antibodies against TLR2 (clone T2.5, 5 μg.mL⁻¹) and TLR4 (clone HTA125, 5 μg.mL⁻¹) [25,26] were purchased from HyCult Biotechnology (Uden, The Netherlands). Blocking polyclonal antibody against RAGE used at 1:20 dilution (goat anti-RAGE, AB5484) was purchased from Chemicon International Inc (Temecula, CA, USA). Blocking rabbit monoclonal anti-HMGB1 used at 1:20 dilution (clone D3E5, 6893) was obtained from Cell Signaling Technology (Ozyme, Saint Quentin, France). Blocking activity of antibody against RAGE and

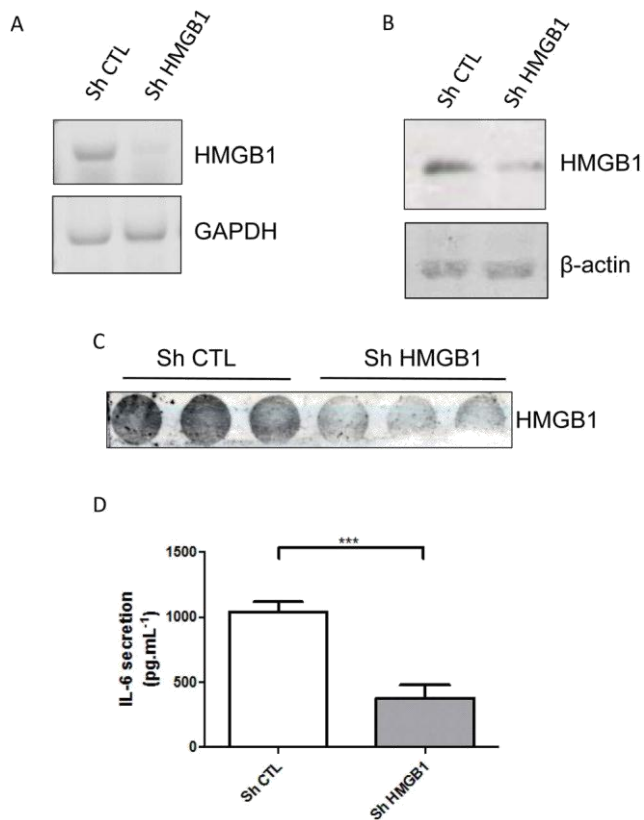


Figure 4. HMGB1 shRNA downregulates IL6 secretion. HMGB1 mRNA expression or protein expression were assessed respectively by RT-PCR (A) or Western blot (B) after 12h in culture of stably SW872 infected with scramble shRNA (Sh CTL) or HMGB1 shRNA (sh HMGB1) constructs. C) Detection of IL-6 secretion in stably SW872 infected cells with scramble shRNA (Sh CTL) or HMGB1 shRNA (sh HMGB1) constructs after 5h of media renewal (n = 3). All values are expressed as means \pm SD. Degrees of significance are indicated in the figure captions as follow *** p,0.001. doi:10.1371/journal.pone.0076039.g004

HMGB1 for cytokine activity of HMGB1, were validated in RAW-BLUE cells using rHMGB1 at 1 μ g.mL⁻¹ (Invivogen, France).

Lysate preparation and Western Blot analysis

SW872 cells were harvested after two washes with PBS and pelleted at 800 g for 5 min at 4°C. The pellets were processed for subcellular fractionation using the NE-PER according to manufacturer's instruction (Thermo Scientific, France). Protein extracts (cytoplasmic or nuclear fractions) were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-C extra, GE Healthcare, France). The Western blot was performed as described [27]. Monoclonal anti-HMGB1 (clone 2F6 Sigma), monoclonal anti- β -actin (clone C4, Santa Cruz Biotechnology), monoclonal anti-lamin B (Oncogene, Cambridge, MA, USA) were used as primary antibodies at 1:1000 dilution. Anti-rabbit immunoglobulin-horseradish peroxidase or anti-mouse immunoglobulin-horseradish peroxidase conjugates (Vector, France) were used as secondary antibodies and diluted at 1:2000. All antibodies were diluted in TRIS buffer with 0.1% Tween and 5% (w/v) low fat milk. Blots were revealed with ECL detection reagents (GE Healthcare).

ELISA quantification and Dot-Blot analysis

Secretion of cytokines (IL-6, TNF- α) was measured by ELISA kit (eBiosciences, Austria) according to manufacturer's instructions. Of note, no exogenous HMGB1, LPS and IL-6 were detected in commercial cell culture media or complete media by Dot-blot, LAL-assay and ELISA, respectively (data not shown). Secretion of HMGB1 was measured by ELISA kit from IBL international according to manufacturer's instructions (IBL, Germany). 100 μ L of SW872 cell culture supernatant were spotted on nitrocellulose membrane (Hybon-C extra, GE Healthcare, France) with a Dot-blot apparatus (Biorad). Membranes were processed as for the Western-blot technique.

RNA isolation and RT-PCR

Total RNA was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's specifications. The reverse transcription (RT) was done with 2 μ g of total extracted RNA and 14.5 mL of RT mix containing: 6 mL of 5X RT buffer (Invitrogen), 1.5 mL of 0.1 mol.L⁻¹ DTT (Invitrogen), 3 mL of 10 mmol.L⁻¹ dNTP mix (Promega, Madison), 2.5 mL of 5 U.mL⁻¹ of random hexamers (pdN6), 1.5 mL of 40 U.mL⁻¹ RNase Inhibitor (Promega). After a denaturation at 65°C for 5 min, 2 mL of RTase 200 U.mL⁻¹ (Invitrogen) were distributed. The RT steps are the followings, 37°C for 1 h, 95°C for 5 min. cDNAs were then kept at 4°C. The PCR was done in a final volume of 20 mL containing 4 mL of 5X PCR buffer (Promega), 2 mL of 25 mmol.L⁻¹ MgCl₂ (Promega), 0.4 mL of 10 mmol.L⁻¹ dNTP mix, 0.1 mL of 5U.mL⁻¹ Taq polymerase (Promega), 11.5 mL of water DNase RNase free, 1 mL of cDNA and 1 mL of 10 mmol.L⁻¹ primer mix (Table 1). 30 cycles of PCR were done with a pre-denaturation at 95°C for 2 min, 30 cycles of PCR (denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at 60°C for 30 sec, extension at 72°C for 45 sec). Final extension was carried out at 72°C for 5 min, and samples were then kept at 4°C. The size of PCR products was checked on 1.2% agarose gel electrophoresis and visualized with EtBr. GAPDH was used as a housekeeping gene.

Immunofluorescence

SW872 cells were grown on glass coverslips, washed twice with PBS and then fixed for 5 min in fixation buffer (5% formaldehyde v/v and 5% glutaraldehyde v/v in PBS) and washed twice with PBS. Coverslips were conserved at -20°C. Cells were incubated in the following primary antibody, anti-HMGB1 (Clone 2F6, Sigma) 1:200 dilution (2.5 μ g.mL⁻¹) in PBS-BSA 1% (w/v) and incubated with the secondary antibody Alexa Fluor 594-conjugated anti-mouse IgG (1:1000 dilution). Nuclei were stained with DAPI (Sigma, D9542) at a final concentration of 0.1 ng.mL⁻¹. Coverslips were mounted in Vectashield (Vector Labs, Clinisciences, France), and fluorescence was observed using a Nikon Eclipse E2000-U microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Images were obtained using the Nikon Digital sight PS-U1 camera system and the imaging software NIS-Element AR (Nikon, Tokyo, Japan).

Flow cytometry

Cells were harvested after two washes with PBS, then pelleted at 800 g for 5 min. Cells were incubated with 5% (w/v) BSA in PBS for 10 min at room temperature under agitation. Primary and secondary antibodies were diluted in PBS-BSA and incubated at room temperature with agitation for 45 min. Primary antibodies were anti-TLR2 (clone T2.5, 25 μ g.mL⁻¹, HyCult Biotechnology), anti-TLR4 directly conjugated with R-Phycoerythrin (clone

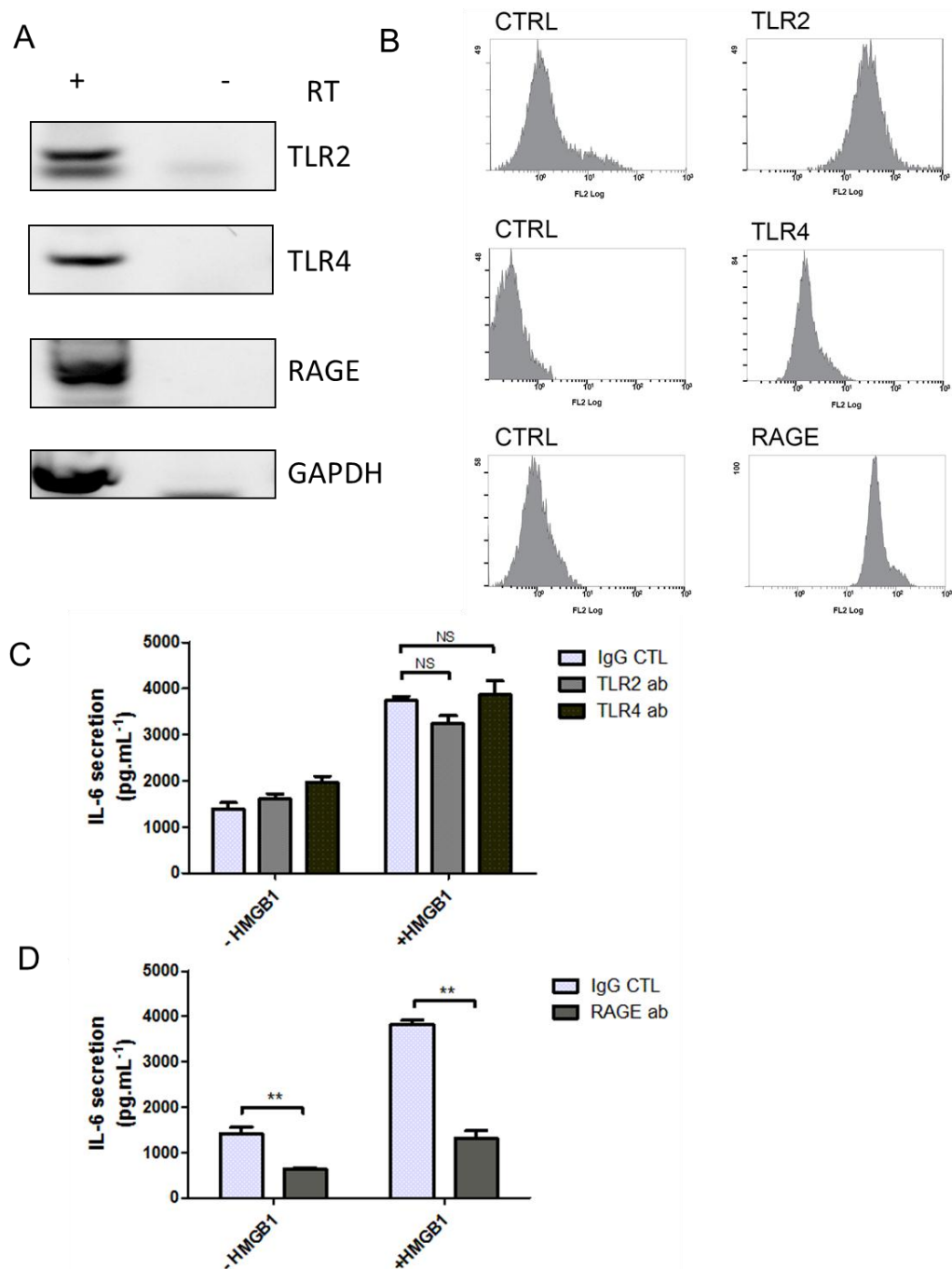


Figure 5. HMGB1 mediates IL-6 release through RAGE. A) TLR2, TLR4, RAGE and HMGB1 mRNA expression was assessed by RT-PCR from total RNA obtained from SW872 cell after 12h in culture, with (+) and without (-) Reverse Transcriptase (RT). B) Cell surface expression of TLR2, TLR4 and RAGE were analyzed by FACS C) SW872 cells were treated with rHMGB1 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for 5 h with control mouse IgG (CTL), TLR2 or TLR4 blocking antibody (n = 4). D) SW872 cells were treated as in (C) except that control goat IgG (CTL) or goat polyclonal anti-RAGE were used (n = 4). All values are expressed as means \pm SD and degrees of significance are indicated in the figure captions as follow, * p.0.05, ** p.0.01, *** p.0.001 and ns = not significant. doi:10.1371/journal.pone.0076039.g005

HTA125, 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ HyCult Biotechnology) or anti-RAGE (polyclonal antibody, Chemicon international) at 1:100 dilution. When required, we used anti-goat or anti-mouse conjugated to R-Phycoerythrin (polyclonal antibody, Southern Biotech) at 1:500 dilution as secondary antibodies. After two washes with PBS, cells were harvested in PBS. For each experiment 10000 cells were counted and were analyzed by flow cytometry (Beckman

Coulter FC-500-MPL Flow Cytometer, MXP acquisition software and CXP analysis software, version 2.2).

Statistical analysis

All values are expressed as mean \pm SD and are representative at least of 3 independent experiments. Comparisons between different treatments have been analyzed by a one-way ANOVA test. Values p,0.05 were considered statistically significant for a

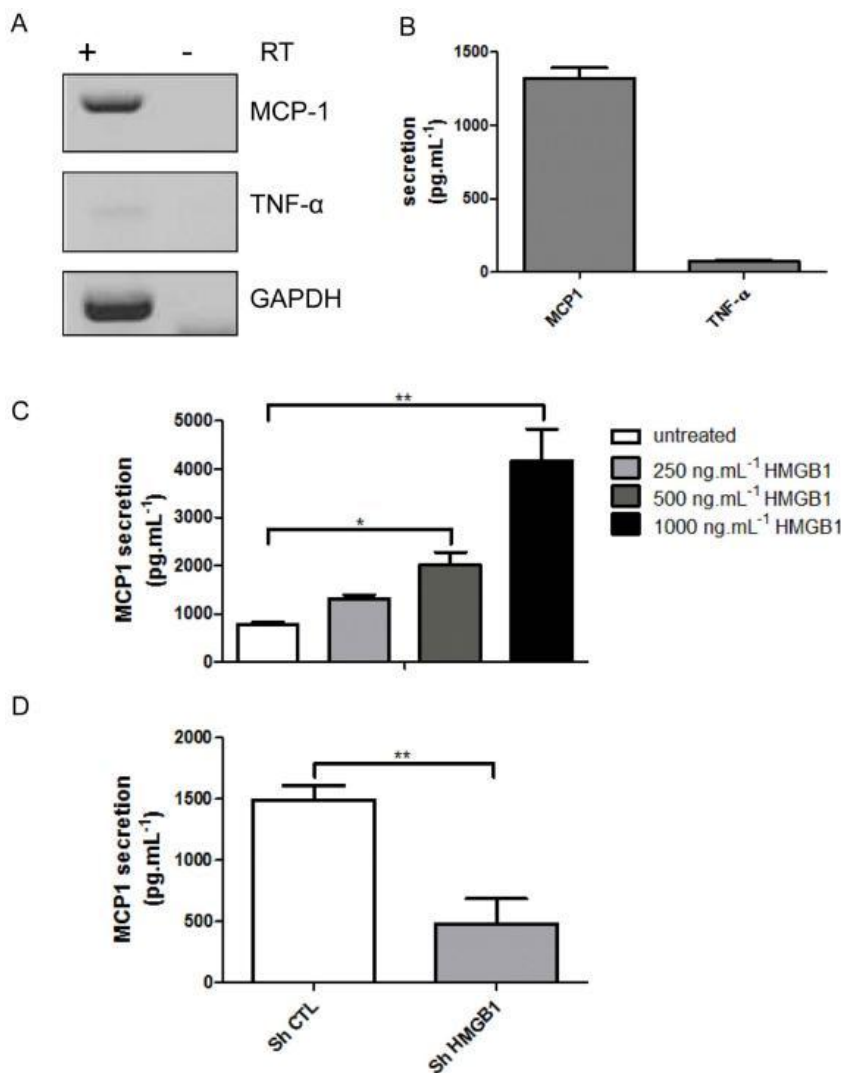


Figure 6. HMGB1 controls MCP1 (CCL2) secretion. A) MCP1 and TNF α mRNA expression were assessed by RT-PCR from total RNA obtained from SW872 cell after 12h in culture, with (+) and without (-) Reverse Transcriptase (RT). B) MCP1 and TNF α secretion by ELISA assay from SW872 supernatant culture 6h after media renewal (n = 6). C) IL-6 levels were determined by ELISA from SW872 cells treated with increasing concentrations of recombinant HMGB1 for 5 h (n = 3). D) Detection of MCP1 secretion in stably infected SW872 with scramble shRNA (Sh CTL) or HMGB1 shRNA (Sh HMGB1) constructs after 5h of media renewal (n = 3). All values are expressed as means \pm SD and degrees of significance are indicated in the figure captions as follow, * p,0.05, ** p,0.01, *** p,0.001. doi:10.1371/journal.pone.0076039.g006

post-hoc Tukey-Kramer test in order to compare treated versus non-treated. All statistical tests were done using the software Graph-Pad Prism version 5.01 (San Diego, CA, USA). Degrees of significance are indicated in the figure captions as follow: * p,0.05; ** p,0.01; *** p,0.001, ns = not significant.

Results

1. SW872 as a preadipocyte model

In this study we wanted to test the secretion of HMGB1 and the contribution to fat inflammation of preadipocyte. We used the human liposarcoma cell line SW872 as a model. We first tested the phenotype of SW872 considered as a preadipocyte model. Using RT-PCR we found expression of preadipocyte markers Pref1, GATA2 and AEBP in SW872 as in 3T3L1 preadipocyte (Table S1, Figure S1). We were not able to detect adipocyte markers FABP4, C/EBP α ,

PPAR α , KLF15, transcripts and the presence of lipids droplets by Oil Red O staining at any time of our experimental settings (data not shown). All of these observations argue in favor of preadipocyte status for SW872 cell line.

2. HMGB1 localization in the human preadipocyte cell line SW872

We analyzed the basal expression of HMGB1 in the human preadipocyte SW872 cells by RT-PCR. The transcript of HMGB1 was detected in SW872 cells in basal culture conditions (Figure 1A). We next investigated the cellular localization of HMGB1 in SW872 cells by immunofluorescence. We found that 100% of SW872 cells expressed HMGB1 and with an immunostaining mainly localized to the cytoplasm (Figure 1B). To confirm that SW872 cells predominantly expressed cytoplasmic HMGB1, we performed Western blot of cellular fractions of cytoplasm (Cy) and

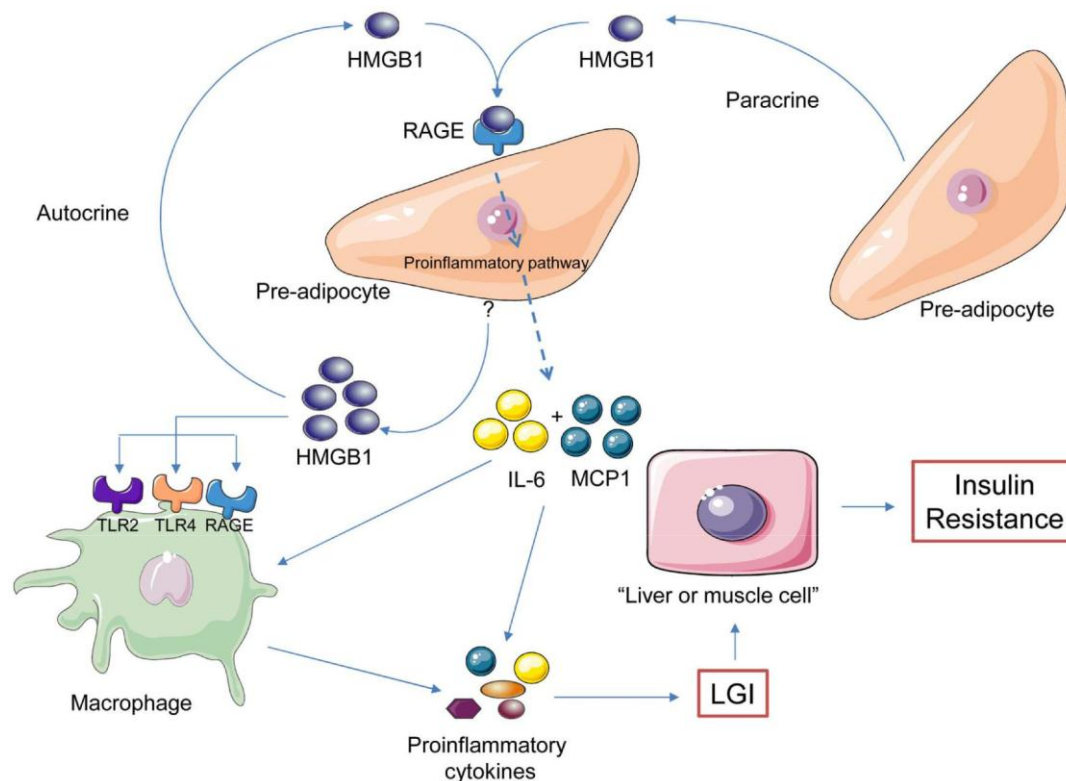


Figure 7. Central role of HMGB1 adipokine in LGI of fat tissue. Model depicting the novel role of HMGB1 as an adipokine involved in fat tissue inflammation, obesity and associated-chronic disorders such as diabetes type II. We found that HMGB1 is secreted and interacts via an autocrine and/ or paracrine manner with RAGE on preadipocytes. This could contribute to low grade inflammation (LGI) of the fat tissue with the elevated expression of major pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and MCP1. We could further hypothesize that HMGB1 released by preadipocytes can attract, via MCP1, macrophages and leading to activation through TLR2, TLR4 and RAGE. Finally, the pool of proinflammatory factors and recruited immune cells could instigate the LGI and the insulin resistance in liver and muscle cells. doi:10.1371/journal.pone.0076039.g007

nucleus (Nu). The proteins b-actin and lamin B were used as internal controls to assess the enrichment for cytoplasmic and nuclear proteins, respectively. High levels of cytoplasmic and low amount of nuclear HMGB1 were detected in SW872 cells confirming the immunofluorescence data (Figure 1C). These results suggest that HMGB1 accumulates in the cytoplasm of the human preadipocyte cell line SW872. The same results were observed using the mouse 3T3L1 preadipocyte cell line (Figure S2).

3. Secreted HMGB1 level correlates with IL-6 secretion in SW872 cells

It was previously shown that high levels of HMGB1 in the cytoplasm were typically associated with its active secretion [28]. We first tested the release of HMGB1 by SW872 cells by Dot blot from tissue cell supernatant (TCS). HMGB1 was released as soon as 30 min after media renewal and the level of secreted HMGB1 increased continuously (Figure S3A). We did not observe SW872 cell necrosis during this experiment as addressed by the LDH assay (Figure S3B). Hence, HMGB1 secretion was not due to passive release. All these observations also occurred in 3T3L1 preadipocyte cell lines (Figure S3C). We next used RT-PCR and ELISA to show that IL-6 is expressed (Figure 2A) and released ($1093.63 \text{ pg.mL}^{-1} \pm 24.57$) by SW872 cells in normal cell culture conditions (Figure 2B).

In order to investigate a potential correlation between HMGB1 and IL-6 secretion in SW872 we evaluated the release of IL-6

and HMGB1 by ELISA after media renewal. We further demonstrated a significant positive relationship between secreted HMGB1 levels and IL-6 release (Spearman's rank correlation coefficient: $r = 0.9429$ and $p,0.05$; Pearson's correlation coefficient: $r = 0.9108$ and $p,0.05$) (Figure 2C). These results suggest that the expression and release of IL-6 correlated with the release of HMGB1 by SW872 cells as in 3T3L1 (Figure S3C).

4. Secreted HMGB1 controls the release of IL-6 in SW872 cells

We produced a recombinant form of human HMGB1 (rHMGB1) to investigate the direct effects of HMGB1 on SW872 adipocytes (Figure S4A). SW872 cells were stimulated with increasing concentrations of rHMGB1 and levels of secreted IL-6 were quantified by ELISA. Whereas the secretion of IL-6 was not significantly affected after treatment of SW872 cells with 100 ng.mL^{-1} of rHMGB1, higher concentrations of rHMGB1 significantly enhanced the release of IL-6 ($p,0.01$) and in a dose dependent manner (Figure 3A). IL-6 secretion was not related to rHMGB1 cytotoxicity as cell viability was not affected by all tested dose of rHMGB1 (Figure S4B). Moreover, HMGB1 blocking antibody (abHMGB1) induced a significant reduction of IL-6 secretion in SW872 cells stimulated or not stimulated with rHMGB1 (Figure 3B). These results suggest that IL-6 secretion can be regulated by extracellular HMGB1.

To further test the contribution of HMGB1 release to IL-6 secretion, cells were treated with two HMGB1 inhibitors, ethyl-

pyruvate that blocks the release of HMGB1 (Figure S4C) [29] and glycyrrhizin that interacts with HMGB1 and prevents its binding to its cellular receptors (e.g. TLR2, TLR4, RAGE) [30,31]. The drug concentrations used herein did not affect cell viability as measured by MTT assay for SW872 (data not shown). The secretion of IL-6 was significantly decreased by 75% ($p,0.001$) after treatment of SW872 cells with low concentrations of ethyl-pyruvate and in a dose independent manner ($319.52 \text{ pg.mL}^{-1}$ of IL-6 secretion ± 73.88 after treatment with 10 mmol.L^{-1} of Ethyl-pyruvate, $323.99 \text{ pg.mL}^{-1} \pm 88.64$ after treatment with 20 mmol.L^{-1} $281.54 \text{ pg.mL}^{-1} \pm 237.78$ after treatment with 30 mmol.L^{-1}) compared to untreated cells ($1220 \text{ pg.mL}^{-1} \pm 88.68$) (Figure 3C). Similarly, the release of IL-6 significantly decreased by 55% ($p,0.05$) after treatment of SW872 cells with 500 ng.mL^{-1} ($615.79 \text{ pg.mL}^{-1}$ of IL-6 secretion ± 257.01 or 1000 ng.mL^{-1} of glycyrrhizin ($574.95 \text{ pg.mL}^{-1} \pm 196.24$) compared to untreated cells ($1300 \text{ pg.mL}^{-1} \pm 202.32$) (Figure 3D). To validate our observations we used an shRNA which target human HMGB1 mRNA and efficiently down regulated HMGB1 at mRNA, protein level and in the media (Figure 4A, B and C). HMGB1 down regulation was accompanied by at least 50% reduction ($p,0.001$) of the release of IL-6 (Figure 4C).

5. HMGB1-mediated IL-6 secretion involves the receptor RAGE in SW872 cells

It is well documented that HMGB1 can bind to the cellular receptors TLR2, TLR4 and RAGE [20]. Hence, we first tested the expression of these receptors in SW872 cells using RT-PCR and FACS analysis. TLR2, TLR4 and RAGE mRNAs were detected in SW872 cells (Figure 5A) and all three receptors were detected at the cell surface by FACS (Figure 5B). Next, we investigated whether HMGB1-mediated secretion of IL-6 was dependent of these cell surface receptors in SW872 cells using blocking antibodies against TLR2, TLR4 and RAGE. SW872 cells were treated for 5 h with rHMGB1 together with either an irrelevant mouse antibody (IgG control) or blocking antibodies against TLR2, TLR4 or RAGE as previously described [25]. Whereas TLR2 and TLR4 blocking antibodies had no significant effects on IL-6 secretion induced by rHMGB1 (Figure 5C), RAGE blocking antibody significantly decreased IL-6 secretion by 3 fold ($p,0.001$) (85.10% of IL-6 secretion $\pm 12.53\%$) compared to cells stimulated with rHMGB1 and incubated with irrelevant IgG control (258.89% of IL-6 secretion ± 8.54) (Figure 5D). This result was confirmed using another antibody against RAGE (rabbit anti-RAGE, 4679S, Cell Signaling Technology) (data not shown). Our results suggest that HMGB1-mediated secretion of IL-6 involved the receptor RAGE expressed by SW872 cells.

6. HMGB1 control MCP1 secretion in SW872

In LGI other inflammatory markers were also important like TNF α and MCP1 (CCL2). We investigated basal expression of TNF α and MCP1 in our SW872 preadipocyte model, as previously observed [22,32] high levels of MCP1 was expressed and secreted as addressed by RT-PCR and ELISA respectively (Figure 6 A and B). Low levels of TNF α was detected in basal conditions. The same pattern was found in 3T3L1 preadipocyte by RT-PCR (Figure S5). MCP1 secretion was next monitored in response to treatment of SW872 cells with rHMGB1. rHMGB1 significantly enhanced the release of MCP1 ($p,0.01$) in a dose dependent manner (Figure 6C).

To validate HMGB1 action, we analyzed MCP1 secretion after treatment of SW872 with plasmid encoding shRNA against HMGB1 as described above for IL6. Down regulation of HMGB1 levels significantly ($p,0.01$) reduced MCP1 secretion (Figure 6D).

All together these observations argue in favor of MCP1 secretion controlled by HMGB1 in preadipocyte.

Discussion

The secretion of HMGB1 by macrophages is well characterized and essentially through the active release from cytoplasmic stores. Moreover, secreted HMGB1 can induce a signaling cascade leading to the production and release of a plethora of pro-inflammatory molecules and leading to LGI. It is recognized that adipose tissue contributes to LGI but the role of HMGB1 specifically on preadipocytes has remained largely unknown.

To test the hypothesis that HMGB1 could participate to LGI in fat tissues, we used the human liposarcoma cell line SW872 as a preadipocyte model [33,34,35,36,37,38]. Herein, we showed that HMGB1 accumulated in the cytoplasm of SW872 and was secreted in the cell culture supernatants overtime. This observation is in agreement with a previous study where the authors showed that highly acetylated form of HMGB1 preferentially accumulated in the cytoplasm of monocytes before being secreted [28]. It is generally accepted that a dominant activity of histone acetyl transferase activity and/or a lower activity of histone deacetylase could contribute to the accumulation of cytoplasmic HMGB1 but this remains to be tested in our cell model.

Interestingly, we found that SW872 cells released constitutively high levels of IL-6 and through a direct action of the endogenous HMGB1. The levels of secreted IL6 correlated positively with the level of HMGB1 and, more importantly, we found that two inhibitors of HMGB1 release impaired IL6 production by SW872. Thus, our data show strong inhibitory activities either with ethyl-pyruvate [29] or glycyrrhizin which interacts specifically to A and B boxes of HMGB1 preventing its binding to its receptors [30]. These two inhibitors interfere with HMGB1 effect on IL-6 secretion. The decrease in IL-6 production mediated by the inhibition of endogenous HMGB1 might suggest an autocrine and paracrine activity of HMGB1 to regulate the secretion of IL-6 in SW872 cells. We observed that IL-6 secretion was less inhibited by glycyrrhizin than by ethyl-pyruvate. This difference might be due to the double action of ethyl-pyruvate which interferes with HMGB1 secretion [29] but also decreases NF- κ B DNA binding activity, thus reducing the production of cytokines [39].

When SW872 cells were exposed to rHMGB1, we observed an increased secretion of IL-6 in a dose dependent manner further suggesting that HMGB1 can act in a direct manner on fat cells to promote the release of IL-6.

In a previous study, IL6 secretion was significantly increased in culture medium of adipocytes in presence of LPS [40]. Moreover, LPS was more effective with higher IL-6 secretion in preadipocyte compared to mature adipocytes [16,17,18]. It is known that HMGB1 can strongly enhance the cytokine response evoked by LPS [41,42] and this is to be correlated with the observations that HMGB1 secretion by preadipocyte was not observed in fully mature adipocyte [43]. All together these observations would argue for a more potent inflammatory role of preadipocyte when compared to mature adipocytes.

The strong association between high levels of secreted HMGB1 by SW872 and strong levels of IL-6 is interesting to shed new light on the mechanisms of LGI and possible therapeutic avenues. It has also been shown a strong link between IL-6 serum levels and insulin resistance [8,15,44,45,46]. Hence, this relation between IL6 and insulin resistance should be extended to propose a central role of HMGB1 in insulin resistance through its action on IL6 secretion.

The therapeutic potentials of HMGB1 inhibitors should now be tested in the context of insulin resistance pathologies and experiments along these lines are now highly warranted.

Using our preadipocyte SW872 cell model, we showed that HMGB1 behave as a positive regulator of MCP1 secretion. As MCP1 act as a chemokine which attract macrophages, HMGB1 may contribute to immune cells infiltration in adipose tissue and instigating LGI. The presence of macrophages with potent pro-inflammatory activities and in response to HMGB1 released in the vicinity of the adipocytes may contribute further to insulin resistance (Figure7) [47,48,49].

Several key receptors have been implicated in HMGB1 signaling, including RAGE, TLR2 and TLR4. We showed that RAGE, TLR2 and TLR4 are transcribed and expressed at the surface of SW872 cells. However, only RAGE blocking antibody induced a strong inhibition of IL-6 secretion by preadipocytes SW872 stimulated with rHMGB1.

RAGE is known to be implicated in obesity, diabetes and their complications [50]. This implication is mostly related to its capacity to interact with advanced glycation end products (AGE) [51]. AGE can signal through RAGE to activate oxidative stress and inflammation and finally interfere with insulin-signaling pathways in adipocytes to decrease insulin sensitivity [52,53]. It will be essential to decipher the signaling pathways engaged by HMGB1 binding to RAGE in fat cells and although the role of soluble RAGE (natural antagonist) in this paradigm. Moreover, we will need to address whether AGE and HMGB1 can compete for the same binding site on RAGE and emphasizing possible antagonistic effects yet to be identified. We will need to study the signals downstream of RAGE and perform transcriptomic profiling of SW872 prior to and after HMGB1 stimulation. We used herein a model of human preadipocyte cells and it would be interesting to test the contribution of HMGB1 in primary cultures of human adipose cells and in vivo following the injection of HMGB1 in fat tissue sites.

Our results argue in favor of a central effect of RAGE in fat tissue inflammation. Administration of soluble RAGE or blocking antibody can induce a protective effect against inflammation and diabetes [54,55] and this could be due to the interference with HMGB1 pro-inflammatory functions. Remarkably, little is known about the distribution of HMGB1 in fat tissues and whether the level of soluble HMGB1 (in blood and fat tissues) is increased in response to obesity. Experiments along these lines are now highly warranted following cohorts of patients and analyzing sera and tissue biopsies for the presence of soluble HMGB1 and possible correlations with elevated levels of proinflammatory cytokines and adipokines.

In summary, our study is the first report ascribing a novel proinflammatory activity of HMGB1 on adipose tissue and particularly in preadipocyte. We can consider that soluble HMGB1 is a novel adipokine secreted by preadipocyte and controlling inflammation through the binding to RAGE receptors [56,57]. Indeed, our observations showed a direct involvement of HMGB1 in controlling the secretion of IL-6 and MCP1 in adipose tissues (Figure7). Experiments are now highly warranted to decipher the role of HMGB1/RAGE in LGI and numerous associated chronic pathologies.

References

1. Thomas JO (2001) HMGB1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem Soc Trans* 29: 3952401.
2. Thomas JO, Travers AA (2001) HMGB1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 26: 1672174.

Supporting Information

Figure S1 Preadipocyte markers expression in SW872 and 3T3L1 cell lines. Expression of pref-1, GATA2, AEBP by RT-PCR from total RNA obtained from SW872 cell after 12 h in culture (A) or from 3T3L1 after 16h in culture, with (+) and without (2) Reverse Transcriptase (RT). GAPDH served as housekeeping gene.

(TIF)

Figure S2 HMGB1 expression and localization in the human preadipocyte cell line 3T3L1. A) Expression of HMGB1 by RT-PCR from total RNA obtained from 3T3L1 cell culture after 16h in culture, with (+) and without (2) Reverse Transcriptase (RT). B) Detection of HMGB1 protein in different cell fractions by Western blot analysis. HSP60 is a cytoplasmic protein (Cy) (Antibody from Sigma-aldrich clone LK2) and H4 a nuclear protein (Nu) (Antibody from Santa-Cruz Biotechnology sc-10810).

(TIF)

Figure S3 SW872 and 3T3L1 releases actively HMGB1 in cell culture media. A) Quantification of HMGB1 secretion after renewal of cell culture media from SW872 cells in time dependent manner by Dot-Blot analysis. B) LDH assay on cell culture media from SW872 from A) according to manufacturer instructions (Sigma-aldrich). C) Quantification of HMGB1 and IL6 secretion after renewal of cell culture media from 3T3L1 cells in time dependent manner by respectively by Dot-Blot and ELISA assays.

(TIF)

Figure S4 HMGB1 inhibition downregulates IL6 re-lease. A) Biochemical evaluation of HMGB1 purity by SDS-PAGE followed by Coomassie Blue staining or Western blotting with HMGB1 antibody (2F6 from Sigma-aldrich). B) Cytotoxicity evaluation of rHMGB1 on SW872 cell line using MTT assay according to manufacturer's instructions (Sigma-aldrich). C) Impact of ethylpyruvate on HMGB1 secretion by Dot-Blot analysis.

(TIF)

Figure S5 MCP1 (CCL2) and TNF α mRNA expression. MCP1 and TNF α mRNA expression were assessed by RT-PCR from total RNA obtained from 3T3L1 cells after 12h of culture, with (+) and without (2) Reverse Transcriptase (RT).

(TIF)

Table S1 List of primers used in this study for RT-PCR on 3T3L1 and SW872 RNA.

(TIF)

Acknowledgments

We thank members of GRI and GEICO laboratories for helpful discussion.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BN WV. Performed the experiments: BN MM VTH MKG JA GS CP TI WV. Analyzed the data: BN MM VTH MKG GS CRDS MC WV PG. Contributed reagents/materials/analysis tools: TI. Wrote the paper: BN VTH TI WV PG. Critical reading of manuscript: MC CRDS.

5. Ito I, Fukazawa J, Yoshida M (2007) Post-translational methylation of high mobility group box 1 (HMGB1) causes its cytoplasmic localization in neutrophils. *J Biol Chem* 282: 16336216344.
6. Mantell LL, Parrish WR, Ulloa L (2006) Hmgb-1 as a therapeutic target for infectious and inflammatory disorders. *Shock* 25: 4211.
7. Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ (2005) The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol* 78: 128.
8. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G (2001) Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E7452751.
9. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, et al. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 179621808.
10. Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, et al. (2002) Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 208422089.
11. Hoareau L, Ravanan P, Gonthier MP, Delarue P, Goncalves J, et al. (2006) Effect of PEA on LPS inflammatory action in human adipocytes. *Cytokine* 34: 2912296.
12. Bes-Houtmann S, Roche R, Hoareau L, Gonthier MP, Festy F, et al. (2007) Presence of functional TLR2 and TLR4 on human adipocytes. *Histochem Cell Biol* 127: 1312137.
13. Ogawa W, Kasuga M (2008) Cell signaling. Fat stress and liver resistance. *Science* 322: 148321484.
14. Fasshauer M, Klein J, Lössner U, Paschke R (2003) Interleukin (IL)-6 mRNA expression is stimulated by insulin, isoproterenol, tumour necrosis factor alpha, growth hormone, and IL-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Horm Metab Res* 35: 1472152.
15. Sabio G, Das M, Mora A, Zhang Z, Jun JY, et al. (2008) A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* 322: 153921543.
16. Harkins JM, Moustaid-Moussa N, Chung YJ, Penner KM, Pestka JJ, et al. (2004) Expression of interleukin-6 is greater in preadipocytes than in adipocytes of 3T3-L1 cells and C57BL/6j and ob/ob mice. *J Nutr* 134: 267322677.
17. Chung S, Lapoint K, Martinez K, Kennedy A, Boysen Sandberg M, et al. (2006) Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes. *Endocrinology* 147: 534025351.
18. Nair S, Lee YH, Rousseau E, Cam M, Tataranni PA, et al. (2005) Increased expression of inflammation-related genes in cultured preadipocytes/stromal vascular cells from obese compared with non-obese Pima Indians. *Diabetologia* 48: 178421788.
19. Charriere G, Cousin B, Arnaud E, Andre M, Bacou F, et al. (2003) Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem* 278: 985029855.
20. Cousin B, Munoz O, Andre M, Fontanilles AM, Dani C, et al. (1999) A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *FASEB J* 13: 3052312.
21. Considine RV, Nye MR, Morales LM, Magosin SA, Sinha MK, et al. (1996) Paracrine stimulation of preadipocyte-enriched cell cultures by mature adipocytes. *Am J Physiol* 270: E8952899.
22. Hoch M, Eberle AN, Peterli R, Peters T, Seboek D, et al. (2008) LPS induces interleukin-6 and interleukin-8 but not tumor necrosis factor-alpha in human adipocytes. *Cytokine* 41: 29237.
23. Li J, Wang H, Mason JM, Levine J, Yu M, et al. (2004) Recombinant HMGB1 with cytokine-stimulating activity. *J Immunol Methods* 289: 2112223.
24. Ferbeyre G, de Stanchina E, Querido E, Baptiste N, Prives C, et al. (2000) PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* 14: 201522027.
25. Brull F, Mensink RP, van den Hurk K, Duijvestijn A, Plat J (2010) TLR2 activation is essential to induce a Th1 shift in human peripheral blood mononuclear cells by plant stanols and plant sterols. *J Biol Chem* 285: 295122958.
26. Borde C, Barnay-Verdier S, Gaillard C, Hocini H, Marechal V, et al. (2011) Stepwise release of biologically active HMGB1 during HSV-2 infection. *PLoS One* 6: e16145.
27. Viranaicken W, Gamsi L, Chaumet A, Durieux C, Georget V, et al. (2011) L-Ilf3 and L-NF90 traffic to the nucleolus granular component: alternatively-spliced exon 3 encodes a nucleolar localization motif. *PLoS One* 6: e22296.
28. Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, et al. (2002) The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep* 3: 99521001.
29. Dave SH, Tilstra JS, Matsuoka K, Li F, DeMarco RA, et al. (2009) Ethyl pyruvate decreases HMGB1 release and ameliorates murine colitis. *J Leukoc Biol* 86: 6332643.
30. Sitia G, Iannacone M, Muller S, Bianchi ME, Guidotti LG (2007) Treatment with HMGB1 inhibitors diminishes CTL-induced liver disease in HBV transgenic mice. *J Leukoc Biol* 81: 1002107.
31. Mollica L, De Marchis F, Spitaleri A, Dallacosta C, Pennacchini D, et al. (2007) Glycyrrhizin binds to high-mobility group box 1 protein and inhibits its cytokine activities. *Chem Biol* 14: 4312441.
32. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, et al. (1997) Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 419624200.
33. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, et al. (2001) Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 85: 6922696.
34. Wassef H, Bernier L, Davignon J, Cohn JS (2004) Synthesis and secretion of apoC-I and apoE during maturation of human SW872 liposarcoma cells. *J Nutr* 134: 293522941.
35. Izem L, Morton RE (2007) Possible role for intracellular cholesteryl ester transfer protein in adipocyte lipid metabolism and storage. *J Biol Chem* 282: 21856221865.
36. Tarnus E, Wassef H, Carmel JF, Rondeau P, Roche M, et al. (2009) Apolipoprotein E limits oxidative stress-induced cell dysfunctions in human adipocytes. *FEBS Lett* 583: 204222048.
37. Carmel JF, Tarnus E, Cohn JS, Bourdon E, Davignon J, et al. (2009) High expression of apolipoprotein E impairs lipid storage and promotes cell proliferation in human adipocytes. *J Cell Biochem* 106: 6082617.
38. Borcherding DC, Hugo ER, Idelman G, De Silva A, Richtand NW, et al. (2011) Dopamine receptors in human adipocytes: expression and functions. *PLoS One* 6: e25537.
39. Han Y, Englert JA, Yang R, Delude RL, Fink MP (2005) Ethyl pyruvate inhibits nuclear factor-kappaB-dependent signaling by directly targeting p65. *J Pharmacol Exp Ther* 312: 109721105.
40. Samuvel DJ, Sundararaj KP, Li Y, Lopes-Virella MF, Huang Y (2010) Adipocyte-mononuclear cell interaction, Toll-like receptor 4 activation, and high glucose synergistically up-regulate osteopontin expression via an interleukin 6-mediated mechanism. *J Biol Chem* 285: 391623927.
41. Wahamaa H, Schierbeck H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, Aveberger AC, et al. (2011) High mobility group box protein 1 in complex with lipopolysaccharide or IL-1 promotes an increased inflammatory phenotype in synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 13: R136.
42. Qin YH, Dai SM, Tang GS, Zhang J, Ren D, et al. (2009) HMGB1 enhances the proinflammatory activity of lipopolysaccharide by promoting the phosphorylation of MAPK p38 through receptor for advanced glycation end products. *J Immunol* 183: 624426250.
43. Feng D, Tang Y, Kwon H, Zong H, Hawkins M, et al. (2011) High-fat diet-induced adipocyte cell death occurs through a cyclophilin D intrinsic signaling pathway independent of adipose tissue inflammation. *Diabetes* 60: 213422143.
44. Fernandez-Real JM, Vayreda M, Richart C, Gutierrez C, Broch M, et al. (2001) Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 115421159.
45. Huth C, Heid IM, Vollmert C, Gieger C, Grallert H, et al. (2006) IL6 gene promoter polymorphisms and type 2 diabetes: joint analysis of individual participants' data from 21 studies. *Diabetes* 55: 291522921.
46. Lehrke M, Broedl UC, Biller-Friedmann IM, Vogeser M, Henschel V, et al. (2008) Serum concentrations of cortisol, interleukin 6, leptin and adiponectin predict stress induced insulin resistance in acute inflammatory reactions. *Crit Care* 12: R157.
47. Hotamisligil GS (1999) Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107: 1192125.
48. Hotamisligil GS (1999) The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med* 245: 6212625.
49. Nieto-Vazquez I, Fernandez-Veledo S, Kramer DK, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, et al. (2008) Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Arch Physiol Biochem* 114: 1832194.
50. Rodino-Janeiro BK, Salgado-Somoza A, Teijeira-Fernandez E, Gonzalez-Juanatey JR, Alvarez E, et al. (2011) Receptor for advanced glycation end-products expression in subcutaneous adipose tissue is related to coronary artery disease. *Eur J Endocrinol* 164: 5292537.
51. Leuner B, Max M, Thamm K, Kausler C, Yakobus Y, et al. (2012) RAGE influences obesity in mice. Effects of the presence of RAGE on weight gain, AGE accumulation, and insulin levels in mice on a high fat diet. *Z Gerontol Geriatr* 45: 1022108.
52. Unoki H, Yamagishi S (2008) Advanced glycation end products and insulin resistance. *Curr Pharm Des* 14: 9872989.
53. Unoki H, Bujo H, Yamagishi S, Takeuchi M, Imaizumi T, et al. (2007) Advanced glycation end products attenuate cellular insulin sensitivity by increasing the generation of intracellular reactive oxygen species in adipocytes. *Diabetes Res Clin Pract* 76: 2362244.
54. Wendt T, Harja E, Bucciarelli L, Qu W, Lu Y, et al. (2006) RAGE modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model of type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 185: 70277.
55. Flyvbjerg A, Denner L, Schrijvers BF, Tilton RG, Mogensen TH, et al. (2004) Long-term renal effects of a neutralizing RAGE antibody in obese type 2 diabetic mice. *Diabetes* 53: 1662172.
56. Rotter V, Nagaev I, Smith U (2003) Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 278: 45777245784.
57. Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, et al. (2005) The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med* 201: 113521143.

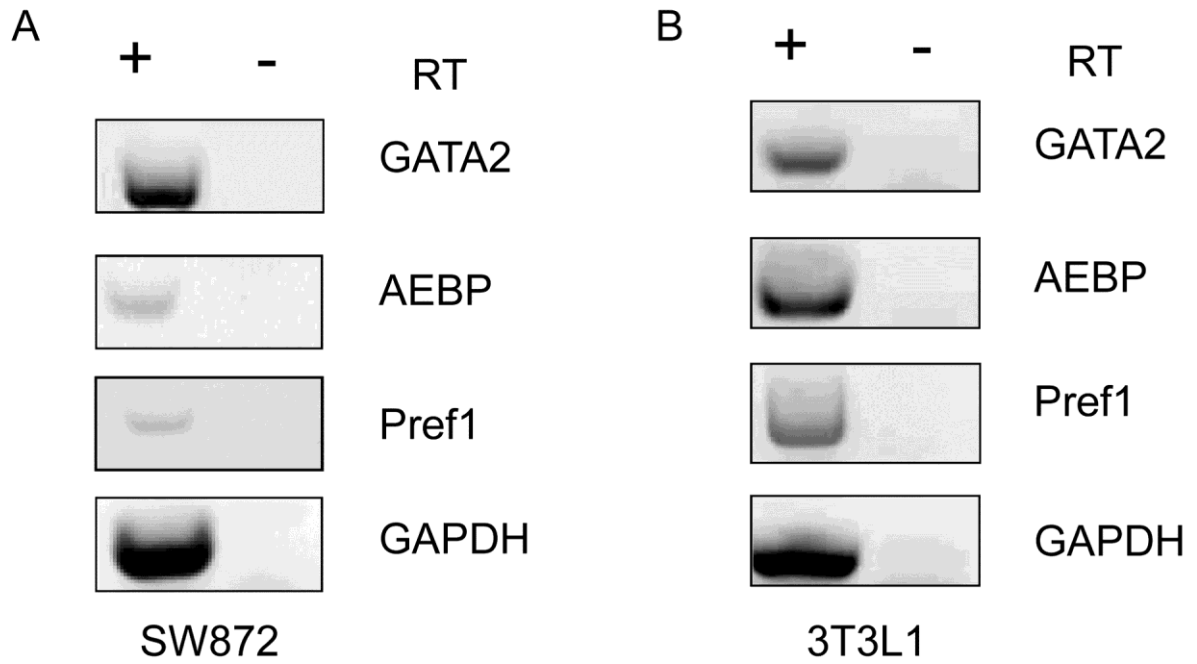


Figure S1: Preadipocyte markers expression in SW872 and 3T3L1 cell lines. Expression of Pref-1, GATA2, AEBP by RT-PCR from total RNA obtained from SW872 cell after 12 h in culture (A) or from 3T3L1 after 16h in culture, with (+) and without (-) Reverse Transcriptase (RT). GAPDH served as housekeeping gene.

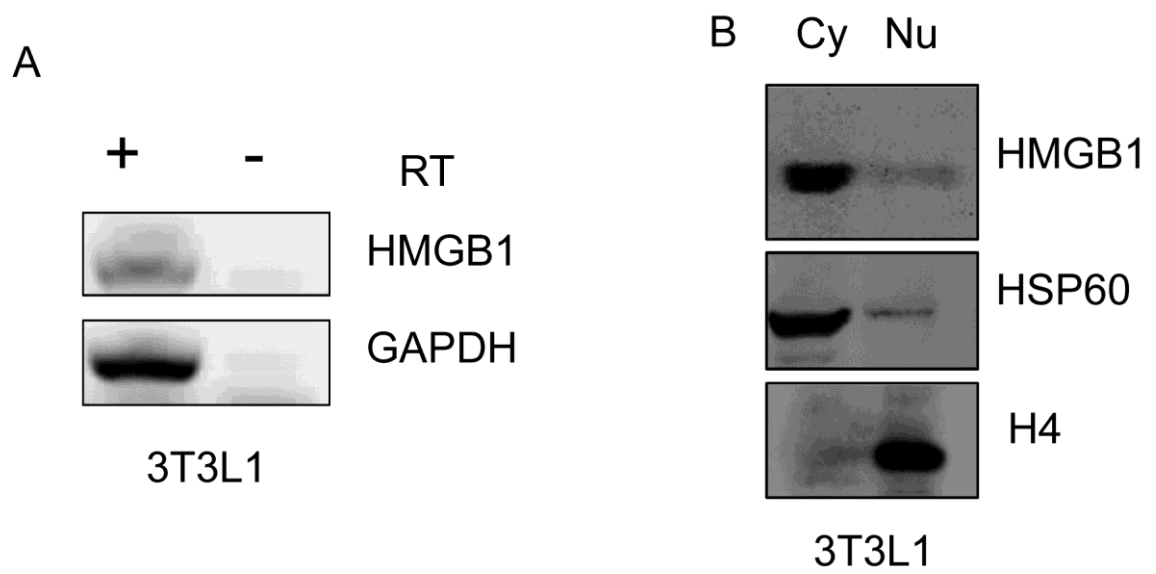


Figure S2: HMGB1 expression and localization in the human preadipocyte cell line 3T3L1. A) Expression of HMGB1 by RT-PCR from total RNA obtained from 3T3L1 cell culture after 16h in culture, with (+) and without (-) Reverse Transcriptase (RT). B) Detection of HMGB1 protein in different cell fractions by Western blot analysis. HSP60 is a cytoplasmic protein (Cy) (Antibody from Sigma-aldrich clone LK2) and H4 a nuclear protein (Nu) (Antibody from Santa-Cruz Biotechnology sc-10810).

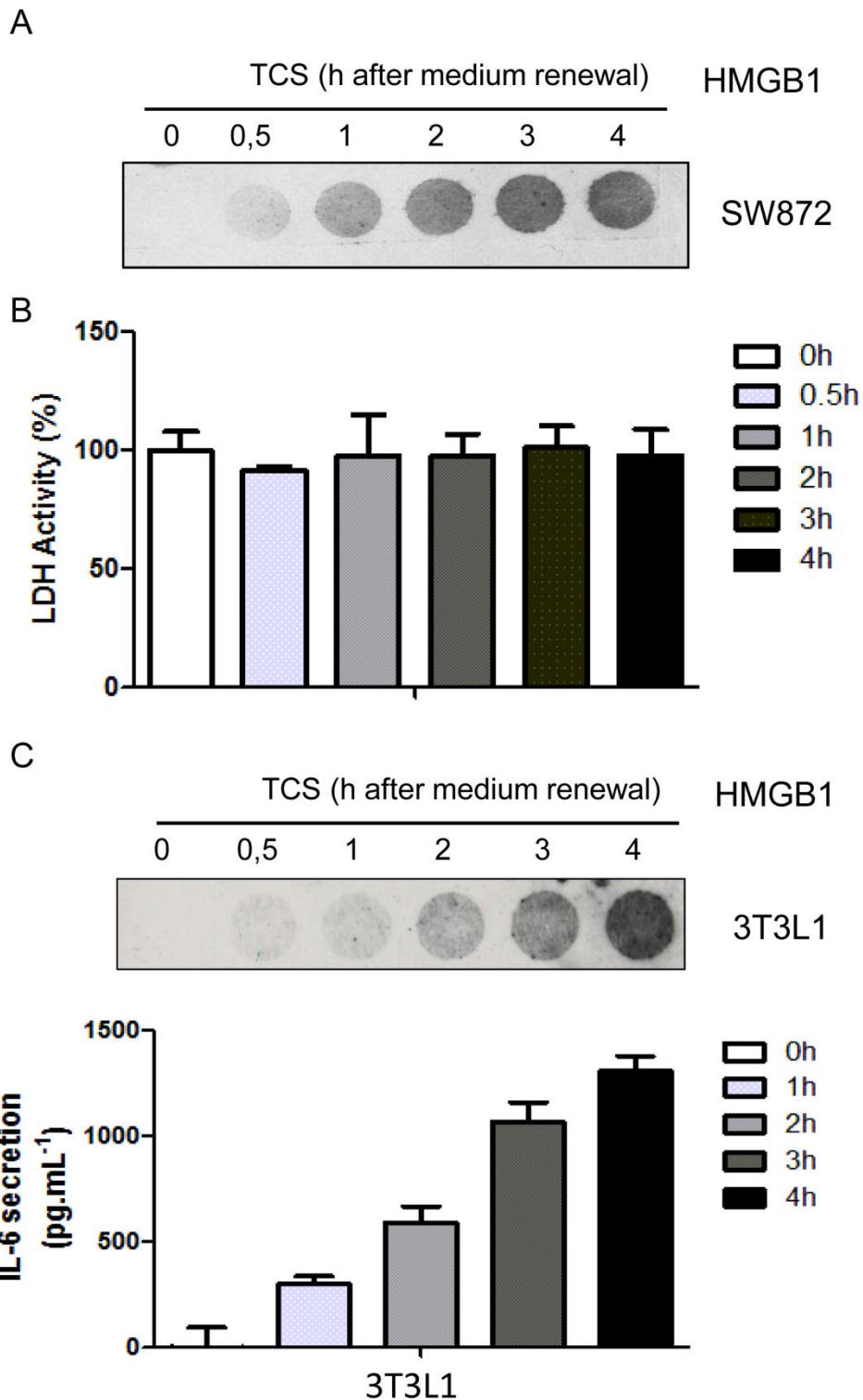


Figure S3: SW872 and 3T3L1 releases actively HMGB1 in cell culture media. A) Quantification of HMGB1 secretion after renewal of cell culture media from SW872 cells in time dependent manner by Dot-blot analysis. B) LDH assay on cell culture media from SW872 from A) according to manufacturer instructions (Sigma-aldrich). C) Quantification of HMGB1 and IL-6 secretion after renewal of cell culture media from 3T3L1 cells in time dependent manner by respectively by Dot-blot and ELISA assays.

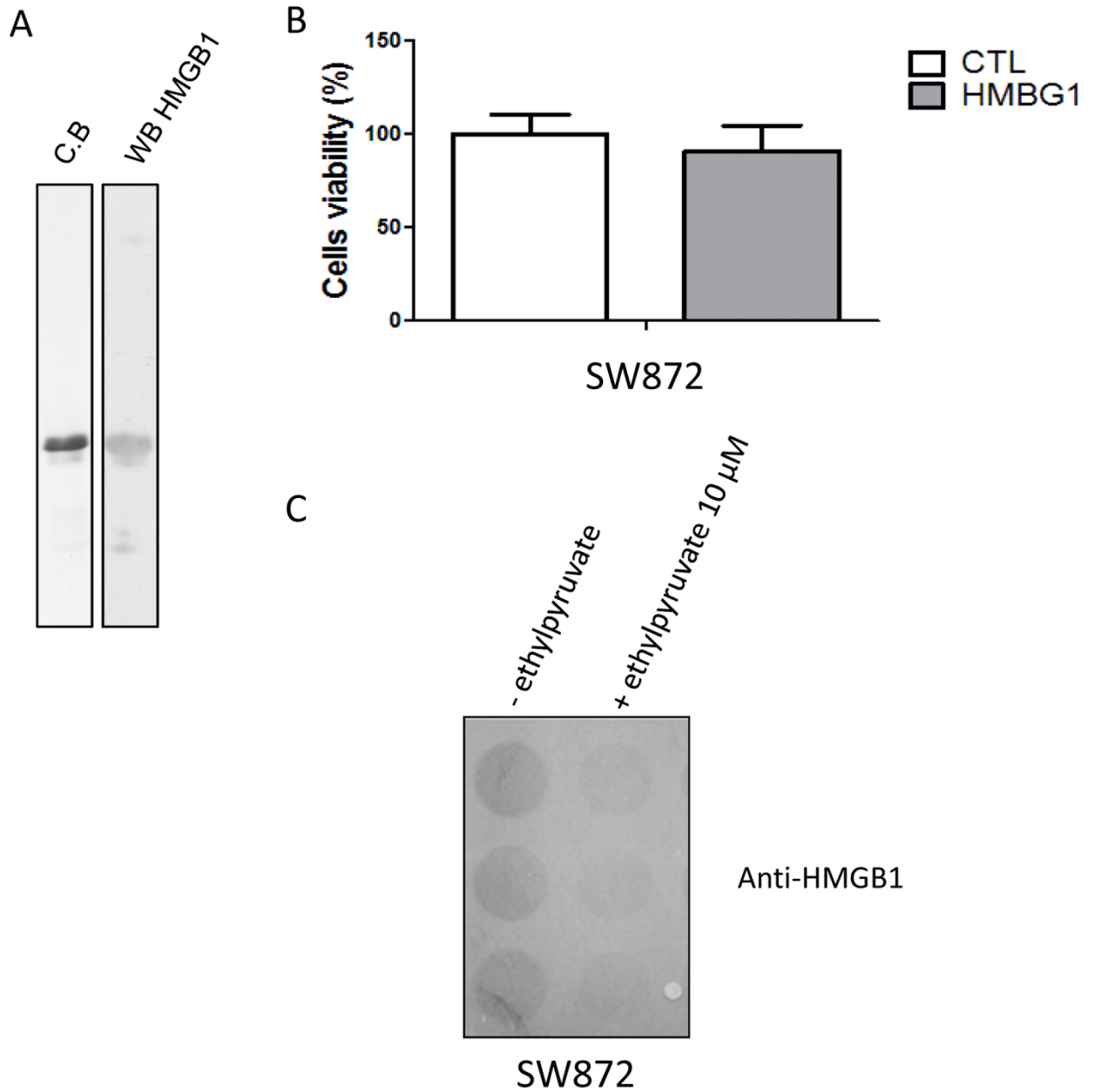
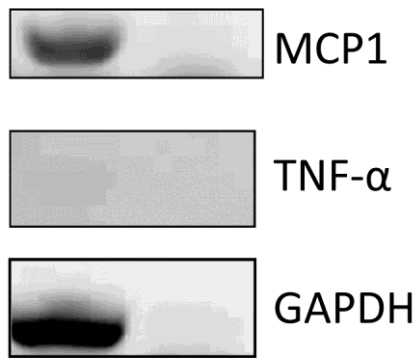


Figure S4: HMGB1 inhibition downregulates IL6 re-lease. A) Biochemical evaluation of HMGB1 purity by SDS-PAGE followed by Coomassie Blue staining or Western blotting with HMGB1 antibody (2F6 from Sigma-aldrich). B) Cytotoxicity evaluation of rHMGB1 on SW872 cell line using MTT assay according to manufacturer's instructions (Sigma-aldrich). C) Impact of ethylpyruvate on HMGB1 secretion by Dot-blot analysis.



3T3L1

Figure S5: MCP1 (CCL2) and TNF α mRNA expression. MCP1 and TNF α mRNA expression were assessed by RT-PCR from total RNA obtained from 3T3L1 cells after 12h of culture, with (+) and without (2) Reverse Transcriptase (RT).

Gene	Genre	Genbank	Primers	Sequences	Amplimer Size (pb)
GAPDH	mouse	NM_008084.2	Forward	5'- CATCACCATCTCCAGGAGCG -3'	443
			Reverse	5'- TGACCTTGCCACAGCCTTG -3'	
HMGB1	mouse	NM_010439.3	Forward	5'- ATGAGAAGGATATTGCTGCCTACAG -3'	201
			Reverse	5'- CTGCGCTAGAACCAACTTATTCATC -3'	
IL-6	mouse	NM_031168.1	Forward	5'- ACAACCACGGCCTTCCCTACTT -3'	129
			Reverse	5'- CACGATTTCCAGAGAACATGTG -3'	
MCP1	mouse	NM_011333.3	Forward	5'- CACTCACCTGCTGCTACTCA -3'	117
			Reverse	5'- GCTTGGTGACAAAACTACAGC -3'	
TNF- α	mouse	NM_013693.2	Forward	5'- GGGCCACCACGCTCTTC -3'	151
			Reverse	5'- GCTACAGGCTTGTCACTCGAATT -3'	
GATA2	human	NM_001145661.1	Forward	5'- TGGGCTAGGGAACAGATGGA -3'	492
			Reverse	5'- GAGGAGAAGAGGGTGCAGGC -3'	
	mouse	NM_008090.5	Forward	5'- TGCAACACACCACCCGATAC -3'	180
			Reverse	5'- GCACCACAGTTGACACTC -3'	
AEBP	human	NM_001129.3	Forward	5'- AGGGCTTCCTGTCAGAGCTA -3'	225
			Reverse	5'- GGGACCCCTCCAAGGACT -3'	
	mouse	NM_009636.2	Forward	5'- GCAGCGGGCAGATGTAGAA -3'	274
			Reverse	5'- GAACTTCTTCTGCCGAGG -3'	
Pref1	human	NM_003836.5	Forward	5'- CACCTATGGGGCTGAATGCTT -3'	313
			Reverse	5'- GCAGTCCTTCCCGAGTACC -3'	
	mouse	NM_010052.5	Forward	5'- GACCCACCCTGTGACCCC -3'	757
			Reverse	5'- CAGGCAGCTCGTGACCCC -3'	

Table S1: List of primers used in this study for RT-PCR on 3T3L1 and SW872 RNA.

3. Etude 3: Recombinant human HSP60 produced in ClearColi™ BL21(DE3) does not activate the NFκB pathway

Article publié + résultats complémentaires

Introduction:

HSP60 est une protéine chaperonne intracellulaire, décrite comme une alarmine ou DAMP lorsqu'elle est libérée en dehors de la cellule. Lorsque HPS60 interagit avec ses récepteurs, cela induit une cascade de signalisation impliquant la voie NF-κB, conduisant à la production de cytokines inflammatoires. De récentes publications suggèrent que HSP60 seul ne serait pas capable d'induire une inflammation, celle-ci serait due à la présence d'endotoxines lors de la préparation de la protéine. Le but de cette étude est d'évaluer les propriétés inflammatoires de la protéine HSP60 et d'analyser la contribution de la liaison du LPS à HSP60 sur l'inflammation. Nous allons également examiner l'interaction entre CD93 et HSP60.

Méthodologie:

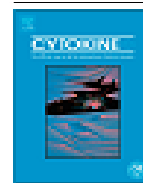
- Production et purification de HSP60 recombinant en bactérie BL21 classique et ClearColi™ (« endotoxine free »).
- Extraction et purification des LPS de bactérie BL21 classique et ClearColi™.
- Analyse de la réponse inflammatoire des monocytes par le LPS purifié, par l'activation de la voie NF-κB par mesure de l'activité NF-κB/SEAP sera analysée.
- Exploration de la réponse inflammatoire des monocytes induite par HSP60 purifié. Pour cela nous allons mesurer la production de cytokines inflammatoires par ELISA. Nous allons également mesurer l'activation de la voie NF-κB par mesure de l'activité NF-κB /SEAP.
- Analyse de la réponse inflammatoire des monocytes par la liaison HPS60 et LPS. Parallèlement à cela, nous mesurerons l'activation de la voie NF-κB par mesure de l'activité NF-κB /SEAP.
- Etude de l'interaction entre le CTLD-CD93 et HSP60. Pour cela nous allons réaliser un « ELISA interaction » et un pull-down.

Résultats:

Nous avons mis en évidence que le LPS et la protéine HSP60 produite en bactérie « endotoxine free » n'étaient pas capable d'induire une inflammation contrairement à celles produites en bactérie classique. De plus nous avons montré que HSP60 associé à du LPS serait capable d'induire une inflammation plus importante que le LPS seul. Nous avons également montré que le HSP60 était capable d'interagir avec le CTLD de CD93.

Conclusion:

Ces résultats nous montrent que la protéine HSP60 n'est pas capable d'induire une inflammation à elle seule. HSP60 aurait donc besoin de se lier à un PAMP (LPS) pour induire une inflammation via la voie NF- κ B. Durant une infection microbienne, HSP60 libérée dans le milieu extracellulaire interagit avec le LPS et agit comme alarmine. Il permettrait ainsi de faciliter la reconnaissance des microbes en diminuant le seuil de détection du LPS. Enfin, CD93 pourrait être également un nouveau récepteur de HSP60.



Recombinant human HSP60 produced in ClearColi™ BL21(DE3) does not activate the NFκB pathway



Cynthia Planesse^{a,1}, Brice Nativel^{a,b,1}, Thomas Iwema^b, Philippe Gasque^b, Christine Robert-Da Silva^{a,2}, Wildriss Viranaïcken^{b,2,†}

^a GEICO, EA4516, Groupe d'Etude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité, Université de La Réunion et plateforme CYROI, 15, Avenue René Cassin, BP 7151, 97715 Saint Denis Messag. Cedex 9, Reunion

^b GRI, EA4517, Groupe de Recherche Immunopathologie et maladies Infectieuses, Université de La Réunion et plateforme CYROI, 15, Avenue René Cassin, BP 7151, 97715 Saint Denis Messag. Cedex 9, Reunion

article info

Article history:

Received 7 November 2014

Received in revised form 14 January 2015

Accepted 22 January 2015

Keywords:

HSP60 recombinant protein

ClearColi BL21(DE3)

Cytokine

NFκB

abstract

HSP60, an intracellular molecular chaperone has been largely described as an alarmin or damage-associated molecular pattern when released outside the cell. HSP60 has been reported as a possible ligand of TLR2 or TLR4 inducing NFκB-dependent signaling pathway leading to cytokine secretion. However, recent publications suggested that HSP60 could not act as an activator of TLR4 by itself. The observed effect could be due to the presence of endotoxin in HSP60 preparation especially LPS. In order to clarify the controversy, we produced recombinant human HSP60 in two different strains of *Escherichia coli*, standard strain for protein overproduction, BL21(DE3), and the new ClearColi BL21(DE3) strain which lacks LPS-activity through TLR4. Undoubtedly, we have shown that recombinant HSP60 by itself was not able to induce NFκB-dependent signaling pathway in a model of THP1 monocyte cell line. Our data suggest that HSP60 needs either pathogen-associated molecules, specific post-translational modification and/or other host factors to activate immune cells via NFκB activation.

2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Heat shock proteins (HSPs) are a group of proteins highly conserved during evolution. HSPs are molecular chaperones which assist the refolding of non-native or misfolded proteins. Thus, HSPs help proteins to recover their complete function or provoke their proteolytic degradation [1,2]. Mitochondrial 60 kDa-heat shock proteins (HSP60) belong to the family of type I chaperonins.

Abbreviations: APC, antigen presenting cells; CD14, cluster of differentiation 14; DAMP, damage-associated molecular pattern; exHSP60, extracellular 60 kDa-heat shock protein; GST, glutathion-S-transferase; HSP, heat shock proteins; HSP60, 60 kDa-heat shock protein; hTNF-α, human tumor necrosis factor α; LPS, lipopolysaccharide; MD2, myeloid differentiation 2; NFκB, nuclear factor kappa B; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; PMB, polymixin B; rhHSP60, recombinant human 60 kDa-heat shock protein; RPMI medium, Roswell Park Memorial Institute medium; SEAP, secreted alkaline phosphatase; TLR2, toll-like receptor 2; TLR4, toll-like receptor 4.

† Corresponding author at: Laboratoire GRI, Université de La Réunion and plateforme CYROI, 15, Avenue René Cassin, BP 7151, 97715 Saint Denis Messag. Cedex 9, Reunion. Tel.: +262 262 93 88 29.

E-mail address: wildriss.viranaicken@univ-reunion.fr (W. Viranaïcken).¹ These two authors contribute equally to this work.

² Co-authors seniorship.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.01.0281043-4666/>
2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

HSP60 plays a key role as a shuttle of newly translated, translocated and stress-denatured or misfolded proteins [3].

HSP60 is able to stimulate innate and adaptive immunity [4,5]. During stress in prokaryotic or eukaryotic cells, it has been shown that the synthesis of HSP60 was up-regulated. This up-regulation occurred also under viral and bacterial infections, autoimmune or metabolic disorders [6–9]. Although HSP60 localizes primarily within mitochondria, its localization can also change when its level of expression is dramatically increased. These proteins can be exposed on the cell surface or released into the extracellular space [10–14]. Since 1993, HSP60 preparations from diverse sources (bacteria, mammalian and human tissues) were shown to activate the innate immune system. Indeed, extracellular HSP60 (exHSP60) has been considered as an alarmin or a Damage-Associated Molecular Pattern (DAMP) [15–19]. Interestingly, HSP60 cytokine effect was mediated by Toll-Like Receptor (TLR) 2 (TLR2) and TLR4 signal transduction pathway which triggers the activation of Nuclear Factor kappa B (NFκB) in different cells types [20–22]. CD14, which was required for the interaction between lipopolysaccharide (LPS) and TLR4, was shown to be necessary for exHsp60-mediated inflammatory signaling [23].

Most of the experiments revealing exHSP60 as an activator of the NFκB pathway in immune cells have been performed using recombinant HSP60 overexpressed and purified from *Escherichia coli*. It is well known that one HSP60 molecule can bind to two LPS molecules with high affinity, after overexpression and purification from *E. coli* bacteria LPS [24]. Between 1993 and 2002, to assess a specific HSP60 effect on NFκB activation, authors used essentially an inhibitor of LPS mediated inflammation without any decrease in HSP60 cytokine effect (polymixin B, PMB) or heat-denatured of HSP60 [4,20,25–27]. In 2003, Gao and Tsan did not observe any cytokine effect when highly purified HSP60 from *E. coli* was used [28]. Hence, the function of exHSP60 in the immune system remains disputed [24,29–31]. More recent studies using recombinant proteins still associate cytokine effects to HSP60 but without addressing the possible contribution of contaminating LPS [16,25,32].

To clarify this controversy, we have used here a new host for bacterial protein overexpression. We prepared recombinant human HSP60 (rhHSP60) using new commercially available strain of *E. coli* called ClearColi BL21(DE3). ClearColi BL21(DE3) bacteria was genetically engineered to express a modified LPS. This modified LPS did not trigger the endotoxic TLR4-dependent response in mammalian cells. Using this system, we found that our recombinant HSP60 was not able to induce NFκB dependant pathway. Thus, we suggest that HSP60 by itself has no cytokine effect in immune cells through the TLR4-NFκB pathway.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

All reagents were from Sigma–Aldrich (Sigma–Aldrich, France), excepted when indicated.

2.2. LPS extraction

LPS extraction from standard BL21(DE3) (Invitrogen, Life Technologies, France) or ClearColi BL21(DE3) strain (Lucigen, Euromedex, France) was performed as described [33,34]. No proteins and nucleic acid contaminations were found using respectively SDS–PAGE analysis followed by silver staining or GelRed agarose gel electrophoresis. LPS were quantified through the generation of lipid chromophore in the presence of concentrated sulfuric acid and at a k_{max} of 300 nm [35]. Briefly 20 μL of each LPS preparation was treated for 20 min at 90 °C with 100 μL of concentrated sulfuric acid (95% v/v). Reactions were stopped in ice water bath and absorption at 300 nm was recorded using an UV–visible spectrophotometer (UV mini 1240, Shimadzu, Japan). Commercially available LPS (L2630) was used to generate a standard curve.

2.3. Protein expression

The plasmids used during this study were pGEX-4T-1 (GE, Amersham, France) and pGEX-4T-1 GST-rhHSP60 from Dr. Altieri (The Wistar institute). They were transformed into two different strains of *E. coli*, standard BL21(DE3) and ClearColi BL21(DE3). Clones were grown in 50 mL LB medium with Ampicillin at 37 °C overnight at 200 rpm. The 50 mL overnight culture was put in 1L of 2YT medium with Ampicillin. The expression of human GST-rhHSP60 was induced at an OD of 0.6 with 1 mmol L⁻¹ isopropyl beta-D-thiogalactoside (IPTG) and left at 37 °C during 3 h at 200 rpm. Then, bacteria suspensions were centrifuged at 3000 g during 20 min at 4 °C. The pellets were frozen at -20 °C or used directly for the following stage.

2.4. Protein purification

The pellets were suspended in 10 mL of cold Lysis Buffer 0.5% Triton X100 in PBS with 1 tablet EDTA-free protease inhibitor (Roche Diagnostic, France). Lysis of bacteria were performed by sonication (Misonix ultrasonic liquid processor, France) at 80% of amplitude for 2 min, with 10 s of burst and 10 s of pause, maintained constantly in the ice. Lysates were centrifuged at 15,000g for 10 min at 4 °C. The supernatants were loaded on 0.5 mL of Glutathione Sepharose 4B column (GE, Amersham, France). The column was washed with 10 column volumes with storage buffer (25 mmol.L⁻¹ HEPES, 150 mmol.L⁻¹ NaCl).

Then 20 units mL⁻¹ thrombin in 500 μL of storage buffer were added in the recapped column. The column was incubated on a roller mixer at room temperature for 2 h incubation. After the incubation step, rhHSP60 was recovered in the flow through and GST remained bound to the column. For all experiments using rhHSP60, the negative control was obtained using the flow through of GST-expressing bacteria as starting materials.

All recombinant proteins were stored at -80 °C after a flash frozen step in liquid nitrogen. Protein purifications were monitored by SDS–PAGE followed by Coomassie blue staining. We also performed GelRed agarose gel electrophoresis to be sure that recombinant protein preparation lacks DNA or RNA. The proteins were quantified by bicinchoninic acid assay (BCA Assay). Recombinant proteins were finally analyzed by 12.5% SDS–PAGE, and proteins were visualized with Coomassie blue staining (Biorad) as before [36].

2.5. Cell line culture

THP1 (ATCC TIB-202™) human monocyte cell lines and THP1-XBlue-CD14-MD2 cells (Invivogen) were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium 1640 completed with 10% (v/v) Foetal Bovine Serum (FBS), 2 mmol.mL⁻¹ glutamine, 100 U.mL⁻¹ penicillin, 100 μg.mL⁻¹ streptomycin, 0.5 μg.mL⁻¹ amphotericin B (PAN Biotech, Germany) at 37 °C, 5% CO₂ in a humidified cell culture incubator.

2.6. Cells viability

THP1-XBlue-CD14-MD2 cells were plated in 24-well plates at a density of 5 × 10⁵ cells mL⁻¹ in MegaCell™ RPMI (PAN Biotech, Germany) without FBS and were treated with 5000 ng mL⁻¹ rhHSP60 purified from the standard BL21(DE3) or from ClearColi BL21(DE3) strain or 1000 ng.mL⁻¹ LPS (L2630). After 16 h treatment, viable cells were counted using a Malassez's counting chamber and trypan blue exclusion test of cell viability.

2.7. NFκB/SEAP activity

THP1-XBlue-CD14-MD2 cells were plated in 96-well plates at a density of 5 × 10⁵ cells mL⁻¹ in MegaCell™ RPMI (PAN Biotech, Germany) without FBS and were treated during 16 h with different concentrations of GST, GST-rhHSP60 or rhHSP60 (dilution from 0 to 5000 ng.mL⁻¹) or LPS (dilution from 0 to 1000 ng.mL⁻¹), purified from the standard BL21(DE3) or from ClearColi BL21(DE3) bacteria. For treatment with LPS-HSP60 complex, HSP60 (10 μg.mL⁻¹), LPS (2 ng.mL⁻¹) or LPS (2 ng mL⁻¹) mixed with HSP60 (10 μg.mL⁻¹) were incubated in PBS at 37 °C for 2 h, then these preparations were diluted ten-fold in MegaCell™ RPMI and THP1-XBlue-CD14-MD2 cells were treated with this media as above. NFκB/ SEAP activity was evaluated in the supernatants using Quanti-blue as described by supplier (Invivogen, France).

2.8. TNF α quantification

THP1 cells were plated in 96-well plates at a density of 5×10^5 cells.mL⁻¹ and pre-treated with 10 ng.mL⁻¹ PMA in complete RPMI medium for 48 h. PMA-treated THP-1 cells were exposed, in MegaCell™ RPMI without FBS, to purified rhHSP60 ClearColi BL21(DE3) at 2500 ng mL⁻¹ or LPS at 1000 ng.mL⁻¹ during 6 h. Supernatants were collected and the amount of TNF- α was measured by ELISA (Ready-SET-Go! , e-bioscience, Austria) according to the manufacturer's protocols.

2.9. Statistical analysis

All data are presented as means \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using 1992–2007 GraphPad Prism 5 Software, Inc. One-way ANOVA, followed by Turkey's test were performed to compare each treatments. P values < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. LPS extracted from ClearColi BL21(DE3) does not induce NF κ B activation

We decided to use the new ClearColi BL21(DE3) strain to make sure that cytokine effect of rhHSP60 was not due to contamination with bacterial LPS. These ClearColi BL21(DE3) bacteria were genetically engineered in order to express a modified LPS that lacks two of the six acyl chains and the oligosaccharide part (Fig. 1). To our knowledge this is the first report using this strain, so we tested the capacity of the remaining lipid IV_A to activate the NF κ B pathway in a THP1-XBlue-CD14-MD2 experimental model which expressed all TLRs, NOD1 and NOD2 [37]. First, using the hot phe-nol extraction protocol, we extracted LPS from the conventional strain of *E. coli* used for recombinant production of proteins, BL21(DE3), or from the new ClearColi BL21(DE3) strain. As the conventional Limulus Amebocyte Lysate (LAL) activity were not adapted to quantify modified lipid IV_A (Fig. S1), the LPS content were quantified using lipid chromophore formation [35]. These two sources of LPS were used to test for their capacity to activate the expression of the NF κ B reporter gene, Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase (SEAP), in THP1-XBlue-CD14-MD2 cells. LPS extracted from BL21(DE3) strain triggered NF κ B activation with elevated SEAP activity and comparable to the commercially available LPS (LPS L2630). As expected, the LPS extracted from ClearColi BL21(DE3) strain displayed no significant effect on NF κ B/SEAP activity (Fig. 2 and S2). This result lead us to conclude that modified LPS (Lipid IV_A) from ClearColi BL21(DE3) bacteria did not trigger NF κ B response in our human monocyte cell line.

3.2. rhHSP60 purified from ClearColi BL21(DE3) lacks the capacity to induce NF κ B activation

Glutathion-S-Transferase (GST) and GST-rhHSP60 were produced in the two *E. coli* strains described above. In order to discard eventual GST-tag interference with rhHSP60 specific action, we have chosen to cleave the GST-tag with thrombin. The SDS-PAGE analysis confirmed the homogeneity of the protein solution (90–95%) and the removal of GST (Fig. 3). The Western blot confirmed rhHSP60 production and purification (Fig. S3A).

To determine the effect of these proteins on NF κ B signaling, we performed the NF κ B/SEAP activity test on THP1-XBlue-CD14-MD2 cells. rhHSP60 produced by standard BL21 (DE3) bacteria provoked a dose dependent activation of NF κ B. rhHSP60 expressed in ClearColi BL21(DE3) bacteria did not activate NF κ B (Fig. 3B).

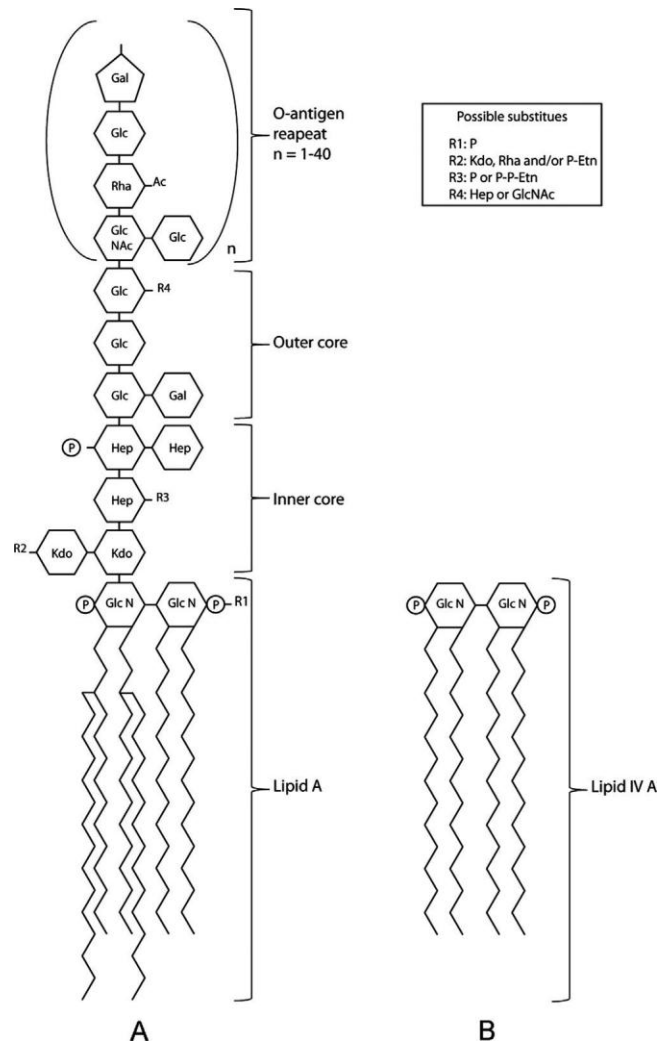


Fig. 1. ClearColi BL21(DE3) cells express a modified LPS. (A) LPS of *E. coli* consists of a polysaccharide region and is anchored in outer bacterial membrane by a carbohydrate lipid moiety (lipid A), which contains six fatty acyl groups responsible of the LPS immunostimulatory activity. (B) ClearColi modified LPS lacks the polysaccharide part and contains an underacylated lipid A with only four fatty acids (lipid IV_A).

To rule out any cytotoxic effect of the recombinant proteins used we have observed good viability of THP1 cells after all treatments using the trypan blue method (Fig. S3B).

As rhHSP60 produced in ClearColi was not able to activate NF κ B, we further tested the folding and biochemical properties of HSP60. We tested a native refolding for HSP60 produced in ClearColi using heat denaturation curve, ATP binding assay and chaperonin activity [38] (Fig. S4). We confirmed that HSP60 from ClearColi conserved its chaperonin property and had a native folded state.

In agreement with above observations, THP1-XBlue-CD14-MD2 cells treated with GST-rhHSP60 produce in ClearColi were not able to triggered NF κ B dependant response (Fig. S5B).

Some studies indicated that HSP60 pro-inflammatory effect can be related to unidentified receptor different from TLR2 and TLR4 [39]. We used another macrophage reporter cell line (RAW-Blue™). These cells are derived from RAW 264.7 macrophages which express TLR2 and 4 and also specific receptors for HSP60 [16,39]. We observed the same results as obtained for THP1-XBlue-CD14-MD2 (Fig. S5C). All together these results showed that HSP60 produced in ClearColi BL21(DE3) strain does not by itself signal through the NF κ B pathway.

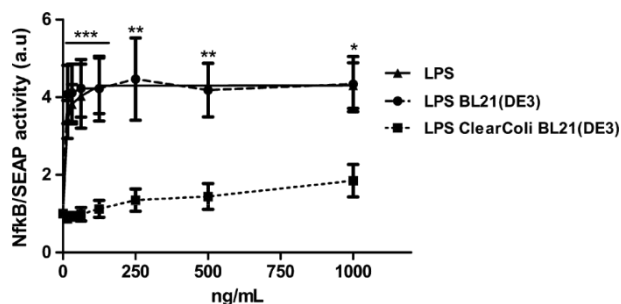


Fig. 2. LPS extracted from ClearColi BL21(DE3) strain did not activate NFκB/SEAP production in human THP1 monocyte cell line. THP1-XBlue-CD14-MD2 cells ($5 \cdot 10^5$ cells.mL⁻¹) were treated with different concentrations (from 0 to 1000 ng mL⁻¹) of LPS extracted from the standard BL21(DE3) (d) or from ClearColi BL21(DE3) strain (j) during 16 h. The results were normalized to the control (cells treated with storage buffer). The commercial LPS (N) is used as the positive control. Results are presented as the mean \pm SEM from 3 independent experiments. Differences were determined by One-way ANOVA Turkey's test: * difference ($P < 0.05$) and ** difference ($P < 0.01$) and *** difference ($P < 0.001$) between LPS from standard BL21(DE3) and LPS from ClearColi BL21(DE3) strain. No difference between LPS of BL21(DE3) bacteria and LPS ($P > 0.05$).

3.3. TNF α secretion in PMA-treated THP1 stimulated by rhHSP60

Above experiments were based on NFκB/SEAP reporter gene assay. Given that TNF α is a prototypical inflammatory marker and used previously to screen for HSP60 activity on macrophages, we decided to test whether our recombinant HSP60 could affect TNF α secretion. We treated THP1 cells with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in order to optimize cytokine cell response [40]. Then, we treated these macrophage-like THP1 cells with rhHSP60 produced from ClearColi BL21(DE3) strain or the BL21(DE3) strain. LPS treatment confirmed that PMA-treated THP1 cells were able to respond to inflammation inducer and

released TNF α at high levels (Fig. S6). In contrast, rhHSP60 did not induce significant TNF α secretion (Fig. 4 and S6A). We also tested another major proinflammatory marker IL6 and failed to observe that IL6 secretion was affected by HSP60 (Fig. S6B). Altogether these observations suggested that rhHSP60 itself does not have any pro-inflammatory cytokine effect.

3.4. HSP60 potentialises the LPS-dependant activation of NFκB pathway

Using highly purified HSP60, it was previously shown that HSP60 can induce NFκB activation through TLR4 only in association with LPS [24,30]. Thus, HSP60 could potent LPS action. Hence, we tested if our HSP60 produced in ClearColi was able to transduce NFκB when it was prebound to low dose of LPS. We pre-incubated HSP60 with LPS and then we treated THP1-XBlue-CD14-MD2 cells with the complex (Fig. 5). LPS at this concentration alone activated only weakly NFκB pathway. When LPS was prebound to HSP60 this activation was increased significantly. These observations confirmed that HSP60 potent the pro-inflammatory effect of LPS and HSP60 needs LPS to transduce NFκB pathway in THP1 cells.

4. Discussion

Since 1993, numerous studies have shown that HSP60 was involved in innate immune system activation [22,41,42], and that HSP60 was a link between the innate and adaptive immune system [4,43–45]. Indeed, HSP60 was able to activate immune cells such as, macrophages, dendritic cells, B cells, T cells and others cells such as endothelial cells and adipocytes [20,22,32,45]. Moreover, numerous studies found that HSP60 could activate TLR2 and TLR4 signaling pathway upstream NFκB inflammatory factor [20,23,46]. TLR2 and TLR4 are known to be respectively involved

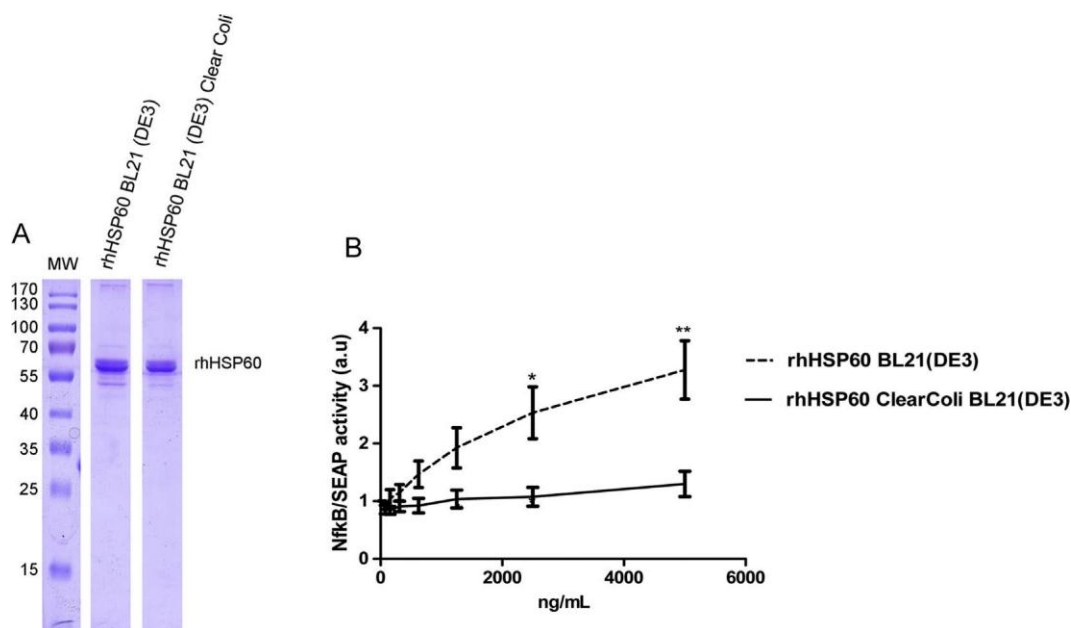


Fig. 3. Recombinant human HSP60 produced in ClearColi BL21(DE3) *E. coli* did not induce NFκB/SEAP activity in monocyte THP1 cell line. (A) Biochemical evaluation of rhHSP60 purity by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining. (B) THP1-XBlue-CD14-MD2 cells ($5 \cdot 10^5$ cells.mL⁻¹) were treated with different concentrations of rhHSP60 (from 0 to 5000 ng.mL⁻¹) produced in the standard BL21(DE3) (dotted line) or produced in ClearColi BL21(DE3) (solid line) during 16 h. Then NFκB/SEAP activity was evaluated in the supernatants using Quanti-blue. The results were normalized to the control. Results are presented as the mean \pm SEM from 3 independent experiments. Differences were determined by One-way ANOVA Turkey's test: * difference ($P < 0.05$) and ** difference ($P < 0.01$) between rhHSP60 produced in standard BL21(DE3) and rhHSP60 produced in ClearColi BL21(DE3). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

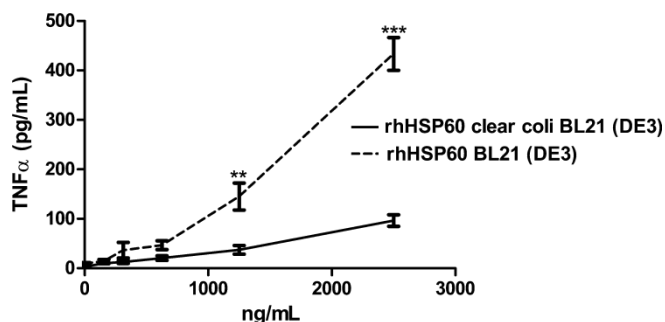


Fig. 4. rhHSP60 produced in ClearColi BL21(DE3) *E. coli* did not increase TNF α secretion from PMA-treated THP1. THP1 cells (5.10^5 cells.mL $^{-1}$) were first treated with 10 ng.mL $^{-1}$ PMA during 48 h then they were treated with different concentrations of rhHSP60 (from 0 to 2500 ng.mL $^{-1}$) produced in the standard BL21(DE3) (dotted line) or produced in ClearColi BL21(DE3) (solid line) during 6 h. TNF α quantification in the supernatant was performed by ELISA. Results are presented as the mean \pm SEM from 3 independent experiments. Differences were determined by One-way ANOVA Turkey's test: ** difference ($P < 0.01$) and *** difference ($P < 0.001$) between rhHSP60 produced in standard BL21(DE3) and rhHSP60 produced in ClearColi BL21(DE3).

in Gram-positive bacteria (lipopeptides or peptidoglycans) and Gram-negative bacteria (lipopolysaccharides) recognitions [47,48].

In this study, we have first checked that ClearColi BL21(DE3) strain had a non-endotoxic LPS using the in vitro model, THP1-XBlue-CD14-MD2 (Figs. 1 and 2), as considered by the supplier. We decided to use these endotoxin-free bacteria for recombinant human HSP60 expression. rhHSP60 did not provoke any pro-inflammatory response via NF κ B activation in THP1-XBlue-CD14-MD2 cells. Moreover rhHSP60 failed to modulate TNF- α secretion in PMA-treated THP1 cells (Fig. 3 and 4). However, HSP60 pre-bound to LPS was able to induce NF κ B (Fig. 5).

In studies dealing with HSP60 inflammatory response, recombinant proteins from the same supplier or produced in prokaryotic host have been used. As we have shown in the standard BL21(DE3) bacteria, these recombinant proteins are very likely contaminated by traces of LPS. Even when eukaryotic cells were used for HSP60 overexpression [16], other contaminants could be

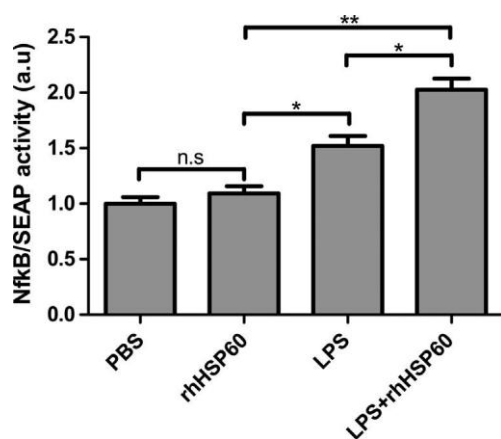


Fig. 5. rhHSP60 produced in ClearColi BL21(DE3) *E. coli* required LPS to induce NF κ B/SEAP activity in monocyte THP1 cell line. THP1-XBlue-CD14-MD2 cells (5.10^5 cells.mL $^{-1}$) were treated with LPS-HSP60 complex. HSP60 (10 μ g.mL $^{-1}$) produced in ClearColi BL21(DE3), LPS (2 ng.mL $^{-1}$) or LPS L2630 (2 ng.mL $^{-1}$) mixed with HSP60 (10 μ g.mL $^{-1}$) produced in ClearColi BL21(DE3), were incubated in PBS at 37 LC for 2 h, then these preparations were diluted ten-fold to cells during 16 h. NF κ B/SEAP activity was evaluated in the supernatants using Quanti-blue. The results were normalized to the controls. Results are presented as the mean \pm SEM from 3 independent experiments. Differences were determined by One-way ANOVA Turkey's test: * difference ($P < 0.05$) and ** difference ($P < 0.01$).

involved in the observed inflammatory effects [15,49] such as molecules presenting hydrophobic domain which bind to HSP60 [15]. All these studies considered HSP60 with low endotoxin using Limulus Amebocyte Lysate (LAL) assay or LPS inhibition with PMB. Nonetheless, it has been reported that HSP60 could bind LPS with high affinity and that this interaction could interfere with LPS inhibition or that the quantification of LPS could be underestimated [24,50,51]. Some experiments have used heat-denatured HSP60 as a negative control [24,29,48], but it is known that HSP60 could act as an enhancer in the presence of very low concentration of LPS [24,29].

Of critical note, we have used *E. coli* bacteria to produce recombinant human HSP60. This bacterially-expressed protein can lack post-translational modification or eukaryotic co-factors essential to induce cytokine release. Nevertheless, and as demonstrated since 2003 [24,48,49,52,53], we propose that highly purified recombinant HSP60 from *E. coli* does not induce cytokine responses in THP1 cells.

Recent studies suggested that HSP60 induced a specific IFN α production in professional Antigen Presenting Cells (APC), in contrast to LPS which induced IFN production and the NF κ B pathway [29,30]. Moreover, it has been shown that HSP60 induced myocyte apoptosis via TLR4 signaling pathway [54]. It would be interesting to clarify and revisit alarmin activity in immune and non-immune cells using our HSP60 protein produced in ClearColi BL21(DE3) as all of these study used prokaryotic sources of human HSP60 [20,23,26,46].

5. Conclusion

To summarize, we proposed that inflammatory effect of HSP60 previously described, was due to effects of bacterial contaminants, such as LPS. This may have strong implication in bacterial infection settings. We suggest that HSP60 binds to LPS and acts as an alarmin carrier. So during bacterial infection extracellular HSP60 released from stressed-cells binds to LPS and facilitate microbe recognition by decreasing the threshold of LPS detection and enhancing TLR4 mediated NF κ B activation triggering pro-inflammatory cytokine expression such as TNF α .

Acknowledgments

We thank members of GRI and GEICO laboratories for helpful discussion. We thank Dario Altieri (The Wistar Institute, Philadelphia, Pennsylvania) for generous gift of pGEX 4T-1-GST-rhHSP60 plasmid and Szymon Swiezewski (IBB, Warszawa, Poland) for providing pQE-GFP.

This work was supported by "Federation Environnement Biodiversite Sante" from Reunion Island University and by CPER FEDER GRII Phase IV to PG. BN hold a fellowship from Regional council of Reunion Island.

Appendix A. Supplementary material

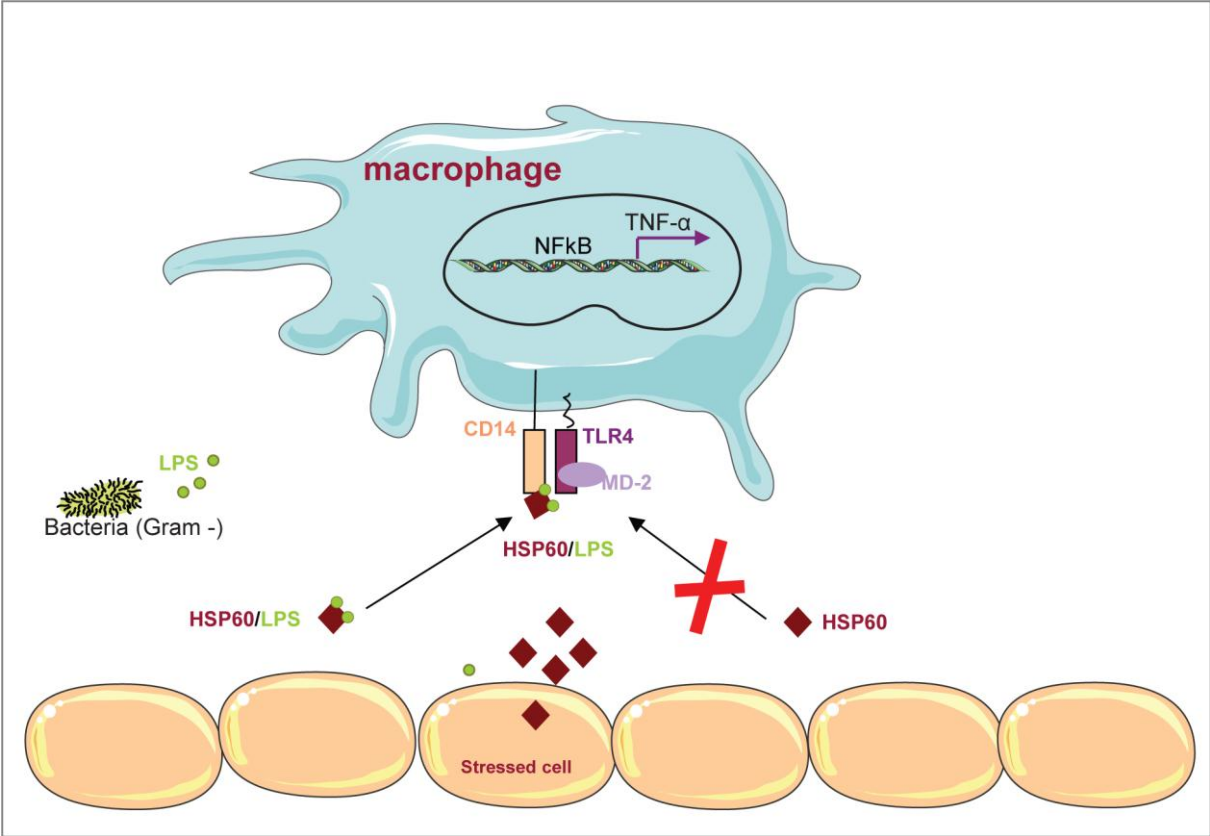
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.01.028>.

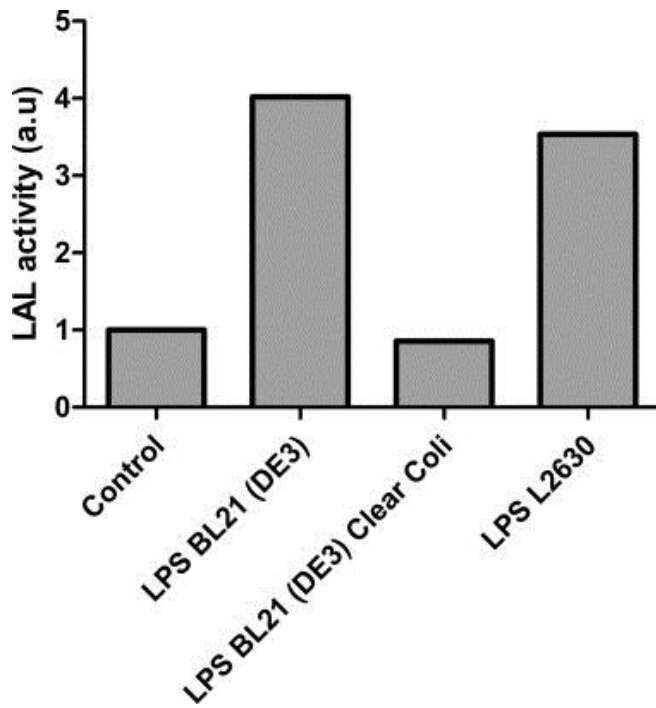
References

- Bukau B, Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 1998;92(3):351–66.
- Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996;381(6583):571–9.
- Levy-Rimler G et al. Type I chaperonins: not all are created equal. *FEBS Lett* 2002;529(1):1–5.

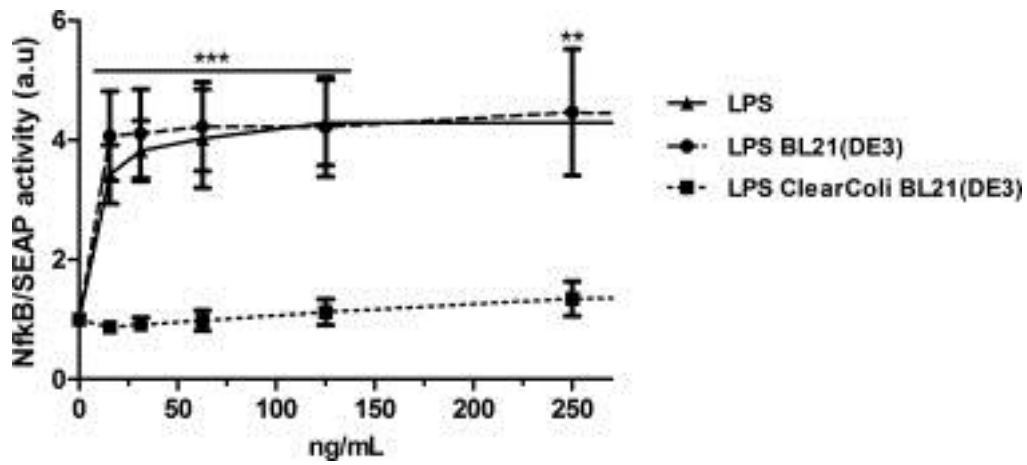
4. More SH, Breloer M, von Bonin A. Eukaryotic heat shock proteins as molecular links in innate and adaptive immune responses: Hsp60-mediated activation of cytotoxic T cells. *Int Immunol* 2001;13(9):1121–7.
5. Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2002;2(3):185–94.
6. Holoshitz J et al. T lymphocytes of rheumatoid arthritis patients show augmented reactivity to a fraction of mycobacteria cross-reactive with cartilage. *Lancet* 1986;2(8502):305–9.
7. Abulafia-Lapid R et al. T cell proliferative responses of type 1 diabetes patients and healthy individuals to human hsp60 and its peptides. *J Autoimmun* 1999;12(2):121–9.
8. Wheeler DS et al. Extracellular heat shock protein 60 (Hsp60) levels in children with septic shock. *Inflam Res* 2007;56(5):216–9.
9. Bianchi ME. DAMP, PAMP and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007;81(1):1–5.
10. Gillis TP et al. Immunochemical characterization of a protein associated with *Mycobacterium leprae* cell wall. *Infect Immun* 1985;49(2):371–7.
11. Wand-Wurtenberger A et al. Surface expression by mononuclear phagocytes of an epitope shared with mycobacterial heat shock protein 60. *Eur J Immunol* 1991;21(4):1089–92.
12. De Bruyn J et al. Purification, partial characterization, and identification of askin-reactive protein antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 1987;55(1):245–52.
13. Soltys BJ, Gupta RS. Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein (hsp60) in mammalian cells. *Cell Biol Int* 1997;21(5):315–20.
14. Tsan MF, Gao B. Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol* 2009;85(6):905–10.
15. Zhou L et al. Expression and purification of secreted recombinant hsp60 from eukaryotic cells. *Protein Expr Purif* 2010;72(2):179–83.
16. Basu S et al. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 2000;12(11):1539–46.
17. Retzlaff C et al. *Legionella pneumophila* heat-shock protein-induced increase of interleukin-1 beta mRNA involves protein kinase C signalling in macrophages. *Immunology* 1996;89(2):281–8.
18. Kol A et al. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest* 1999;103(4):571–7.
19. Bulut Y et al. Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. *J Immunol* 2002;168(3):1435–40.
20. Ohashi K et al. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000;164(2):558–61.
21. Bethke K et al. Different efficiency of heat shock proteins (HSP) to activate human monocytes and dendritic cells: superiority of HSP60. *J Immunol* 2002;169(11):6141–8.
22. Kol A et al. Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J Immunol* 2000;164(1):13–7.
23. Habich C et al. Heat shock protein 60: specific binding of lipopolysaccharide. *J Immunol* 2005;174(3):1298–305.
24. Lehnardt S et al. A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS. *J Neurosci* 2008;28(10):2320–31.
25. Cohen-Sfady M et al. Heat shock protein 60 activates B cells via the TLR4-MyD88 pathway. *J Immunol* 2005;175(6):3594–602.
26. Flohe SB et al. Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. *J Immunol* 2003;170(5):2340–8.
27. Gao B, Tsan MF. Recombinant human heat shock protein 60 does not induce the release of tumor necrosis factor alpha from murine macrophages. *J Biol Chem* 2003;278(25):22523–9.
28. Osterloh A et al. Synergistic and differential modulation of immune responses by Hsp60 and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 2007;282(7):4669–80.
29. Osterloh A et al. Hsp60-mediated T cell stimulation is independent of TLR4 and IL-12. *Int Immunol* 2008;20(3):433–43.
30. Erridge C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J Leukoc Biol* 2010;87(6):989–99.
31. Gulden E et al. Heat shock protein 60 induces inflammatory mediators in mouse adipocytes. *FEBS Lett* 2008;582(18):2731–6.
32. al-Hendy A, Toivanen P, Skurnik M. Rapid method for isolation and staining of bacterial lipopolysaccharide. *Microbiol Immunol* 1991;35(4):331–3.
33. Rezaia S et al. Extraction, purification and characterization of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Avicenna J Med Biotechnol* 2011;3(1):3–9.
34. Cheng YS, Zheng Y, VanderGheynst JS. Rapid quantitative analysis of lipids using a colorimetric method in a microplate format. *Lipids* 2011;46(1):95–103.
35. Nativel B et al. Soluble HMGB1 is a novel adipokine stimulating IL-6 secretion through RAGE receptor in SW872 preadipocyte cell line: contribution to chronic inflammation in fat tissue. *PLoS ONE* 2013;8(9):e76039.
36. Needham BD et al. Modulating the innate immune response by combinatorial engineering of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(4):1464–9.
37. Scheibel T et al. ATP-binding properties of human Hsp90. *J Biol Chem* 1997;272(30):18608–13.
38. Habich C et al. The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins. *J Immunol* 2002;168(2):569–76.
39. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol* 2014;23(1):37–45.
40. Chen W et al. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol* 1999;162(6):3212–9.
41. Habich C et al. Identification of the heat shock protein 60 epitope involved in receptor binding on macrophages. *FEBS Lett* 2004;568(1–3):65–9.
42. O'Brien RL et al. Heat shock protein Hsp60-reactive gamma delta cells: a large, diversified T-lymphocyte subset with highly focused specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(10):4348–52.
43. Breloer M, Fleischer B, von Bonin A. In vivo and in vitro activation of T cells after administration of Ag-negative heat shock proteins. *J Immunol* 1999;162(6):3141–7.
44. Breloer M et al. Macrophages as main inducers of IFN-gamma in T cells following administration of human and mouse heat shock protein 60. *Int Immunol* 2002;14(11):1247–53.
45. Vabulas RM et al. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* 2001;276(33):31332–9.
46. Beg AA. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol* 2002;23(11):509–12.
47. Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 2004;76(3):514–9.
48. Tsan MF. Heat shock proteins and high mobility group box 1 protein lack cytokine function. *J Leukoc Biol* 2011;89(6):847–53.
49. Wakelin SJ et al. "Dirty little secrets" – endotoxin contamination of recombinant proteins. *Immunol Lett* 2006;106(1):1–7.
50. Dentener MA et al. Antagonistic effects of lipopolysaccharide binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein on lipopolysaccharide-induced cytokine release by mononuclear phagocytes. Competition for binding to lipopolysaccharide. *J Immunol* 1993;151(8):4258–65.
51. Wallin RP et al. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol* 2002;23(3):130–5.
52. Wang Y, Gao B, Tsan MF. Induction of cytokines by heat shock proteins and concanavalin A in murine splenocytes. *Cytokine* 2005;32(3–4):149–54.
53. Kim SC et al. Extracellular heat shock protein 60, cardiac myocytes, and apoptosis. *Circ Res* 2009;105(12):1186–95.

Graphical Abstract

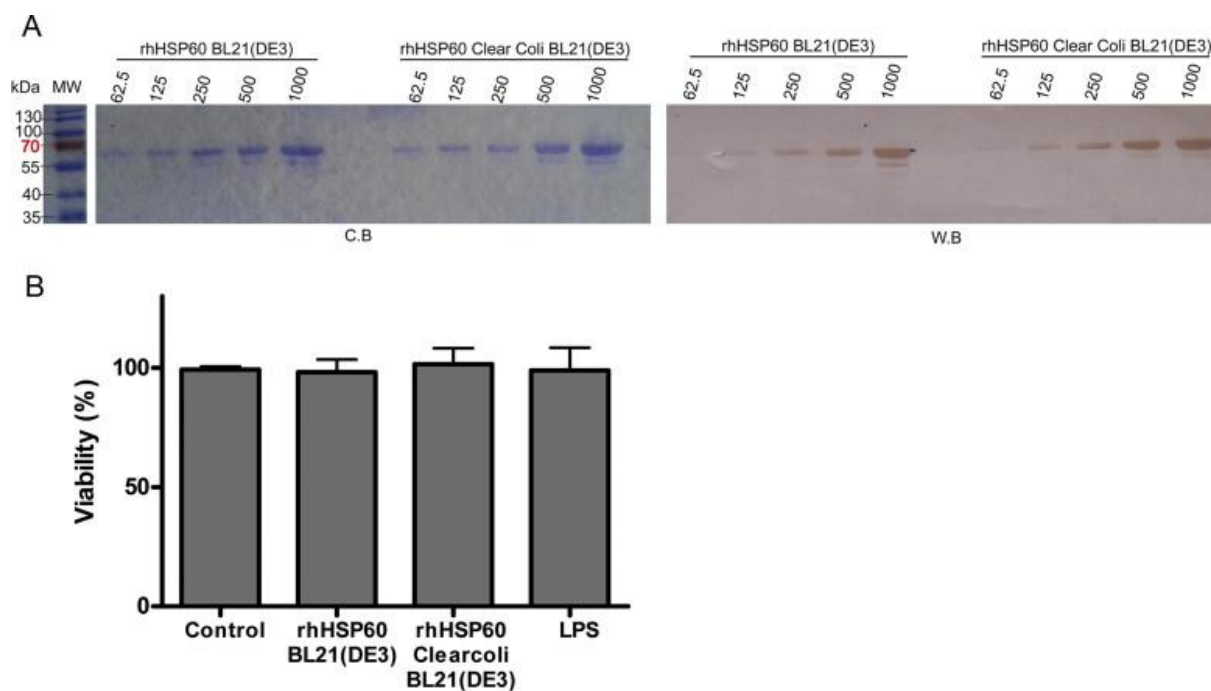




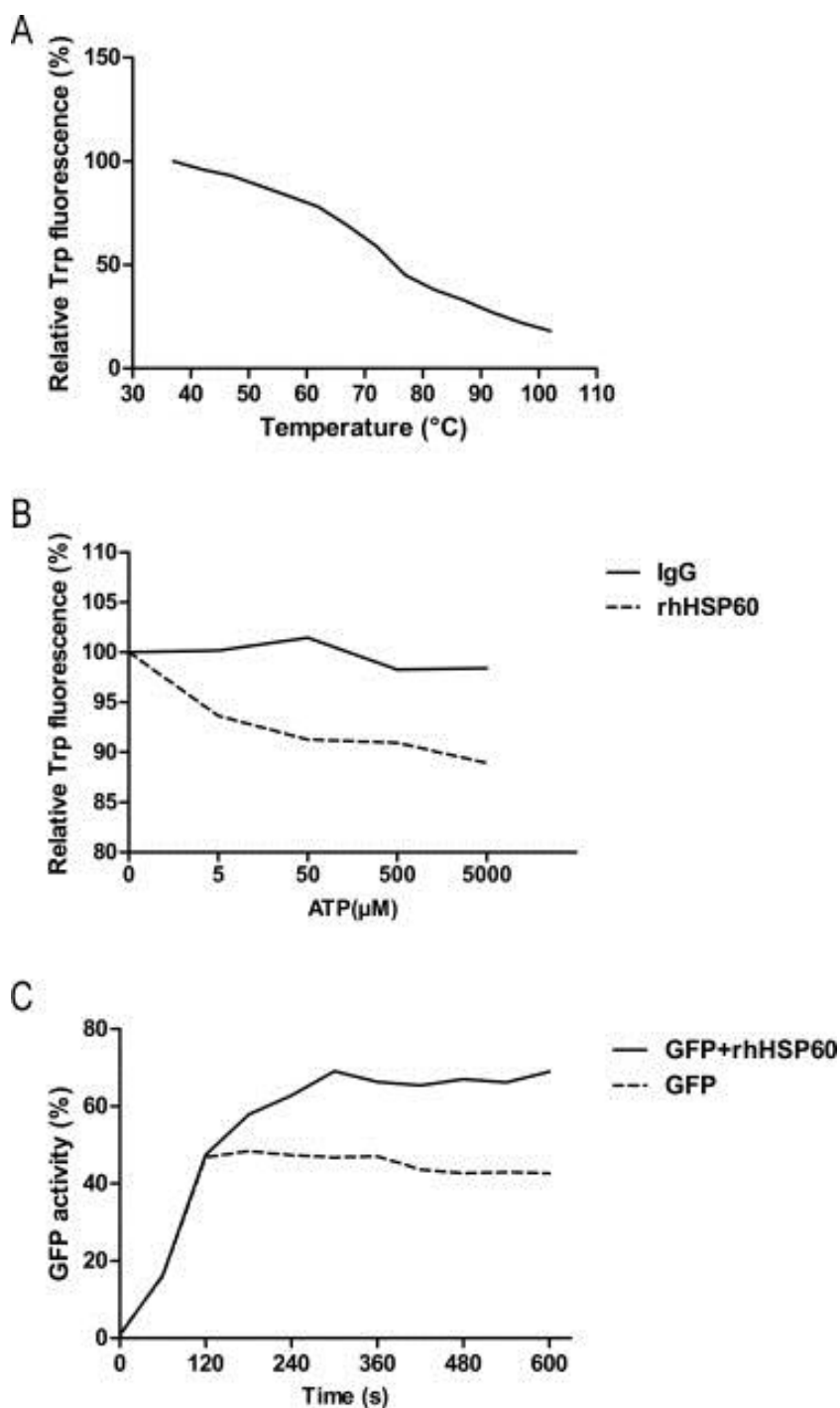
Supplementary Fig. S1. LPS quantification with LAL assay. LPS quantification using LAL assay kit (Hycult). The results were normalized to the control and were representative of two independent experiments



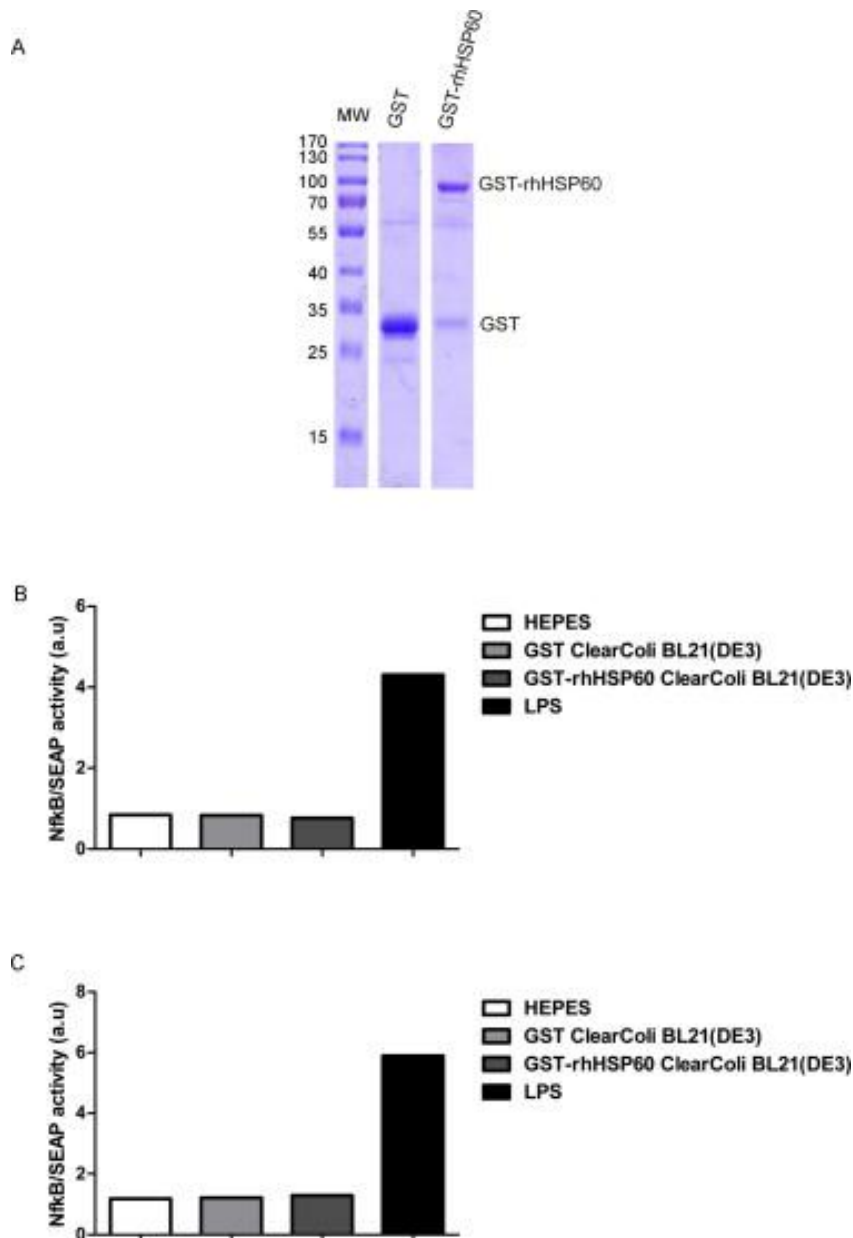
Supplementary Fig. S2. LPS extracted from ClearColi BL21(DE3) strain did not activate NFκB/SEAP in human monocyte cell line. Results presented in Fig. 2 were zoomed for low concentration of LPS (from 0 to 250 ng.mL⁻¹).



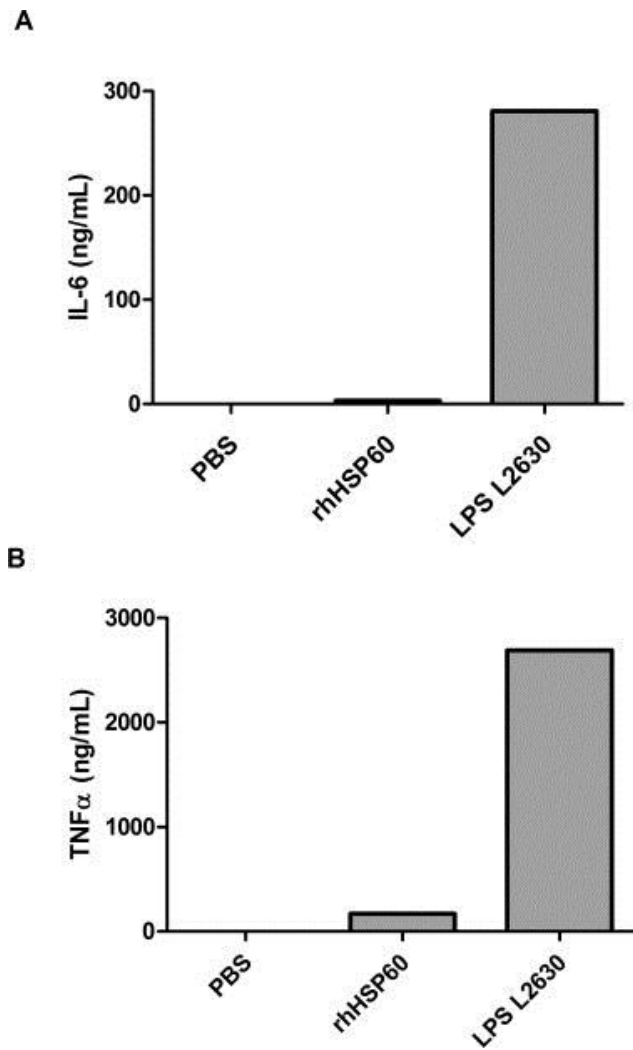
Supplementary Fig. S3. Characterization of purified rhHSP60. (A) Biochemical evaluation of rhHSP60 purity by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining or Western blotting with HSP60 antibody (LK2 from Sigma-Aldrich). (B) rhHSP60 produced from standard BL21(DE3) or ClearColi BL21(DE3) have no effect on THP1 monocyte viability. THP1-XBlue-CD14-MD2 cells (5×10^5 cells.mL⁻¹) were treated with 5000 ng.mL⁻¹ rhHSP60 produced from the standard BL21(DE3) or produced from ClearColi BL21(DE3) and viabilities were tested by trypan blue staining after 16 h treatment. The results were normalized to the control and were representative of three independent experiments.



Supplementary Fig. S4. rhHSP60 produced in ClearColi is folded and have chaperonin activity. (A) Denaturation curve of rhHSP60 were monitoring by the quantification of Trp fluorescence with an excitation at 295 nm and emission at 330 nm. (B) ATP binding activity was analyzed by measurement of Trp fluorescence with an excitation at 295 nm and emission at 330 nm. (C) Refolding of acid denatured GFP was conducted spontaneously or in presence of rhHSP60 in presence of 1 mmol.L⁻¹ ATP. GFP refolding were monitoring by fluorescence recovery of unfolded GFP. Results are representative of three independent experiments. All experiments were conducted as previously [37].



Supplementary Fig. S5. GST and GST-rhHSP60 produced in ClearColi BL21(DE3) did not induce NFκB/SEAP activity in two models of APC. (A) Biochemical evaluation of GST and GST-rhHSP60 purity by SDS-PAGE followed by Coomassie blue. (B) THP1-XBlue-CD14-MD2 cells (5×10^5 cells.mL⁻¹) were treated with 5000 ng.mL⁻¹ of GST or GST-rhHSP60 produced in ClearColi BL21(DE3) during 16 h, then NFκB/SEAP activity were measured using Quanti-blue. (C) RAW-Blue cells (5×10^5 cells.mL⁻¹) were treated with 5000 ng.mL⁻¹ GST or GST-rhHSP60 produced in ClearColi BL21(DE3) during 16 h then NFκB/SEAP activity were measured using Quanti-blue. LPS at 1 μg.mL⁻¹ was used as positive control. Results were normalized to the control and are representative of three independent experiments.



Supplementary Fig. S6. HSP60 produced in ClearColi BL21(DE3) did not induce IL6 secretion in PMA treated THP1. THP1 cells (5×10^5 cells.mL⁻¹) were treated with PMA for 48 h followed by treatment with 5000 ng.mL⁻¹ of rhHSP60 produced in ClearColi BL21(DE3) during 16 h, then IL-6 (A) or TNF α (B) secretion were measured using ELISA kit (eBiosciences). LPS at 1 μ g.mL⁻¹ was used as positive control. Results were normalized to the control and are representative of two independent experiments.

Résultats complémentaires

Materials and methods

CD93 CTLD pull-down assay.

We used affinity column and Ni²⁺ (Ni-NTA) column followed by gel-filtration. For Ni-NTA, 500 µg of His-CTLCD CD93 were applied onto 0.5 mL of Ni-NTA resin in PBS with 1% NP-40. Jurkat cells were UV radiated at 400 mJ (Stratagene UV Stratalinker 2400) and then incubated at 37°C with 5% CO₂ for up to 4 hours to induce apoptosis. Apoptotic Jurkat cells (5 x 10⁶ cells) were lysed in 5 mL of PBS with 1% NP40 at 4°C for 15 min. Lysate was centrifuged for 15 min at 15000 g, 4°C, the supernatant was then pre-cleared on 0.5 mL of Ni-NTA agarose to reduce nonspecific binding during pull-down experiment. Pre-cleared extracts were separated in two parts; one was loaded on Ni-NTA resin (negative control) and the other part to Ni-NTA-His-CTLCD CD93. After washing with 10 bed volumes of PBS-NP40 with 30 mM imidazole, proteins bound to the resin were eluted with 2 mL of PBS-NP40 with 300 mM imidazole. Eluted fractions were tested for HSP60 content by western-blotting (HSP60 antibody, LK2 from Sigma–Aldrich).

ELISA assay for interaction

Maxisorp microplate (Nunc, Danemark) were coated with 100 µL of His-CD93-CTLCD at 2µg.mL⁻¹ in PBS, overnight at 4°C. Wells were washed with Tris Buffered Saline (TBS) one time and with TBS-Tween 0.1% (v/v) three times followed by saturation with BSA 5% in TBS-Tween. The plates were then incubated for 30 min and washed 3 times as previously. After washing, plates were overlaid with GST-HSP60 or GST (as control) between 0 to 2 µg.mL⁻¹ in TBS with Tween 0.5% and BSA 5% for 2h and then washed. Rat Anti-GST antibody was used as primary antibodies in 1h incubation. Anti-Rat HRP antibody was used next as secondary antibodies. TMB One (Promega, France) was used for the revelation and reaction was stopped with HCl 0.2 mol.L⁻¹. Absorbance was read at 450nm with a reference filter at 570 nm.

Result

To test further the hypothesis that HSP60 could interact with CD93, we first performed an ELISA using highly purified recombinant CD93-CTLCD protein. Immobilized CTLCD-CD93 was able to bind to HMGB1 in a dose-dependent manner (Fig. 23A).

In ELISA one partner was immobilized. Immobilization can induce conformational change and non-specific binding. To rule out bias with this approach, we used interaction assays in aqueous environment, using apoptotic cells as source of endogenous HSP60. We used an affinity column pull-down assay using CTLCD-CD93 coupled to a stationary phase through its histidine tag. Protein extracts from apoptotic Jurkat cells were loaded onto the column and after several washes; proteins bound to the stationary phase were eluted and tested for their content for HSP60. We observed enrichment for endogenous HSP60 immobilized to His-CTLCD CD93 (Fig. 23B).

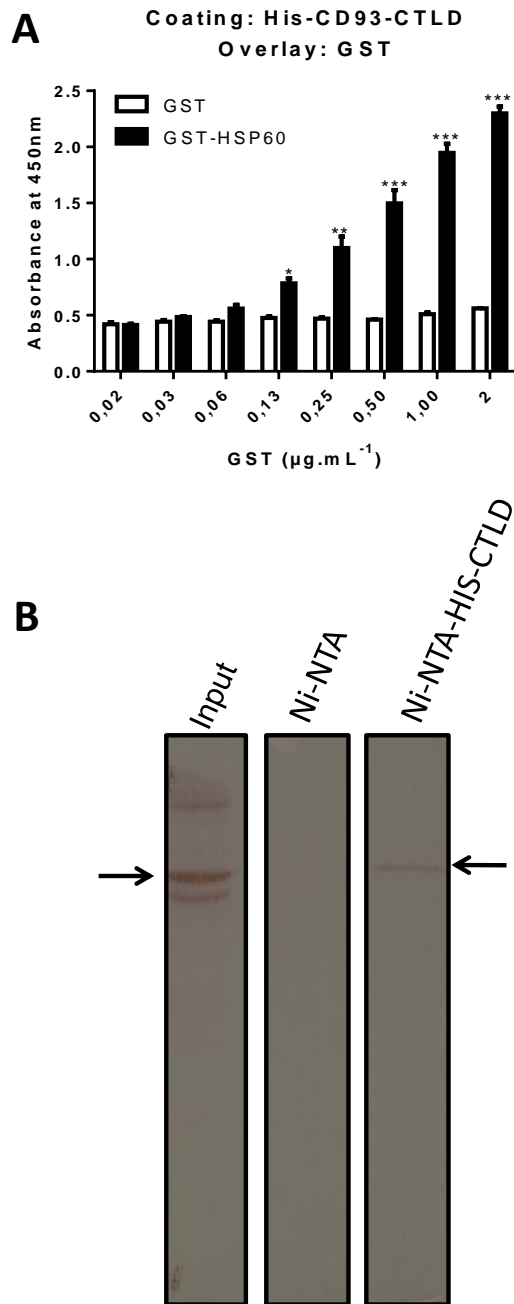


Figure 23. **HSP60 interaction assay**. A. ELISA assay for interaction between HSP60 and CTLD-CTL D. Microplate was coated with His-CD93-CTL D at 2 µg.mL⁻¹. After washing and saturation, plates were overlaid with GST-HSP60 or GST (as control) between 0 to 2 µg.mL⁻¹. Rat Anti-GST antibody and secondary anti-rat HRP antibody were used for the revelation by chromogenic substrate. Absorbance was read at 450nm with a reference filter at 570 nm. Results are presented as the mean ± SEM from 3 independent experiments. Differences were determined by One-way ANOVA Turkey's test: * difference (P < 0.05), ** difference (P < 0.01), *** difference (P < 0.001), compared to control. B. Pull-down assay of HSP60 on control (Ni-NTA) or CD93-CTL D (Ni-NTA-His CTL D) beads using Jurkat cell lysates (Input) protein eluted purification was confirmed by SDS-PAGE followed by western blot anti-HSP60 antibody (LK2).

4. Etude 4: Soluble expression of Disulfide-bonded C-Type Lectin Like domain of human CD93 in the cytoplasm of Escherichia coli.

Article publié + résultats complémentaires

Introduction:

CD93 est une protéine membranaire connue pour être impliquée dans la régulation de l'adhésion cellulaire et de la phagocytose. Cette protéine possède plusieurs domaines communs avec les autres membres de sa famille (CD141, CD248 et Clec14a), en particulier le domaine CTLD. La fonctionnalité de ce domaine dépend des ponts disulfures qui le composent. Pour CD141 par exemple, ce domaine est impliqué dans l'inflammation en interagissant avec du LPS. De plus, CD93 est clivé et libéré aussi sous forme soluble (sCD93) lors de stress cellulaire. Le but de cette partie est d'étudier les propriétés structurales et fonctionnelles du domaine CTLD de CD93. Nous allons également étudier la liaison du LPS au CTLD de CD93 et son implication sur l'inflammation.

Méthodologie:

- Construction d'un plasmide recombinant codant HSP60 par génie génétique.
- Production et purification des protéines CTLD-CD93 dans différentes bactéries et en cellule de drosophile S2.
- Analyse des propriétés structurales de CTLD-CD93, par RMN, et Western-Blot.
- Etude de l'interaction entre le CTLD-CD93 et LPS. Pour cela nous allons réaliser des « ELISA interaction » et une mesure de la fluorescence des tryptophanes de CD93 ou du LPS FITC en présence de concentration croissante de LPS ou de CD93, respectivement.
- Etude de la réponse inflammatoire des cellules par la liaison CTLD-CD93 et le LPS. Pour cela nous allons mesurer la production de cytokines inflammatoires par ELISA ou par mesure de l'activité NF- κ B/SEAP.

Résultats:

Nous avons mis en évidence que la production de CTLD-CD93 était plus importante dans les bactéries transfectées avec le plasmide pTIFa codant pour les protéines Erv1p et DsbC. La protéine CTLD-CD93 produite est correctement repliée, comporte bien les ponts disulfures et est Ca^{2+} -indépendant. De plus nous avons montré que le CTLD-CD93 était capable d'interagir avec le LPS et d'induire une diminution de l'inflammation du LPS. Cette étude structurelle et fonctionnelle de CTLD-CD93 nous a permis de démontrer que le domaine CTLD était bien impliqué dans l'inflammation.

Conclusion:

Ces résultats mettent en évidence que la co-expression d'Erv1p et DsbC dans les bactéries E.coli permet de produire notre protéine CTLD-CD93 en grande quantité, correctement repliée et fonctionnelle. Il a également été mis en lumière que le CTLD-CD93 peut neutraliser l'effet pro-inflammatoire du LPS. CD93 est clivé de la surface des cellules et libéré dans le milieu extracellulaire. Ainsi, nous avons montré que le CTLD de CD93 interagit avec le LPS et inhibe son activité pro-inflammatoire, donc nous pouvons supposer que durant une réponse immunitaire sCD93 agirait comme anti-inflammatoire.



Research paper

Soluble expression of disulfide-bonded C-type lectin like domain of human CD93 in the cytoplasm of *Escherichia coli*

Brice Nativel^{a,b,1}, Audrey Figuier^{b,a,1}, Jessica Andries^b, Cynthia Planesse^a, Joël Couprie^a, Philippe Gasque^{b,c,d}, Wildriss Viranaicken^{b,c,1}, Thomas Iwema^{b,e,1}

^a Inserm, UMR 1188 Diabète athérombose Thérapies Réunion Océan Indien (DÉTRO), Université de La Réunion, Plateforme CYROI, Sainte-Clotilde, F-97490, France

^b GRI, EA4517, Université de la Réunion, Saint-Denis F-97400, France

^c UM134, Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), Université de La Réunion, INSERM1187, CNRS 9192, IRD 249, Plateforme CYROI, Sainte-Clotilde F-97490, France

^d Laboratoire de Biologie, LICE-OI, CHU de la Réunion, 1 allée des Topazes, 97400, France

^e CALIXAR, 60 Avenue Rockefeller, 69008 Lyon, France

article info

Article history:

Received 23 May 2016

Received in revised form 7 October 2016

Accepted 10 October 2016

Available online xxxx

Keywords:

CD93

Disulfide bond

DsbC

Erv1p

C-type like domain (CTLD)

Inflammation

abstract

CD93 belongs to the group XIV C-type lectin like domain (CTLD) and is closely related to thrombomodulin (CD141). Although CD93 is known to be involved in the regulation of cell adhesion and phagocytosis, its role in innate immunity remains to be fully investigated. Critically, published data about CD141 suggest that CD93 CTLD could be involved in the control of inflammation. In order to address further functional and structural analyses, we expressed human CD93 CTLD with several disulfide bonds in an *E. coli* expression system. As the *E. coli* cytoplasm is a reducing compartment, production of disulfide-bond proteins remains a challenge. Hence, we decided to over express CD93 CTLD in commercially available strains of *E. coli* and co-expressed a sulfhydryl oxidase (Erv1p) and a disulfide isomerase (DsbC). This strategy led to high yield expression of a native form of CD93 CTLD. NMR studies revealed that Ca²⁺ was not able to bind to CD93 CTLD. We also showed that the recombinant protein could alter LPS pro-inflammatory activity on THP1. This work provides new tool for further functional and structural studies to decipher the functions associated to the CTLD of CD93. This approach may also be used for others members of the group XIV C-type lectin like domain (CD141, CD248 and CLec14A).

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

CD93 is expressed on the cell surface of myeloid cells such as mono-cytes and macrophages, and is composed of a short intracellular do-main, a transmembrane domain and an extracellular domain which contains a C-type lectin-like domain (CTLD), five EGF (epidermal growth factor) domains and a highly glycosylated mucin-like domain [1,2]. Shedding of the extracellular domain (known as soluble CD93, sCD93) can be observed in diverse inflammatory context [3]. sCD93 can induce THP1 and monocyte activation and increases LPS pro-in-flammatory response [4]. CD93 may also be involved in cell adhesion, phagocytosis and inflammation, but its exact

function and underlying mechanisms remain to be defined [4].

CD93 belongs to the group XIV of CTLD-containing cell surface proteins and is homologous to thrombomodulin (TM) also known as CD141. As CD93 and THBD genes may result from gene duplication, functional redundancy between their protein products is expected. Beside its documented anticoagulant property [1,5], several studies have indicated that CD141 CTLD domain (called TMD1) can regulate inflammation by neutralizing LPS or HMGB1 alarmin [6]. CD141 CTLD interacts with LPS, and plays a pivotal role in CD141 function. All studies of TMD1 used *Pichia pastoris* as heterologous protein expression system [7]. To date, the function and partners of CD93 CTLD remain poorly identified. In order to study the functional and structural properties of CD93 CTLD, it was essential to express a native form of this domain in *E. coli*, which is adapted for cost effective production of recombinant proteins in milligram scale in contrast to *Pichia pastoris*. It is especially appropriate for ¹⁵N and ¹³C labeling and NMR study.

Disulfide bonds are formed by oxidation of thiol groups between two cysteines in an oxidizing compartment i.e. the endoplasmic reticu-lum in eukaryotes and the periplasm in prokaryotes. Since *E. coli* periplasmic expression is much less efficient than cytoplasmic expression, extensive efforts have been made to obtain disulfide bond formation within the

Abbreviations: CTLD, C-type lectin like domain; DTNB, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid; DTT, dithiothreitol; *E. coli*, *Escherichia coli*; EDTA, ethylene diamine tetra-acetic acid; EGF, epidermal growth factor; HSQC, hetero-nuclear single quantum correlation; hTNF- α , human tumor necrosis factor α ; IPTG, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; NMR, nuclear magnetic resonance; OD, optical density; ppm, parts per million; TCEP, tris(2-carboxyethyl)phosphine.

* Corresponding author at: UMR PIMIT, Plateforme Technologique CYROI, 2, rue Maxime Rivière, 97490, Sainte-Clotilde, Ile de La Réunion, France.

E-mail address: wildriss.viranaicken@univ-reunion.fr (W. Viranaicken).

¹ These two authors contribute equally to this work.

cytosol. One of the most favorable approach consisted in altering the expression of thioredoxin reductase (trxB) and/or glutaredoxin reductase (gor) which could maintain a reducing environment in *E. coli* cytoplasm [8,9]. Strains with mutations for trxB and gor are commercially available under the names Origami (Novagen) or SHuffle T7 (New England Biolabs) [10]. A second strategy could be to produce the heterologous protein as a fusion protein with oxidase-like thioredoxin (trxA) [11,12]. Recently a third strategy has been proposed, consisting in cytoplasmic co-expression of a sulfhydryl oxidase (Erv1p) and a disulfide bond isomerase (DsbC). Erv1p catalyzes de novo disulfide bond formation whereas DsbC catalyzes disulfide bond isomerization [13].

In this work we compared the expression of soluble CD93 CTLD in different commercially available *E. coli* strains transformed with a recombinant plasmid which encoded for Erv1p and DsbC. After characterization of purified CD93 CTLD by biochemical analysis and NMR, we showed that CD93 CTLD could affect TNF- α secretion by LPS-stimulated THP1 monocytic cell line.

2. Materials and methods

2.1. Production plasmid pACYCduet-Erv1p-DsbC (pTIFA)

Synthetic *E. coli* optimized gene of Human CD93 corresponding to CTLD domain (residues T22 to G186), flanked by restriction sites NdeI and EcoRI in pEX-A2 vector was obtained from MWG-eurofins (Fig. S1). CTLD coding sequence was excised using these two enzymes and subcloned into corresponding sites of pET28a (Novagen) leading to pET28a-hCD93CTLD allowing expression of CD93CTLD with a 6x His fused to its N-terminus (CD93-CTLD) upon IPTG induction. Recombinant vector encoding Erv1p and DsbC used for formation of disulfide bonds in the cytoplasm of *E. coli* was constructed in two steps.

First, *Saccharomyces cerevisiae* Erv1p coding sequence optimized for *E. coli* (MWG-Eurofin) corresponding to residues M1 to E186 and flanked by NdeI and XhoI (Fig. S1) was subcloned into pACYCduet-1 (Novagen) leading to the recombinant vector pACYCduet-1-Erv1p named pTI. Second, DsbC sequence (corresponding to residues D21 to K236) was amplified from *E. coli* DH5 α strain (Invitrogen) by PCR using primers 5'-AAA CCA TGG ATG ACG CGG CAA TTC AAC AA-3' and 5'-AAA GGA TCC TTA TTT ACC GCT GGT CAT TT-3' digested by NcoI and BamHI and subcloned into corresponding restriction sites of pTI leading to the vector pTI-DsbC named pTIFA which allowed the expression of cytoplasmic untagged Erv1p and DsbC upon IPTG induction.

2.2. Protein expression

For the batch tests, BL21 (DE3) (Novagen), Origami2 (DE3) (Novagen) and SHuffle T7 (New England Biolabs) were transformed with the pET28a-hCD93CTLD alone. In addition, BL21 (DE3) was transformed with pTIFA and pET28a-hCD93CTLD. Bacteria were grown in 100 mL LB (Luria Bertani) media containing 50 μ g/mL kanamycin (for BL21 (DE3), Origami2(DE3) and SHuffleT7) or 50 μ g/mL kanamycin and 34 μ g/mL Chloramphenicol (for BL21 (DE3)-pTIFA) in 500 mL Erlenmeyer flask at 37 °C with 180 rpm shaking (Infors minitron incubator) until OD₆₀₀ reached 0.3–0.4.

Recombinant protein expression was induced at 0.4 to 0.8 OD₆₀₀ using 1 mM IPTG at 18 °C during 18–20 h with continuous shaking as above. Bacteria were harvested at 4000g, resuspended in buffer A (150 mM NaCl, 50 mM phosphate pH 7.0) and lysed by sonication (to obtain total extract). The lysate was centrifuged at 10,000g for 15 min at 4 °C to have supernatants and pellet. Samples of total extract, super-natant and pellet were analyzed by 15% SDS-PAGE followed by silver staining (silver staining Plus One, GE) to compare the expression and the solubility levels in each condition.

2.3. Scale-up and purification

CD93 CTLD was purified from 2 L of BL21 (DE3)-pTIFA. Cells were harvested at 4000g, resuspended in buffer A supplemented with complete protease inhibitor cocktail (Roche) and lysed by sonication on ice. The lysate was further processed at 4 °C. It was first centrifuged at 28,000g for 20 min. The supernatant was applied on 1 mL of NiNTA resin (Qiagen), washed with 5 volumes of buffer A, 10 volumes of buffer A supplemented with 25 mM imidazole and 10 volumes of buffer A supplemented with 50 mM imidazole. Protein was eluted using 150 mM NaCl, 50 mM Phosphate pH 7.0 and 250 mM imidazole. Aliquots were analyzed by 15% SDS-PAGE and the fractions containing CD93 CTLD were pooled and dialyzed twice against 1000 volumes of 150 mM NaCl and 25 mM Hepes pH 7.2. Protein solution was then aliquoted and flash frozen in liquid nitrogen before being stored at –80 °C. Protein concentration was determined by bicinchoninic acid assay (BCA Assay). Recombinant proteins were analyzed by 15% SDS-PAGE, and visualized by Coomassie blue staining. GelRed (Biotium, Ozyme) agarose gel electrophoresis was carried out to ensure that recombinant protein preparation was DNA- and RNA-free (data not shown). LPS content in protein preparation was evaluated using HEK-Blue™ LPS Detection Kit 2 (InvivoGen) and was lower than 0.05 ng·mL⁻¹.

7. Isotope labeling and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy

1 mL of LB preculture of BL21(DE3)-pTIFA transformed with pET28a-hCD93CTLD was used to inoculate 200 mL of M9 minimal medium (supplemented with antibiotics as above) which was grown over-night at 37 °C under shaking and was used to inoculate 2 L of M9 minimal-¹⁵N medium. The temperature of the culture was lowered to 18 °C and expression was induced at OD₆₀₀ = 0.4 with 1 mM IPTG during 18 h. Purification was performed as described except that the fractions containing the protein were dialyzed twice against 1000 volumes of 150 mM NaCl, 50 mM phosphate pH 6 for 2 h. 2.5 μ g of purified protein were obtained and concentrated at 5 mg·mL⁻¹ using centricon Vivaspins (MWCO = 5–50 kDa, Sartorius) at 4000g. In the NMR sample, the concentration of the ¹⁵N labeled sample was 100 μ mol·L⁻¹ in 90% H₂O, 10% D₂O in a phosphate buffer pH 6, 50 mM NaCl. 1 μ L of TMS 0.5 mol·L⁻¹ (3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid) (across Organics) was used as the proton reference. 1D ¹H and 2D ¹H-¹⁵N NMR experiments were recorded on a 600 MHz Bruker Avance III spectrometer equipped with a triple resonance ¹H/¹⁹F-¹⁵N-¹³C TCI cryoprobe. NMR spectra were acquired and analyzed with Topspin 2.1 (Bruker). The water signal was suppressed using either a Watergate spin-echo sequence (1D) or Excitation sculpting with gradients (HSQC).

2.5. SDS-PAGE, Western blotting analysis and ELISA

SDS-PAGE and Western blotting were conducted as previously described without reducing agent (except when indicated) and without heating step [14]. For Western blotting, the membrane was incubated with rat anti-CD93 serum (E1A) or with a monoclonal antibody against human CD93 (clone mNI-11) at 1:1000 dilution. E1A serum was produced after immunization by subcutaneous injection of a female Wistar Rat with His-CD93-CTLD and as described [15]. All procedures were performed in accordance with guidelines for care and use of laboratory animals by ethics committee of CYROI facility (A974001). mNI-11 antibody which recognized CTLD of CD93 was from Dr. Ikewaki (Kyushu University of Health, Japan) and has been described previously [16]. Membranes were washed three times for 5 min and incubated with a 1:2000 dilution of goat horseradish peroxidase conjugated anti-mouse or anti rabbit antibodies (Vector Labs) for 1 h. Membranes were washed with TBS-Tween 20 0.2% three times and developed with the Novared system (Vector Labs) according to the manufacturer's protocol.

For analysis of CD93-CTLTD by ELISA, The Nunc MaxiSorp flat-bottom 96 well plates were coated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ His-CD93 CTLTD, then washed (PBS with 0.05% Tween 20), and next treated either with PBS or PBS containing 10 mM DTT or 20 mM TCEP. Wells were blocked for 30 min in blocking buffer (PBS with 0.05% Tween 20 and 5% BSA) at 25 °C. CD93 coated plates were incubated with rat serum (E1A) or with the monoclonal antibody mNI-11 at 1:1000 dilution in blocking buffer. After washings, wells were incubated with a 1:2000 dilution of horseradish peroxidase conjugated-goat anti-mouse or anti-rabbit anti-bodies (Vector Labs) for 1 h. Wells were washed with PBS-Tween 20 0,2% three times and was revealed using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as HRP substrate.

2.6. Tryptophan fluorescence measurement

Tryptophan fluorescence of CD93-CTLTD (150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was measured at an excitation wavelength of 295 nm with a slit of 5 nm and an emission wavelength from 310 to 360 nm with a slit of 5 nm using a Horiba Fluoromax4 spectrofluorometer at 25 °C. TCEP (20 mM) was added and Trp fluorescence was measured as described above after 30 min at 25 °C.

2.7. Free thiol group quantification

Thiol groups in non-reduced and reduced CD93-CTLTD were measured by Ellman's assay using 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB). Briefly, CD93 CTLTD in PBS was treated with 2% SDS with or without 10 mM DTT followed by incubation at 95 °C for 10 min. DTT was removed from the protein preparation by two subsequent dialysis against 1000 volumes of PBS containing 2% SDS for 2 h. Ellman's assay was conducted as described [17]. Treatment of proteins by DTT allowed quantification of all cysteines. To control for the removal of DTT after dialysis, CD93 CTLTD was not treated but only dialyzed against PBS containing 2% SDS and 10 mM DTT as abovementioned; this serve as a negative control, and no reaction with DTNB was detected.

2.8. Cell culture and whole blood assay

We prepared CD93-transfected or mock-transfected IMR32 as controls for the Western blot analysis. IMR32 (ATCC, CCL-127) human neuroblastoma cell line was cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium 1640 completed with 10% (v/v) Foetal Bovine Serum (FBS), 2 $\text{mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ glutamine, 100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ penicillin, 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Amphotericin B and 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ streptomycin (PAN Biotech, Germany) at 37 °C, 5% CO_2 in a humidified cell culture incubator. They were transfected with human PDR2 (mock) or recombinant PDR2-hCD93 [16] using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). IMR32 lysate were prepared and analyzed by Western blot as described before [18].

THP1 (ATCC, TIB-202) human monocyte cell line was cultured in RPMI medium complemented with 10% FBS and antibiotics. For treatment, cells were incubated with either His-CD93-CTLTD (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) alone, LPS (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) alone or LPS (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) mixed with either His-CD93-CTLTD (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) or polymyxin B (PMB) at 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The mix was incubated in sterile PBS at 37 °C for 1 h. The preparations were all diluted ten-fold in 100 μL of complete RPMI and exposed to THP1. Cells were treated in 96-well plate for 20 h. Supernatants were collected and the amount of TNF- α was measured by ELISA (Ready-SET-Go, eBioscience, Austria) according to the manufacturer's protocols.

The blood was obtained from healthy male volunteers without medication. The blood sample was drawn with Vacutainer kit (BD Biosciences, USA) and tubes contained lithium heparin as anticoagulant. We used either His-CD93-CTLTD (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) alone, LPS (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) alone or LPS (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) mixed with His-CD93-CTLTD (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The mix was incubated in sterile PBS at 37 °C for 1 h, then the preparation were diluted ten-fold in 100 μL of complete RPMI without FBS and

exposed to human blood. Blood cells were treated in 96-well plate for 20 h. Supernatants were collected and tested for TNF- α .

2.9. Statistical analysis

All data are presented as means \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using 1992–2007 GraphPad Prism 6 Software. One-way ANOVA, followed by Tukey's test were performed to compare each treatment. P values $b < 0.05$ were considered as being significant.

3. Results

3.1. Expression of soluble CD93-CTLTD in *E. coli* cytoplasm

CD93 belongs to group XIV of CTLTD-containing cell surface proteins which include four members CD93, CD141, CD248 and C-Lec14a (Fig. 1A). The CTLTD of these 4 proteins contain 8 conserved cysteines (Fig. 1B) which are likely involved in four disulfide bonds. Several *E. coli* expression strains were specifically developed to allow formation of disulfide bonds in the cytoplasm while this is otherwise impossible in the wild type strains. Besides testing the basic BL21 (DE3) strain, we tested Origami2 (DE3) as well as the SHuffle T7. Of note, both strains are depleted for thioredoxin reductase and glutaredoxin reductase. However, the Shuffle T7 strain expresses the disulfide bond isomerase DsbC in the cytoplasm (Table 1). We also generated a recombinant plasmid (pTIFA) to allow for cytoplasmic DsbC and Erv1p dual expression upon IPTG induction (Fig. 2A). These two enzymes catalyze in a two-step reaction de novo formation of native disulfide bonds (Fig. 2B). Indeed, Erv1p is a potent catalyst of disulfide bond formation while DsbC is able to rearrange non-native disulfide bonds into paired disulfides. Basic BL21 (DE3) strain was transformed with pTIFA (Table1). All bacteria were then transformed with pET28a-His-CD93-CTLTD. While neither BL21 (DE3) nor Origami2 allowed us to express CD93 CTLTD to detectable levels, the use of Shuffle T7 strain provided a weak expression of CD93 CTLTD that remained in the soluble fraction after cell lysis and centrifugation (Fig. 3A and B).

Using BL21(DE3)-pTIFA we obtained a much more robust expression of CD93 CTLTD compared to SHuffle T7 with around 50% of the recombinant protein being soluble compared to 5% for SHuffle T7 strain (Fig. 3A and B and Fig. S2). The expected molecular weight of CD93 CTLTD was 19,7 kDa. By Western blot, two bands were observed, one major band around 17 kDa and another around 37 kDa. We believe that CD93-CTLTD was expressed in monomeric and dimeric forms respectively (Fig. 3B and S2). We also identified that the bacterial density was a key factor for the optimization of soluble CD93-CTLTD expression. Indeed, whereas inductions at 0.4, 0.6 and 0.8 OD_{600} led to a comparable yield of protein of interest in the total extract, soluble protein expression was maximal when induction was performed at low bacterial density ($b <$ or equal 0.4 OD_{600} (data not shown)).

3.2. Scale up expression, purification and characterization of CD93 CTLTD

BL21 (DE3) was co-transformed with pET28a-His-CD93-CTLTD and pTIFA. Expression was induced at $\text{OD}_{600} = 0.4$ during 20 h at 18 °C and purified His-CD93-CTLTD was obtained by affinity chromatography using a NiNTA agarose as stationary phase. SDS-PAGE band shift obtained after addition of 5 mM DTT suggested that the recombinant protein carried disulfide bonds (Fig. 3C). This purification step allowed us to recover 5 μg of CTLTD-CD93 with a purity of 95% from 1 L of culture (Fig. 4A).

In order to further characterize the recombinant protein, two types of antibodies raised against CD93-CTLTD were used in Western blot experiments, a rat polyclonal serum (E1A) raised against His-CD93-CTLTD generated during this study and a mouse monoclonal (mNI-11) antibody which recognized CTLTD of CD93 [16]. Both recognized

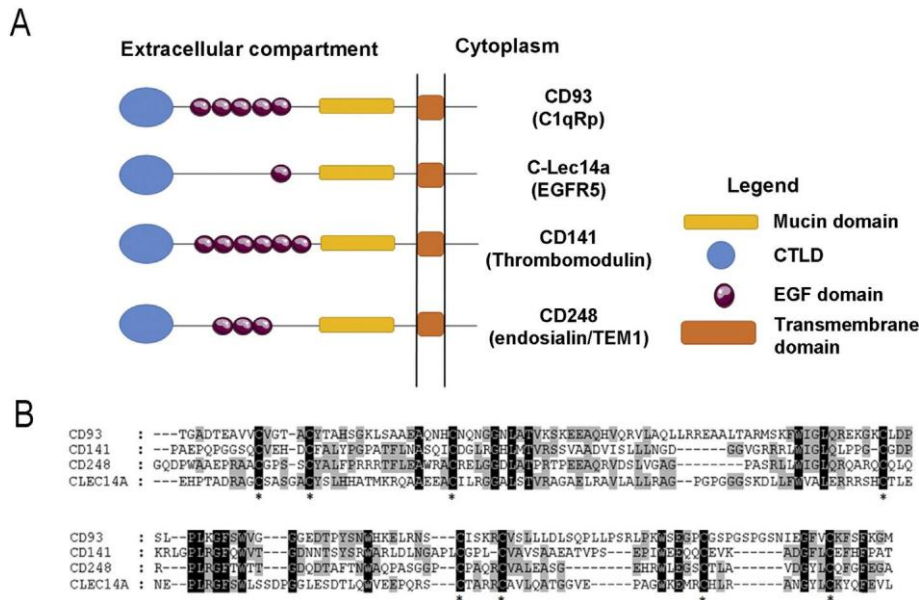


Fig. 1. Structural organization of Group XIV C-type lectin like domain family members. A. Structural organization of Group XIV C-type Lectin like domain family: Endosialin (CD248), Thrombomodulin (CD141), CD93 (also known as C1qRp or AA4 antigen) and C-Lec14a. B. Amino acid sequence alignment of the CD248, CD141, CD93, C-Lec14a CTLD domain using ClustalX2. Black-boxed amino acid represents identical amino acid, grey-boxed amino acid represents homologous amino acid, * show conserved cysteines within Group XIV C-type lectin like domain family.

CD93 expressed by transfected IMR32 cells in non-reducing conditions (Fig. 4A). The addition of 5 mM DTT completely abolished the detection by mNI-11 (Fig. 4A) while a signal remained for E1A anti-body. The monoclonal antibody mNI-11 detected by Western blot the *E. coli*-expressed recombinant CD93-CTL D only in the absence of DTT while E1A recognized the CTLD in both cases (Fig. 4B). We also performed an ELISA assay to detect recombinant CD93-CTL D using mNI-11 mouse monoclonal antibody or E1A rat serum treated or not with reducing agent. We used TCEP or DTT for this purpose. CD93-CTL D was recognized by the monoclonal antibody mNI-11 only in the absence of reducing agent while E1A recognized the CTLD also in both reducing conditions (Fig. 4B/C). These observations suggest that the protein purified is in a disulfide bonded native state. Using Elman's assay, CD93-CTL D did not react with DTNB whereas DTT-treated CD93-CTL D reacted with DTNB (8.53 ± 0.43 free thiols groups per CD93-CTL D molecule). So CD93-CTL D did not contain any free cysteines, all being engaged in disulfide bonds.

To further investigate the contribution of these disulfide bonds to the native state of the recombinant CD93-CTL D, we performed tryptophan fluorescence measurement of CD93-CTL D in the presence of reducing agent TCEP. We observed a quenching in the presence of TCEP (Fig. 4D). These observations are consistent with the presence of disulfide bonds and their requirement to contribute to the folding of this domain.

Table 1
Description of different *E. coli* bacteria strains used to produce CD93-CTL D in this study.

Bacteria	Strain	Characteristics
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B	Phenotype: trxB, gor
SHuffle T7	<i>E. coli</i> K12	Thioredoxin reductase (trxB), glutaredoxin reductase (gor) gene mutations and cytoplasmic DsbC expression Phenotype: trxB, gor, DsbC
Origami 2	<i>E. coli</i> K12	Thioredoxin reductase (trxB) and glutaredoxin reductase (gor) gene mutations Phenotype: trxB, gor
BL21(DE3) - pTIFA	<i>E. coli</i> B	DsbC and Erv1p expression in the cytoplasm Phenotype: trxB, gor, DsbC, Erv1p

3.3. CD93 CTLD does not bind to Ca^{2+}

To produce enough protein for NMR experiments, a 2 L culture was grown using minimal medium that contained ^{15}N labeled ammonium chloride. Approximately 2.5 mg of ^{15}N -labeled protein was obtained following purification using NiNTA chromatography. CD93-CTL D was then dialyzed and analyzed by NMR. The 1D ^1H NMR analysis of 0.1 mM uniformly ^{15}N -labeled CD93 spectrum displayed 2 main regions indicative of a folded protein: First, the observation of resonance peaks at high field between -1 and 1 ppm was typical of hydrogens from methyl

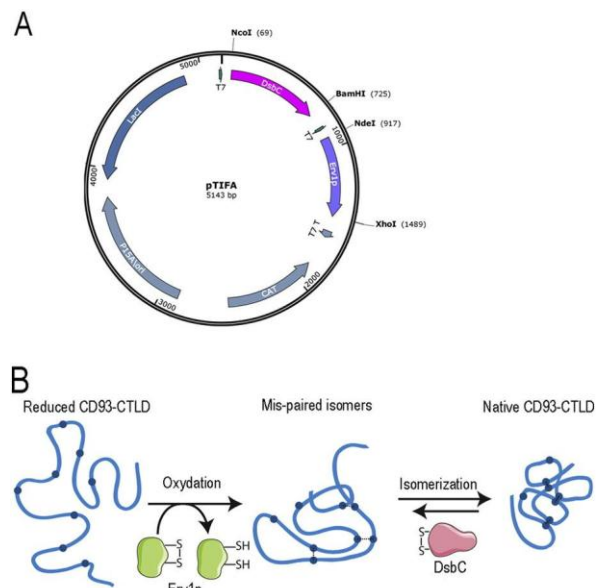


Fig. 2. Strategy to obtain disulfide-bonded CD93-CTL D using pTIFA plasmid. A. Schematic representation using pDRAW32 software of pTIFA plasmid constructs which encodes for DsbC and Erv1p upon IPTG induction in *E. coli*. B. Schematic representation of Erv1p and DsbC activities in the cytoplasm of *E. coli*. Erv1p catalyzes de novo disulfide bond formation while DsbC catalyzes disulfide bond isomerization.

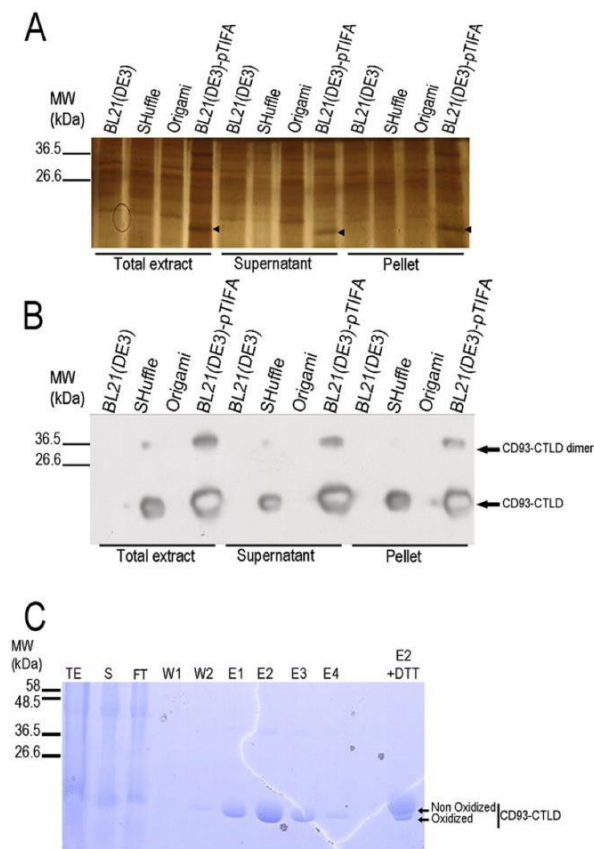


Fig. 3. CD93-CTL D expression in different *E. coli* strains and purification of soluble CD93-CTL D from BL21-pTIFA *E. coli*. **A.** Evaluation of CD93-CTL D expression in different *E. coli* strains after biochemical separation in soluble (supernatant) and insoluble (Pellet) extracts; SDS-PAGE analysis and subsequent silver stain. **B.** Western blotting using E1A rat polyclonal serum raised against CD93-CTL D. **C.** SDS-PAGE separation followed by Coomassie Blue staining of CD93-CTL D after purification on NiNTA affinity column (TE: Total Extract, S: Soluble fraction, FT: Flow Trough, W: Washing step fraction, E: Elution fraction). E2 fraction was treated with 10 mM of DTT. A reduced form of CD93-CTL D appears as a band with an apparent higher molecular weight.

groups buried in the hydrophobic core of a protein. The second region, ranging from about 7 to 10 ppm corresponded to hydrogens from the backbone amide group. The signal dispersion in this region was also indicative of a folded protein (Fig. 5A).

This was confirmed on the 2D ^1H - ^{15}N HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation) correlation spectrum (Fig. 5B) where correlation peaks showed a large signal dispersion both in the ^1H and ^{15}N dimensions which are classical found in a folded protein (Fig. 5B).

The proteins with CTL D comprise members which are able to bind Ca^{2+} ions for which at least 4 sites have been identified [19]. To investigate the binding of Ca^{2+} to the CD93-CTL D domain, two-dimensional NMR ^1H - ^{15}N HSQC spectra were recorded and overlaid as with Ca^{2+} (red spot) and without Ca^{2+} (black spot). The spectra were highly similar with no chemical shift variation whether CD93 was treated or not with CaCl_2 , suggesting that Ca^{2+} did not bind to CD93-CTL D (Fig. 5B). In order to rule out the presence of Ca^{2+} in the recombinant protein after purification we also used saturating concentration of EDTA as chelating agent. The recorded spectrum did not show any chemical shift variation compared to the previous HSQC spectra recorded with or without Ca^{2+} (data not shown).

3.4. CD93-CTL D controls LPS pro-inflammatory activity

The CTL D of CD141 (also known as N-terminal lectin-like domain of thrombomodulin, TMD1) negatively regulates inflammation induced by LPS [6,20] and CD141 and CD93 are closely related [1]. Hence, we next

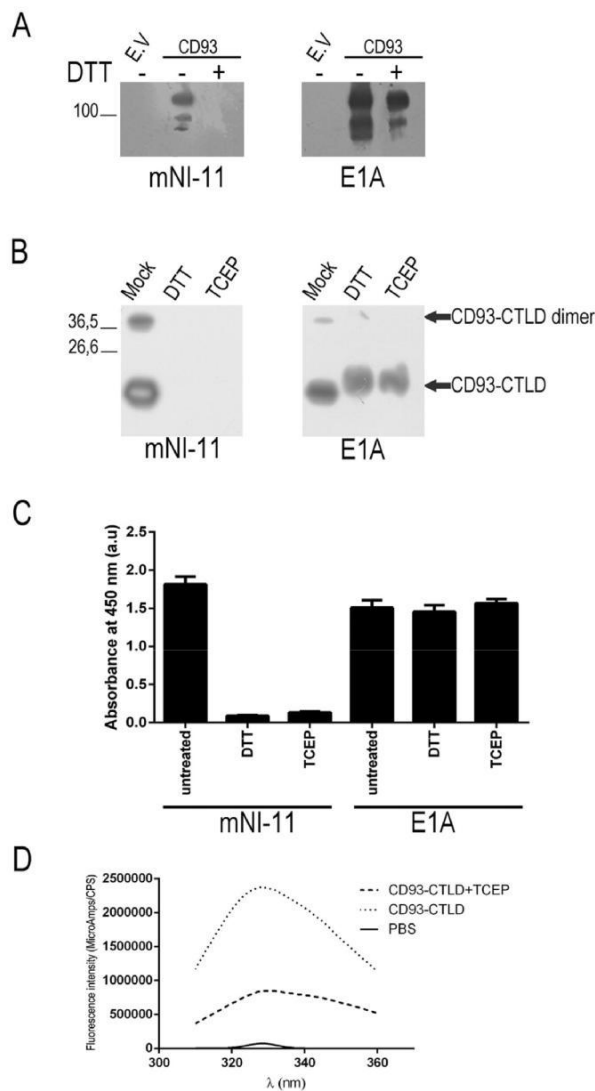


Fig. 4. Disulfide-bond characterization in recombinant CD93-CTL D. **A.** Western blot analyses of cell lysates from IMR32 transfected with pDR2 empty vector (E.V.) or pDR2-carrying human CD93 full length. Blots with E1A rat serum raised against CD93-CTL D or mNI-11 anti-human CD93 mouse monoclonal antibody. Cells lysates were treated or not with DTT. **B.** Western blot analyses, with E1A rat polyclonal or mNI-11 mouse monoclonal antibody of the E2 fractions treated with reducing agent or not (arrows indicated CD93-CTL D). **C.** CD93-CTL D detection by ELISA using E1A rat serum or mNI-11 mouse monoclonal antibody prior to (untreated) or after treatment with reducing agent (DTT or TCEP). **D.** Monitoring CD93-CTL D disulfide bonds reduction and folding changes via the quantification of Trp fluorescence (excitation at 295 nm, emission from 310 to 360 nm) after treatment with 20 mM TCEP.

tested whether the CD93-CTL D produced herein was able to display the same molecular and cellular functions. When THP1 monocyte cells were treated with LPS-CD93-CTL D complex, we observed a significant decrease in $\text{TNF}\alpha$ secretion (Fig. 6A) when compared to LPS-treated THP1 cells. This inhibitory activity was also observed when the assay was performed on human whole blood (Fig. 6B). These observations suggest that CD93 CTL D can be involved in the regulation of LPS pro-inflammatory activity as evidenced in monocytes.

4. Discussion

The homologous CTL D domain of CD141 (TMD1) was previously expressed in *Pichia pastoris* [6], as structural NMR analysis of CD93-CTL D requires ^{15}N and ^{13}C labeling. *E. coli* was the best suited host expression system.

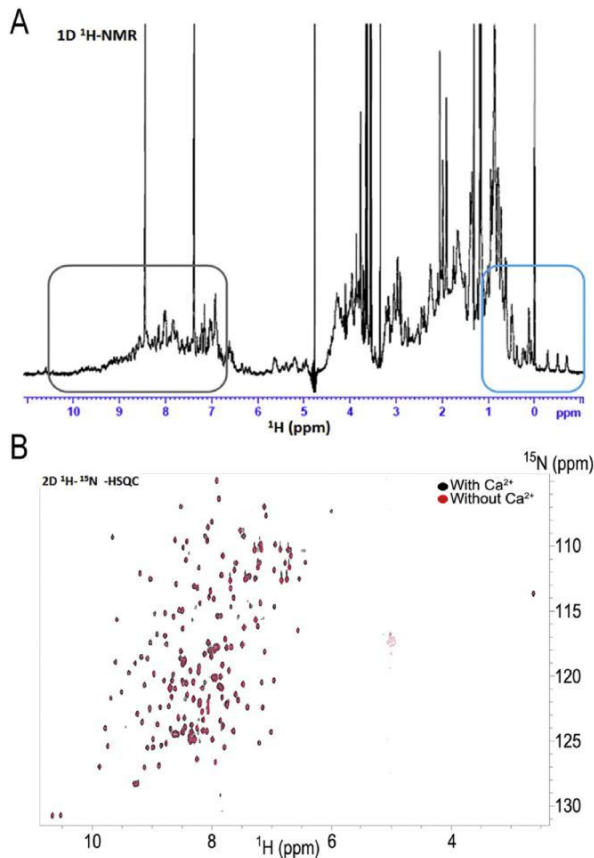


Fig. 5. CD93-CTLD domain folding characterization and evaluation of calcium binding by 1D ^1H and 2D ^1H - ^{15}N -HSQC NMR spectroscopy. A. 1D ^1H spectrum of CD93-CTLD. The two regions characterizing a folded protein are shown in blue square (methyl region) and grey square (amide protons). B. ^1H - ^{15}N HSQC NMR spectroscopy spectra of the N-terminal domain of human CD93. Overlay of CD93-CTLD spectrum either in the presence of CaCl_2 (black) or in the absence of CaCl_2 (red). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

In order to allow disulfide bond formation in the *E. coli* cytoplasm which is otherwise a reducing compartment, several strategies have been described [21]. Mutations in the thioredoxin and/or glutaredoxin reductase genes represent the most common systems to induce disulfide bond formation by generating an oxidative compartment in *E. coli* cytoplasm as in commercially available strains Origami and SHuffleT7 [22]. In our hands, the latter which also expresses a cytoplasmic disulfide bond isomerase DsbC [23,24], was the only expression system to secure weak expression of soluble CD93-CTLD. However, only the co expression of the protein with together DsbC and Erv1p allowed a high yield expression of CD93 CTLD. Milligram scale purification was achieved and critical for structural analyses.

In order to check for the correct folding of CD93-CTLD, we performed NMR analyses (Fig. 5A). 1D ^1H NMR is an established and sensitive method to check for protein folding [25]. Large chemical shift dispersions, especially in the methyl group region between 1.0 ppm and -1.0 ppm and the amide region downfield of 8.5 ppm can be used as an indicator for protein folding. ^1H - ^{15}N can also provide information on the structural properties of over expressed proteins in *E. coli* system [26,27]. In ^1H - ^{15}N NMR (HSQC), every proton bound directly to a nitro-gen atom and each peak corresponds to one residue, so the number of signals in HSQC correlates with the number of residues. Here, both ^1H and heteronuclear ^1H - ^{15}N experiments confirmed that the CTLD domain of CD93 was folded in solution (Fig. 5B). It has previously been shown that the CTLD domain super family is Ca^{2+} dependent for carbohydrate binding and interaction with other ligands [28]. We compared the NMR spectra of CD93 without Ca^{2+} and with Ca^{2+} . 2D spectrum

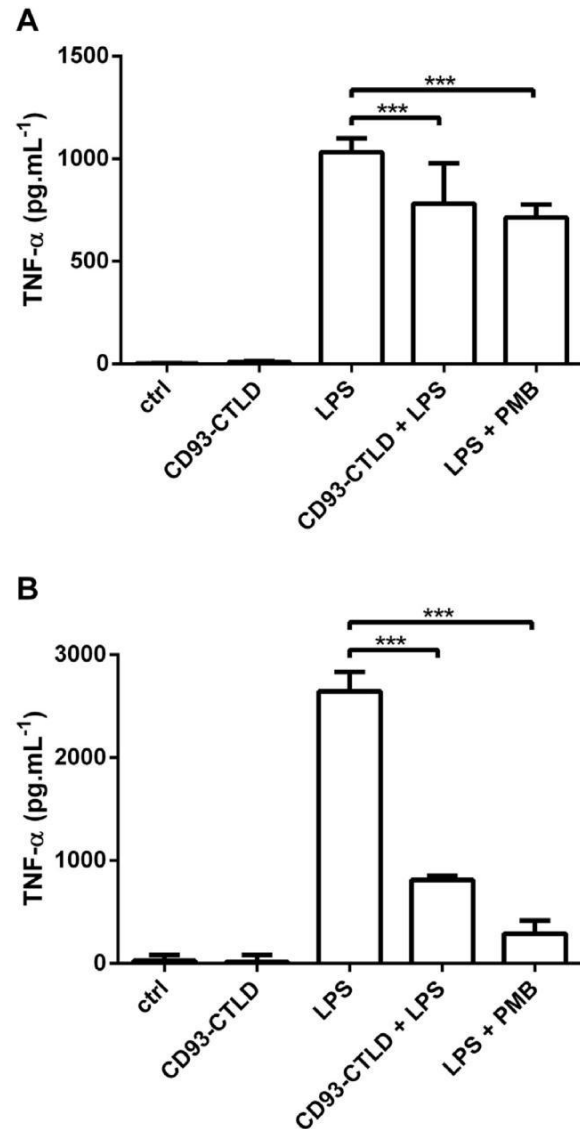


Fig. 6. CD93-CTLD inhibited LPS mediated TNF α secretion by monocyte THP1 cell line and in whole blood assay. CD93-CTLD ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) alone, LPS ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) alone or LPS ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) mixed with CD93-CTLD ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) or polymyxin B (PMB, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) were incubated in PBS at 37°C for 1 h, then these preparations were diluted ten-fold to treat A. THP1 cells or B. human whole blood assay during 20 h. TNF α secretion was quantified by an ELISA kit (eBiosciences). Results are presented as the mean \pm SEM from 3 independent experiments. Differences were determined by One-way ANOVA Tukey's test: ** difference ($P < 0.05$) and *** difference ($P < 0.01$).

analysis of CD93 titration with CaCl_2 showed that Ca^{2+} does not induce any variation in the HSQC spectrum of the protein domain (Fig. 5B). We can thus conclude that CD93 alone does not bind Ca^{2+} in our experimental conditions.

Finally using the recombinant CD93-CTLD we observed a neutralization of LPS pro-inflammatory effect as showed for CTLD domain of CD141 [16]. Interestingly and in contrast to our finding, a previous study by Jeon and colleagues has shown that soluble CD93 (sCD93) purified from Hek293 transfected cells can potentiate LPS pro-inflammatory effect of THP1 cells [4]. Although both observations support the paradigm that CD93 CTLD can interact with LPS, further studies will be required to establish the consequences of this interaction on the LPS-TLR4 signaling of monocytes. As CD141 can be a receptor for LPS in monocytes cells [20] and TMD1 can have a dominant negative effect on LPS signaling. We can hypothesises that CD93-CTLD can act as a dominant negative for LPS recognition by soluble CD93 and/or membranous CD93 in monocyte.

In summary, Erv1p and DsbC co-expression in *E. coli* allowed high yield expression and folding of CD93-CTL. This CD93-CTL can neutralize LPS as shown for soluble TMD1 of CD141. We report here for the first time the optimization of CD93-CTL expression in *E. coli* that allows further structural and functional studies of ill-characterized CD93 roles in innate immunity or others members of the group XIV C-type lectin like domain (CD141, CD248 and Clec14A).

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2016.10.003>.

Author contributions

A.F., B.N., T.I., J.C., P.G., and W.V. designed research; A.F., B.N., J.C., T.I., and W.V. performed research; A.F., T.I., J.C., B.N., P.G., and W.V. contributed new reagents/analytic tools; all authors analyzed data; B.N., A.F., T.I., P.G., and W.V. wrote the paper.

Acknowledgments

We thank the members of PIMIT/GRI and DÉTROI/GEICO laboratories for helpful discussions. We thank Catherine Cetre-Sossah for help with whole blood assay.

This work was supported by Federation BioST (formerly FedEBs) from Reunion Island University and by CPER FEDER GR11 Phase IV.

BN holds a fellowship (DIRED 20131515) from the Regional Council of Reunion Island.

References

- Greenlee, M.C., Sullivan, S.A., Bohlon, S.S., 2008. CD93 and related family members: their role in innate immunity. *Curr. Drug Targets* 9, 130–138.
- McGreal, E., Gasque, P., 2002. Structure-function studies of the receptors for complement C1q. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 1010–1014. <http://dx.doi.org/10.1042/bst0301010>.
- Bohlon, S.S., Silva, R., Fonseca, M.I., Tenner, A.J., 2005. CD93 is rapidly shed from the surface of human myeloid cells and the soluble form is detected in human plasma. *J. Immunol.* 175, 1239–1247. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.175.2.1239>.
- Jeon, J.-W., Jung, J.-G., Shin, E.-C., Choi, H.I., Kim, H.Y., Cho, M.-L., Kim, S.-W., Jang, Y.-S., Sohn, M.-H., Moon, J.-H., Cho, Y.-H., Hoe, K.-L., Seo, Y.-S., Park, Y.W., 2010. Soluble CD93 induces differentiation of monocytes and enhances TLR responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950 (185)*, 4921–4927. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0904011>.
- Wenzel, J., Assmann, J.C., Schwaninger, M., 2014. Thrombomodulin—a new target for treating stroke at the crossroad of coagulation and inflammation. *Curr. Med. Chem.* 21, 2025–2034.
- Abeyama, K., Stern, D.M., Ito, Y., Kawahara, K., Yoshimoto, Y., Tanaka, M., Uchimura, T., Ida, N., Yamazaki, Y., Yamada, S., Yamamoto, Y., Yamamoto, H., Iino, S., Taniguchi, N., Maruyama, I., 2005. The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism. *J. Clin. Invest.* 115, 1267–1274. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI200522782>.
- Ng, N.F., Hew, C.L., 1992. Structure of an antifreeze polypeptide from the sea raven. Disulfide bonds and similarity to lectin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 267, 16069–16075.
- Derman, A.I., Prinz, W.A., Belin, D., Beckwith, J., 1993. Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science* 262, 1744–1747.
- Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A., Beckwith, J., 1997. The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 272, 15661–15667.

- Lobstein, J., Emrich, C.A., Jeans, C., Faulkner, M., Riggs, P., Berkmen, M., 2012. SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microb. Cell Factories* 11, 56. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-11-56>.
- Stewart, E.J., Aslund, F., Beckwith, J., 1998. Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *EMBO J.* 17, 5543–5550. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.19.5543>.
- Kong, B., Guo, G.L., 2014. Soluble expression of disulfide bond containing proteins FGF15 and FGF19 in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *PLoS One* 9, e85890. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0085890>.
- Nguyen, V.D., Hatahet, F., Salo, K.E.H., Enlund, E., Zhang, C., Ruddock, L.W., 2011. Pre-expression of a sulfhydryl oxidase significantly increases the yields of eukaryotic disulfide bond containing proteins expressed in the cytoplasm of *E. coli*. *Microb. Cell Factories* 10 (1). <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-10-1>.
- Nativel, B., Marimoutou, M., Thon-Hon, V.G., Gunasekaran, M.K., Andries, J., Stanislas, G., Planesse, C., Da Silva, C.R., Césari, M., Iwema, T., Gasque, P., Viranaicken, W., 2013. Soluble HMGB1 is a novel adipokine stimulating IL-6 secretion through RAGE receptor in SW872 preadipocyte cell line: contribution to chronic inflammation in fat tissue. *PLoS One* 8, e76039. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0076039>.
- Li, Y.H., Zhao, X.H., Li, M., Yang, C.Q., Wang, L., Lin, J.T., 2013. Fast preparation of a poly-clonal antibody against chicken protocadherin 1. *Genet. Mol. Res. GMR.* 12, 2156–2166. <http://dx.doi.org/10.4238/2013.June.28.3>.
- McGreal, E.P., Ikwaki, N., Akatsu, H., Morgan, B.P., Gasque, P., 2002. Human C1qRp identical with CD93 and the mN1-11 antigen but does not bind C1q. *J. Immunol. Baltim. Md 1950 (168)*, 5222–5232.
- Guerin-Dubourg, A., Catan, A., Bourdon, E., Rondeau, P., 2012. Structural modifications of human albumin in diabetes. *Diabetes Metab.* 38, 171–178. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2011.11.002>.
- Viranaicken, W., Gamsi, L., Chauvin, C., Denoulet, P., Larcher, J.-C., 2006. Identification of a newly spliced exon in the mouse *Ilf3* gene generating two long and short isoforms of *Ilf3* and *NF90*. *Genomics* 88, 622–632. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.08.006>.
- Zelenksy, A.N., Gready, J.E., 2003. Comparative analysis of structural properties of the C-type-lectin-like domain (CTL). *Proteins* 52, 466–477. <http://dx.doi.org/10.1002/prot.10626>.
- Shi, C.-S., Shi, G.-Y., Hsiao, H.-M., Hsiao, S.-M., Kao, Y.-C., Kuo, K.-L., Ma, C.-Y., Kuo, C.-H., Chang, B.-I., Chang, C.-F., Lin, C.-H., Wong, C.-H., Wu, H.-L., 2008. Lectin-like domain of thrombomodulin binds to its specific ligand Lewis Y antigen and neutralizes lipo-polysaccharide-induced inflammatory response. *Blood* 112, 3661–3670. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-03-142760>.
- Hatahet, F., Boyd, D., Beckwith, J., 2014. Disulfide bond formation in prokaryotes: history, diversity and design. *Biochim. Biophys. Acta* 1844, 1402–1414. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.02.014>.
- de Marco, A., 2009. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Factories* 8, 26. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-8-26>.
- Zapun, A., Missiakas, D., Raina, S., Creighton, T.E., 1995. Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc)* 34, 5075–5089.
- Rosano, G.L., Ceccarelli, E.A., 2014. Recombinant protein expression in microbial systems. *Front. Microbiol.* 5. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00341>.
- Rehm, T., Huber, R., Holak, T.A., 2002. Application of NMR in structural proteomics: screening for proteins amenable to structural analysis. *Struct. Lond. Engl.* 1993(10), 1613–1618.
- Gronenborn, A.M., Clore, G.M., 1996. Rapid screening for structural integrity of expressed proteins by heteronuclear NMR spectroscopy. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 5, 174–177. <http://dx.doi.org/10.1002/pro.5560050123>.
- Gronenborn, A.M., 2003. Rapid screening of *E. coli* extracts by heteronuclear NMR. *Curr. Protoc. Protein Sci.* <http://dx.doi.org/10.1002/0471140864.p0711s31> Editor: Board John E Coligan Al. Chapter 7 Unit 7.11.
- Zelenksy, A.N., Gready, J.E., 2005. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* 272, 6179–6217. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05031.x>

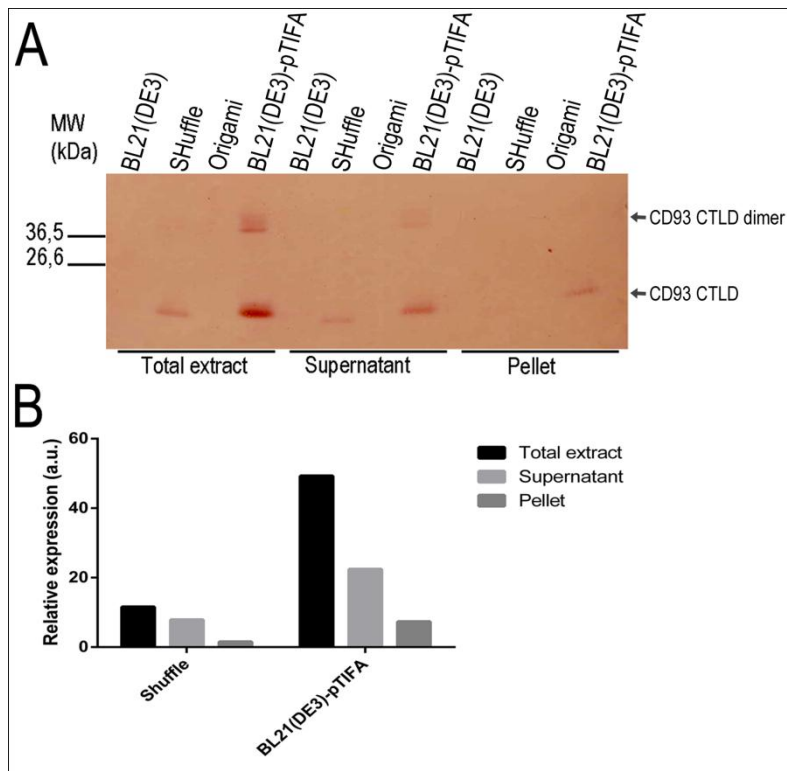
Supplementary Fig. S1: Optimized sequence of CD93-CTLD and Erv1p used during this study.

CD93-CTLD (*Homo sapiens*) optimized for *E. Coli* expression

```
catatgacaggtgCGGatacGgaagCGgttgTgtgTgtgTgTgGgacCGcttgctatacggcg
M T G A D T E A V V C V G T A C Y T A
catagtggcaaaactgagtgctgCCgaagCCcagaatcactgcaaccagaatggCGgcaat
H S G K L S A A E A Q N H C N Q N G G N
ctCGcgacCGtgaaatccaaggaagaagCGcagcatgtCCagCGgtactggcacagctg
L A T V K S K E E A Q H V Q R V L A Q L
ttgCGtCGtgaaCGgcaactgactgcaCGcatgtCGaaattctGGattGGtctgcaacgc
L R R E A A L T A R M S K F W I G L Q R
gagaaaggcaaatgtctGGatCCgtCGctgCCgttaaaggCGcttttctGGgtaggaggt
E K G K C L D P S L P L K G F S W V G G
ggagaggataccccgtacagcaactggcacaagaacttcGgaactCGtgcacagcaaa
G E D T P Y S N W H K E L R N S C I S K
CGctgtgtctctctgcttctGGacctctcaaacCGctgTtGcctagCCgcttaccGaaa
R C V S L L L D L S Q P L L P S R L P K
tggagtgaaggTccctgTggttcaccaggttctccagGcagcaacattgaggggTttgtg
W S E G P C G S P G S P G S N I E G F V
tgcaagTtcagctttaaaggctaagaattc
C K F S F K G
```

Erv1p (*Saccharomyces cerevisiae*) optimized for *E. Coli* expression

```
catatgaaagCGattgacaaaatgaccgacaacCCCGcCGcaagaaggTctgagTggCCgc
M K A I D K M T D N P P Q E G L S G R
aaaattatctacgacgaagatggcaaacCGtgTcgtagTtgcaataccctgctggatttt
K I I Y D E D G K P C R S C N T L L D F
cagtatgttacgggcaaaatttcaaacGGtctgaaaaatctgagctctaacGGcaaaactg
Q Y V T G K I S N G L K N L S S N G K L
gcaggtaccGGtgctctgaccGGtgaagcaagCGaactgatgCCGGgttctCGtacctat
A G T G A L T G E A S E L M P G S R T Y
CGcaaagTtgatCCgCCgagcttgaacaactGGgCCgagTtctGGaccctgctgcat
R K V D P P D V E Q L G R S S W T L L H
tcagTtggCGcaagctaccGGgctcagCCgaccgatcagcaaaaaggTgaaatgaaacaa
S V A A S Y P A Q P T D Q Q K G E M K Q
ttctgaaacattttcagccacatctatCCgtgcaactGGtgTgCGaaagacttcGaaaaa
F L N I F S H I Y P C N W C A K D F E K
tacatCCgtgaaaacgCCCCgaggtCGaatCCCGtgaagaactGGgtCGctggatgtgt
Y I R E N A P Q V E S R E E L G R W M C
gaagcacataacaaagtgaacaaaaaactgCGcaaacCGaaatttgattgtaacttctgg
E A H N K V N K K L R K P K F D C N F W
gaaaaacgctggaaagacGGgctGGgatgaataactCGag
E K R W K D G W D E
```



Supplementary Fig. S2: Evaluation of CD93-CTLD expression in different *E. coli* strains after biochemical separation between soluble (Supernatant) and insoluble extract (Pellet). **A.** Analysis by Western Blotting using E1A rat sera raise against CD93-CTLD. **B.** Quantification of CD93-CTLD monomer level in Shuffle and BL21(DE3)-pTIFA strains from panel A using ImageJ.

Résultats complémentaire:

Materials and methods

Protein expression and purification

CD93-CTLD protein was produced and purified in two overexpression system, *Drosophila* S2 cells and *E. coli* bacteria cells. We produced His-CD93-CTLD in *E. coli* BL21(DE3) as describe previously [540]. CD93-CTLD-SNAP is produced in *Drosophila* S2 cells were obtained by Insitut Pasteur (Center for Innovation & Technological Research. Team: Recombinant Proteins in Eukaryotic Cells). All of these proteins were His-tagged and were purified using Ni^{2+} (Ni-NTA) column followed by gel-filtration. Protein purification was confirmed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining or western blot using P1C5 (1/1000) antibody against CD93 and Snap tag antibody (1/1000) antibody (CAB4255, ThermoFisher) against SNAP. GelRed agarose gel electrophoresis was carried out to be sure that recombinant protein preparation lacks DNA or RNA. LAL assay was carried out to be sure that recombinant protein preparation lacks LPS, and level of LPS was under 1ng.L^{-1} . The proteins were quantified by bicinchoninic acid assay (BCA Assay). All recombinants proteins were stored at -80°C after flash frozen in liquid nitrogen.

ELISA assay for interaction

Maxisorp microplate (Nunc, Danemark) were coated with $100\ \mu\text{L}$ of LPS at $1\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ in PBS, overnight at 4°C . Wells were washed with Tris Buffered Saline (TBS) one time and with TBS-Tween 0.1% (v/v) three times followed by saturation with BSA 5% in TBS-Tween. The plates were then incubated for 30 min and washed 3 times as previously. After washing, plates were overlayed with His-CD93-CTLD between 0 to $10\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ in TBS with Tween 0.5% and BSA 5% for 2h and then washed. Mouse anti-CD93 (P1C5) (1:500) were used as primary antibodies in 1h incubation. Goat anti-Mouse HRP were used next as secondary antibodies. TMB One (Promega, France) was used for the revelation and reaction was stopped with HCl $0.2\ \text{mol.L}^{-1}$. Absorbance was read at 450nm with a reference filter at 570 nm.

Alternatively, Maxisorp microplate was coated with $100\ \mu\text{L}$ His-CD93-CTLD at $2\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ and saturated as above. Biotinylated LPS was added at different concentrations (from 0 to $10\ \mu\text{g.mL}^{-1}$). Plate was incubated 30 min at room temperature, then rinsed and HRP-strep were added at 1/1000 (Vector Labs, Clinisiences, France). After a washing step, ELISA was revealed as above.

Fluorescence experiments

Intrinsic tryptophan fluorescence studies of His-CD93-CTLD were performed in Phosphate buffered saline (PBS) with $150\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ of His-CD93-CTLD at 30°C . The interaction of His-CD93-CTLD with LPS, was investigated by recording the fluorescence emission spectra of the His-CD93-CTLD as a function of the LPS concentration. We also use LPS-FITC as a readout as a function of the His-CD93-CTLD concentration. Trp Fluorescence or FITC spectra were collected using a Horiba spectrofluorimeter (Fluoromax4) with an excitation wavelength at 295 nm or 495 nm with a slit of 5 nm and emission spectra was measured in the wavelength range of 320 to 360 nm or 500 to 650 with a slit of 5 nm for Trp Fluorescence or FITC respectively.

Results:

Production of CTLD-CD93

To investigate interaction between LPS and CD93-CTLD, we have used CD93-CTLD proteins produced in two overexpression system, *Drosophila* S2 cells and *E. coli* bacteria cells, we used these two systems to keep advantage of each, respectively proteins with or without post-translational modification and eventual bacterial contaminations. We produced His-CD93-CTLD in *E. coli* bacteria and CD93-CTLD-SNAP in *Drosophila* S2 cells. SNAP were used to obtained high yield of fusion proteins in supernatant of S2 Cells culture. All of these proteins were His-tagged and were purified using Ni²⁺(Ni-NTA) column followed by gel-filtration. The purity was analyzed by SDS-PAGE followed by coomassie-blue staining (Fig. 25A). We analyze also the protein expression by Western Blot. (Fig. 25B) We observe the same majority band of CD93-CTLD for CD93-CTLD-SNAP and his-CD93-CTLD. The lesser intense band can be due to oligomerisation of multiple CD93-CTLD as show previously [540].

CD93-CTLD interact with LPS

The CTLD domain of TM binds to LPS[423], to test further the hypothesis that CD93-CTLD could interact with LPS, we first performed an ELISA using highly purified recombinant human CD93-CTLD protein. Immobilized LPS was able to bind to His-CTLD-CD93 in dose-dependent manner (Fig. 26A). To rule out any bias with bacterial expression and contamination, we used CD93-CTLD-SNAP obtained from *Drosophila* S2 cells, we obtained the same results (Fig. 26B). We further test if immobilized His-CD93-CTLD was able to interact with LPS. We performed an ELISA using biotinylated-LPS as overlay molecules. We observed a dose dependant interaction between LPS and His-CD93-CTLD (Fig. 26C).

In ELISA one partner was immobilized. Immobilization can induce conformational change and non-specific binding. To rule out bias with this approach, we used two interactions assays in aqueous environment, using fluorescence of: intrinsic tryptophan CD93-CTLD or LPS-FITC. As CD93-CTLD contains tryptophan, we conducted spectrofluorescence analysis of CD93-CTLD in presence or not of LPS. CD93-CTLD tryptophan fluorescence decreased in dose dependant manner with increase dose of LPS (Fig. 27A). Furthermore, LPS-FITC fluorescence decreased in dose dependant manner with increase dose of his-CD93-CTLD (Fig. 27B).

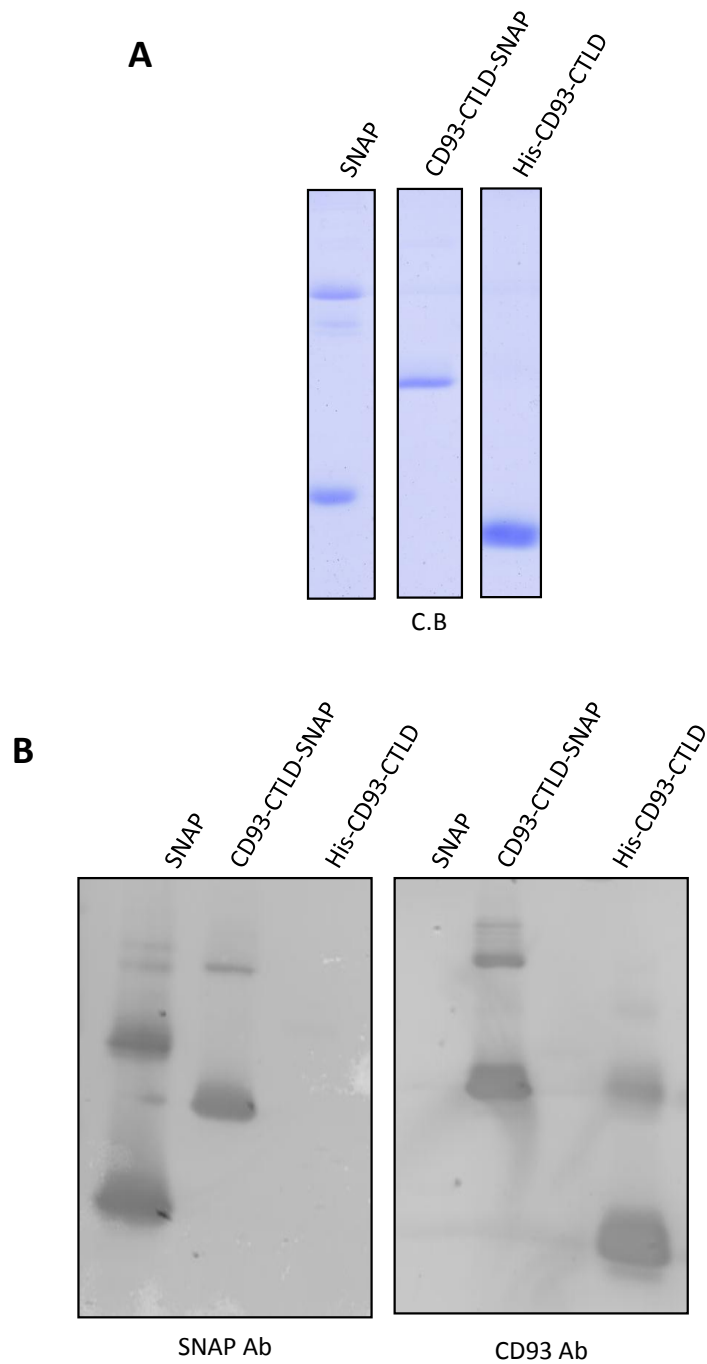


Figure 24. **CD93-CTL-D production.** CD93-CTL-D protein was produced and purified in two overexpression systems, *Drosophila* S2 cells and *E. coli* bacteria cells. **A.** Protein purification was confirmed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining or **B.** by western blot using P1C5 antibody against CD93 or Snap tag antibody against SNAP.

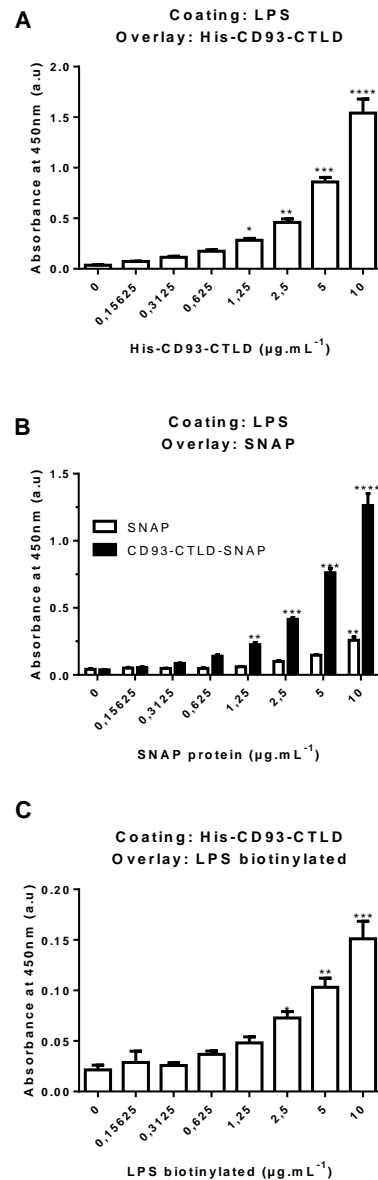
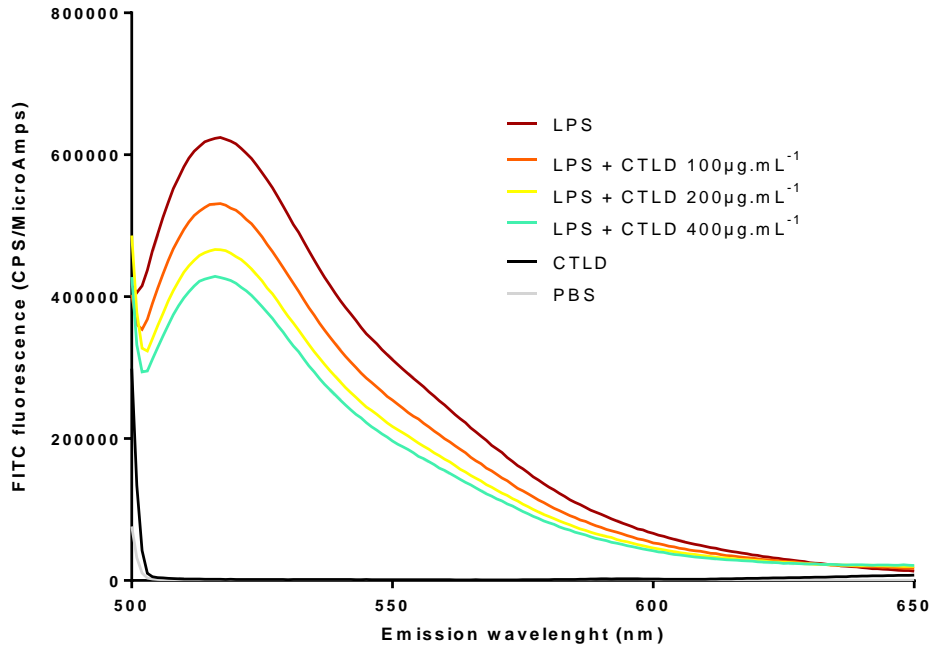


Figure 25. **ELISA assay for interaction between LPS and CD93-CTL D.** **A.** Microplate was coated with LPS at $1\mu\text{g.mL}^{-1}$. After washing and saturation, plates were overlayed with CD93-CTL D-SNAP or SNAP alone between 0 to $10\mu\text{g.mL}^{-1}$. Mouse anti-CD93 and goat anti-Mouse HRP were used for the revelation by chromogenic substrate. **B.** Microplate was coated with LPS at $1\mu\text{g.mL}^{-1}$. After washing and saturation, plates were overlayed with His-CD93-CTL D between 0 to $10\mu\text{g.mL}^{-1}$. Mouse anti-CD93 and goat anti-Mouse HRP were used for the revelation by chromogenic substrate. **C.** Microplate was coated with His-CD93-CTL D at $2\mu\text{g.mL}^{-1}$. After washing and saturation, plates were overlayed with biotinylated LPS between 0 to $10\mu\text{g.mL}^{-1}$. Streptavidine HRP was used for the revelation by chromogenic substrate. Results are presented as the mean \pm SEM from 3 independent experiments. Differences were determined by One-way ANOVA Turkey's test: * difference ($P < 0.05$), ** difference ($P < 0.01$), *** difference ($P < 0.001$), **** difference ($P < 0.0001$) compared to control.

A



B

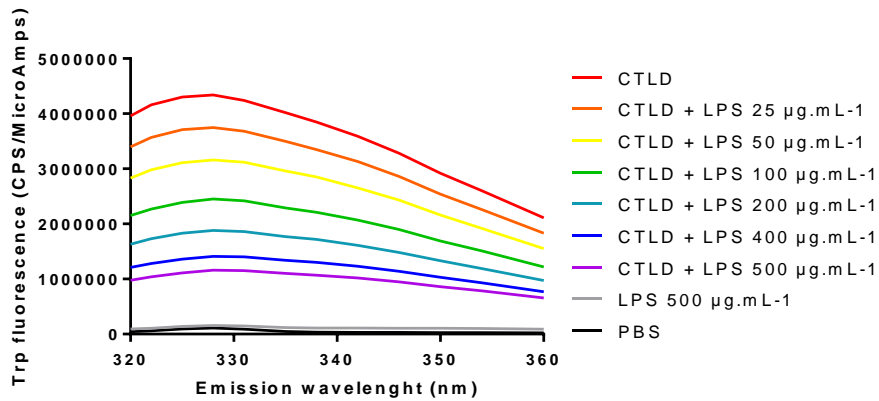


Figure 26. **LPS binding activity to CD93-CTLD by spectrofluorescence.** **A.** LPS binding activity was analyzed by measurement the fluorescence emission spectra of the FITC-LPS (at 250 µg.mL⁻¹) as a function of His-CD93-CTLD concentration (0 to 400 µg.mL⁻¹). Interaction were monitoring by the quantification of FITC fluorescence with an excitation at 495 nm and emission at 521 nm. **B.** LPS binding activity was analyzed by measurement the fluorescence emission spectra of the His-CD93-CTLD (at 150 µg.mL⁻¹) as a function of LPS concentration (0 to 500 µg.mL⁻¹). Interaction were monitoring by the quantification of Trp fluorescence with an excitation at 295 nm and emission at 330 nm. Results are representative of three independent experiments.

5. Etude 5: CD93 is a cell surface receptor for bacterial DNA and CpG oligonucleotides

Article en cours de rédaction.

Introduction:

CD93 est une protéine membranaire impliquée dans la régulation de l'adhésion cellulaire et de la phagocytose. CD93 est constitué d'un domaine CTLD (C-type lectin like domain), 5 domaines EGF (epidermal growth factors), un domaine mucine, un domaine transmembranaire, et un domaine intracellulaire. DEC-205 possède également des domaines CTLD et interagit avec les CpG ODN. Nous supposons que CD93 contribue à la reconnaissance des motifs CpG de l'ADN bactérien, comme le fait DEC-205, grâce à leurs domaines en commun le CTLD. Le but de cette partie est d'étudier l'interaction du CTLD de CD93 avec les motifs CpG de l'ADN bactérien. Nous examinerons également la contribution de cette liaison sur l'activation de l'inflammation.

Méthodologie:

-Analyse de l'interaction entre le CTLD-CD93 et CpG ODN ou l'ADN bactérien. Pour cela nous réaliserons un « ELISA interaction » et une mesure de la fluorescence des tryptophanes de CD93 en présence de concentration croissante de CpG ODN ou d'ADN bactérien.

-Exploration de la réponse inflammatoire des cellules par la liaison CTLD-CD93 avec CpG ODN ou l'ADN bactérien. Pour cela, une mesure de la production de cytokines inflammatoires par ELISA par les cellules transfectées ou non avec CD93 sera effectuée.

Résultats:

Nous avons mis en évidence que la protéine CD93 était capable d'interagir avec CpG ODN de type A et B, avec une grande affinité pour les CpG-A. Ces motifs étant retrouvés dans l'ADN bactérien, nous avons analysé également l'interaction entre CD93 et l'ADN bactérien. De plus nous avons montré, grâce à des cellules produisant CD93, que cette interaction était capable d'induire une production de cytokines inflammatoires.

Conclusion:

Ces résultats mettent en évidence l'interaction entre CD93 et les motifs CpG de l'ADN bactérien. CD93 pourrait être un nouveau récepteur de l'ADN bactérien. Quand CD93 est présent à la surface des cellules immunitaires et des cellules endothéliales, il peut agir comme récepteur lors d'infection bactérienne et induire une réponse inflammatoire.

CD93 is a cell surface receptor for bacterial DNA and CpG oligonucleotides

Brice Nativel [a,b](#), Stephane Ramin [a,b](#), Rudy Mevizou [a](#), Audrey Figuester [a](#), Jessica Andries [a](#), Thomas Iwema [a](#), Philippe Gasque [a,c,1*](#), Wildriss Viranaicken [a,c,1*](#)

a. GRI, EA4517, Université de la Réunion, Saint-Denis F-97400, France

b. Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète athérombose Réunion Océan Indien (DÉTROI), Saint-Denis de La Réunion, France

c. Université de La Réunion, INSERM 1187, CNRS 9192, IRD 249, UM 134 Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), Saint-Denis de La Réunion, France

1. Co-senior authors

* Corresponding authors : Dr Wildriss Viranaicken and Pr Philippe Gasque. E-mail addresses: wildriss.viranaicken@univ-reunion.fr and philippe.gasque@univ-reunion.fr

Thomas Iwema current address : CALIXAR, 60 Avenue Rockefeller, 69008 Lyon, France

Abstract

Bacterial DNA contains CpG oligonucleotide (ODN) which triggers innate immune responses through the endosomal receptor toll-like receptor 9 (TLR9). The only known cell surface receptor to capture and deliver microbial DNA to TLR9 is the C-type lectin DEC-205. DEC-205 has been described as a receptor for CpG ODN through its C-type lectin like domain (CTLD). CD93 is a cell surface protein which belongs to the lectin group XIV with a CTLD in the N terminal part. We hypothesized that CD93 could contribute to cell surface recognition of CpG motif of bacterial DNA, like DEC-205 and possibly serve as cell surface receptor to deliver CpG ODN to endosomal TLR9.

To this aim, we herein made use of soluble histidine-tagged CD93-CTLD and confirmed its interaction with CpG ODN and bacterial DNA using ELISA and tryptophan fluorescence binding studies. Moreover, we found that CD93-expressing IMR32 cells produced more IL-6 pro-inflammatory cytokine when exposed to CpG ODN and bacterial DNA, compared to un-transfected cells. Our data suggest a possible regulatory activity of CD93 to control cell responsiveness to bacterial DNA in a manner reminiscent of DEC-205. We postulate that CD93 can act as a receptor at plasma membrane for bacterial DNA or CpG ODN and allow access to endosomal TLR9 recognition and signaling.

Keywords: CD93, C-type lectin-like domain, inflammation, CpG ODN, bacterial DNA.

Introduction

CD93 is a type 1 transmembrane glycoprotein encoded by the CD93 gene localized on chromosome 20, position p11.21 in humans [1,2]. CD93 consists of a C-type lectin like domain (CTLD), five epidermal growth factors (EGF)-like domains, a mucin domain, a single transmembrane domain, and an intracellular domain [3–5]. Expression of CD93 occurs in various cell types including myeloid cells, hematopoietic stem cells, NK cells, platelets, microglia, and endothelial cells. CD93 regulates several processes involved in innate immunity and inflammation including phagocytosis and adhesion. Previously it has been shown that CD93 is shed from the surface of activated human monocytes and neutrophils resulting in release of a soluble form (sCD93). CD93 shedding was detected under inflammatory conditions [6]. sCD93 induced differentiation of monocytes to macrophage-like cells, as evidenced by activated cell adhesion and increased phagocytic activities. In addition, this differentiation resulted in an enhanced response to TLR stimulation in terms of differentiation marker expression and pro-inflammatory cytokine production [7].

Several pathogens associated molecular patterns (PAMPs) are derived from microorganisms and are recognized by cells of the innate immune system. There is a wide variety of PAMPs including lipopolysaccharide (LPS) and bacterial DNA. Bacterial DNA is highly rich in non-methylated CpG oligonucleotide which can trigger an innate immune response in different cell types including endothelial, monocyte, neutrophil, dendritic and macrophage [8–10]. CpG oligodeoxynucleotides (CpG ODN) mimic bacterial DNA action. Two major classes of CpG ODN existed CpG-A and CpG-B and they differ by their nucleotide sequence, CpG content, stability, and degree of phosphorylation. These CpG ODN contribute differentially to cell activation and maturation through their interaction with pattern recognition receptor (PRR), such as Toll like receptor 9 (TLR9) located in endosomes [11,12]. Downstream from this binding, the transcription factor NF κ B is activated and a pro-inflammatory response occur leading to cytokine and chemokine production.

TLR9 is present at cell surface in an inactive form which acquired the capacity to bind to DNA in endosomal compartment [13,14]. Due to their negative charges, CpG ODN as well as bacterial DNA needs a receptor to bind to cell membrane and uptake into endosomes to bind to TLR9. To date only the lectin CD205, also named DEC-205 or Clec13B, has been described as a receptor for CpG ODN on dendritic cells (DCs) and B-Cell [15]. The capacity and the mechanisms of other cell types negative for DEC 205 to respond to bacterial DNA remain poorly characterized.

DEC-205 also contains CTLD which are involved in the surface binding and uptake of CpG ODN and bacterial DNA. We hypothesized that CD93 can contribute to cell surface recognition of CpG motif of bacterial DNA, like DEC-205 due to their common structure organization with CTLD. Using different assay we showed an interaction between both bacterial DNA, class A and B CpG ODN and the CTLD of CD93. Cell surface over expression of CD93 increased cell responsiveness to CpG ODN and bacterial DNA

Material and Methods

Reagents

All reagents were from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, France), excepted when indicated. Biotinylated and non-biotinylated mixed phosphorothioate-phosphodiester ODNs were purchased from Eurofins MWG Operon, and have the following sequences (phosphorothioate regions in lower case, phosphodiester regions in capital letters): CpG-A ODN 2216: 5'-ggG GGA CGA TCG TCg ggg gg-3', CpG-B ODN 2006 (5'-tcg tcg ttt tgt cgt ttt gtc gtt-3'), CpG control: 5'- tgc tgc ttt tgt gct ttt gtc ctt-3'.

Protein expression and purification

We produced His- human CD93-CTLD in *E. Coli* BL21DE3 as described previously [16]. Briefly, the recombinant His-tagged protein was purified using Ni²⁺ (Ni-NTA) column followed by gel-filtration. GelRed agarose gel electrophoresis was carried out to ensure that recombinant protein preparation lacked DNA or RNA. LAL (to spell out) assay was carried out to show minimal presence of LPS in the recombinant protein preparation, under 1ng.L⁻¹ (limit of detection). The proteins were quantified by bicinchoninic acid assay (BCA Assay). All recombinants proteins were stored at -80°C after flash freezing in liquid nitrogen.

SDS-PAGE and Western blotting analysis

SDS-PAGE and Western blotting were conducted as previously described [16]. For Western blotting, the membrane was incubated with a monoclonal antibody against human CD93 (clone mNI-11) at 1:1000 dilution. Membranes were washed three times for 5 min and incubated with a 1:2000 dilution of horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse antibody (Vector Labs) for 1 h. Membranes were washed with TBS-Tween 20 (0,2%) three times and developed with the Novared system (Vector Labs) according to the manufacturer's protocol.

Bacterial DNA preparation

E. Coli DNA was extracted from BL21 (DE3) Clear Coli as before [17]. Briefly bacteria from an overnight culture in 1L of LB were pelleted and resuspended in 8 mL of 25 mmol.L⁻¹ Hepes pH 7.2. Then cells were lysed by sonication. After heating at 95°C for 10 min, denatured extract were centrifuged at 20000g, 25°C for 20 min. Supernatants were mixed with an equal volume of EDTA saturated phenol. Aqueous phase were recovered by centrifugation as before and then mixed with an equal volume of chloroform. Aqueous phase were recovered as above and precipitated with 0.3 mol.L⁻¹ sodium acetate pH 5.2 and 1,5 vol of absolute ethanol followed by an incubation overnight at -20°C. DNA was pellet at 12000g, 4°C for 15 min. After a washing step with 80% ethanol, DNA was resuspended in 25 mmol.L⁻¹ Hepes pH 7.2. DNA was quantified at 260 nm and 260:280 ratio was consider acceptable when it was superior to 1.8.

ELISA assay to test for CTLD-DNA interactions

Maxisorp microplates (Nunc, Danemark) were coated overnight at 4°C with 100 µL of *E. coli* bacterial DNA at 10µg.mL⁻¹. Or with 100µL of CpG ODN diluted at 1µmol.L⁻¹ in PBS. Wells were washed with Tris Buffered Saline (TBS) one time and with TBS-Tween 0.1% (v/v) three times followed. Saturation

with BSA 5% in TBS-Tween was then performed for 30 min and plates were washed 3 times as previously. Plates were then overlaid with His-CD93-CTLD at a concentration ranging from 0 to 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ in TBS with Tween 0.5% and BSA 5% for 2h. Plates were then washed. The mouse anti-CD93 (P1C5) (1:500) was used as a primary antibody for 1h. HRPO-conjugated oat anti-Mouse was used next as secondary antibody. TMB One (Promega, France) was used for the revelation and reaction was stopped with HCl 0.2 mol.L⁻¹. Absorbance was read at 450nm with a reference filter at 570 nm.

Alternatively, Maxisorp microplate was coated with 100 μL HisCD93-CTLD at 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and saturated as above. Biotinylated CpG was added at different concentrations ranging from from 0 to 10 μM . Plate was incubated 30 min at room temperature, then rinsed and HRPO-conjugated streptavidin was added at 1:1000 (Vector Labs, Clinisiences, France). After washings, ELISA was revealed as above.

Fluorescence experiments

Intrinsic tryptophan (TRP) fluorescence studies of His-CD93-CTLD were performed as described previously [16]. Briefly, His-CD93-CTLD was diluted in PBS at 150 $\mu\text{g/mL}$ and analysis was performed at 30°C. The interaction of His-CD93-CTLD with *E. Coli* bacterial DNA or CpG ODN was investigated by recording the fluorescence emission spectra of the His-CD93-CTLD exposed to increasing concentrations of *E.coli* DNA . A TRP fluorescence spectrum was collected using the Horiba spectrofluorimeter (Fluoromax4) with an excitation wavelength of 295 nm or 495 nm with a slit of 5 nm. Emission spectra were measured in the wavelength range of 320 to 360 nm.

Cell culture and Cell transfection

IMR32 cell were transfected with PDR2 empty vector (PRD2-EV) or PDR2-CD93 as described previously [16]. IMR32 transfected cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium 1640 completed with 10% (v/v) Foetal Bovine Serum (FBS), 2 mmol.L⁻¹ glutamine, 100 U.mL⁻¹ penicillin, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ streptomycin, 0.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ amphotericin B (PAN Biotech, Germany) at 37°C, 5% CO₂ in a humidified cell culture incubator.

Cytokine quantification

CD93- transfected IMR32 or EV-transfected IMR32 cells were plated in 96-well plates at a density of 1×10^5 cells.mL⁻¹ and treated with *E. coli* DNA (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) or CpG-A (10 μM). Supernatants were collected and the concentration of IL-6 was measured by ELISA (Ready-SET-Go![®], e-bioscience, Austria) according to the manufacturer's protocols.

Statistical Analysis

All data are presented as means \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using © GraphPad Prism 6 Software, Inc. One-way ANOVA, followed by Turkey's test were performed to compare each treatments. P values < 0.05 were considered significant.

Results

Soluble CD93-CTLD interacts with CpG ODN.

To test the hypothesis that CD93-CTLD could interact with CpG motifs in bacterial DNA, we first performed an ELISA using highly purified recombinant human CD93-CTLD protein. Immobilized CpG-A and CpG-B were able to interact with His-CTLD-CD93 in a dose-dependent manner (Fig. 1A). We further tested if immobilized His-CD93-CTLD was able to interact with CpG ODN. We performed an ELISA using CpG-A, CpG-B and a control CpG as overlay molecules. We observed a dose dependent interaction between CpG-A and CpG-B and His-CD93-CTLD (Fig. 2B). CpG-A had more affinity than CpG-B for His-CD93-CTLD while control CpG failed to interact with CD93 CTLD.

Of note, at least one binding partner was immobilized on the ELISA plate. Immobilization can induce conformational changes and non-specific binding. Hence, we also used an assay to test for protein-protein interactions in solution by measuring the fluorescence of intrinsic tryptophan of CD93-CTLD. We conducted spectrofluorescence analysis of CD93-CTLD in presence or absence of CpG-A. Remarkably, CD93-CTLD tryptophan fluorescence decreased in presence of increasing concentrations of CpG-A thus strongly suggesting an interaction of these two molecules (Fig. 1C).

CD93-CTLD interacts with bacterial DNA.

CpG was used to mimic pathogen-derived DNA. To further test the hypothesis that CD93-CTLD could interact with bacterial DNA, we first performed an ELISA using *E.coli* DNA. His-CTLD-CD93 was able to bind significantly to immobilize *E.coli* DNA in a dose-dependent manner (Fig. 2A).

Then, we performed fluorescence analysis of intrinsic tryptophan of CD93-CTLD to assess this interaction in solution. CD93-CTLD tryptophan fluorescence decreased in dose dependent manner with increasing doses of *E.coli* DNA (Fig. 2B).

These two experimental approaches strongly suggest interaction of CD93-CTLD with bacterial DNA.

CD93 over expression enhances the induction of inflammatory cytokine production by CpG ODN and bacterial DNA.

To analyze the role of CD93 as a modulator of extracellular DNA responses we used IMR32 cells transfected or not for human CD93 full length. Of note, we found by QRT-PCR that IMR32 expressed TLR9 mRNA (data not shown).

IMR32 human neuroblastoma cell line was either transfected with CD93 plasmid or empty plasmid (control). Cells were next stimulated with either *E.coli* DNA or CpG-A and analyzed for the production of IL-6 in the TCS by ELISA. We found that *E.coli* DNA as well as CpG-A induced a more robust expression of IL-6 in cells transfected with CD93 when compared to control cells (Fig. 3).

Discussion and conclusion

TLR9 is a canonical receptor to engage the innate immune response mediated by pathogenic DNA released from microbes but also from necrotic cells where extracellular cell-derived DNA will act as a major danger-associated molecular patterns (DAMPs or alarmins). TLR9 is known to be expressed principally by professional cells but recent studies have highlighted its expression by stromal cells such as neurons and endothelial cells (1, 2). TLR9 signaling can have contrasting effects and mediating either protective or pro-apoptotic activities but by ill-characterized mechanisms. DEC205 is an important lectin and co-receptor to deliver DNA to endosomal TLR9 but its expression is largely restricted to myeloid-derived immune cells.

We herein describe for the first time that human CD93 lectin with a domain organization similar to DEC205 can interact with immunostimulatory DNA.

Altogether, our results are in agreement with the capacity of CpG motifs in bacterial DNA to interact with the CTLD of CD93. Moreover, we demonstrated that CD93 interaction with CpG motifs in bacterial DNA could modulate the pro-inflammatory activity of CD93 transfected cells.

Critically, it has to be emphasized that CD93 in its membrane form will act as a receptor for bacterial DNA to induce pro-inflammatory activity. We could also speculate that, in contrast, soluble CD93 shed from the cell membrane could act as an inhibitor. This is reminiscent of the dual functional activities of receptors for alarmins such as thrombomodulin (CD141) and Receptor for advanced glycation end products (RAGE) [19,20].

One possible mechanism to avoid an overreacting innate immune response is to generate a soluble form of the same PRRs involved in cell activation through secretion or shedding mechanisms. This activity has been exemplified for many PRRs including TLR and RAGE [18,19].

Acknowledgments

Financial support was granted by CPER FEDER GR11 Phase IV to *PG*.

We thank members of PIMIT/GRI and DÉTROIT/GEICO laboratories for helpful discussions.

This work was supported by Federation BioST (formerly FedEBs) from Reunion Island University. BN hold a fellowship (DIRE 20131515) from Regional council of Reunion Island. We thank Dr Ikewaki (Japan) for kindly providing the mouse anti-human CD93 clone mNI11.

Figures legends

Figure 1: Immunostimulatory CpG A and B interact with the CTLD of CD93. **A.** ELISA experiments where microplate was coated with CpG-A or CpG-B at 1 μ M. Plates were overlaid with His-CD93-CTLTD ranging from 0 to 20 μ g.mL⁻¹. Detection of binding was revealed using mouse anti-human CD93 and HRPO-conjugated goat anti-mouse. **B.** Microplate was coated with His-CD93-CTLTD at 2 μ g.mL⁻¹. After washing and saturation, plates were overlaid with biotinylated CpG-A, CpG-B, or CpG-ctrl ranging from 0 to 3 μ M. Streptavidine HRPO was used for the Results are presented as the mean \pm SEM from 3 independent experiments. Differences were determined by One-way ANOVA Turkey's test: * difference (P < 0.05), ** difference (P < 0.01), *** difference (P < 0.001), **** difference (P < 0.0001) compared to control. **C.** Analyzis of CpG-A binding activity to His-CD93-CTLTD by spectrofluorescence. His-CD93-CTLTD (at 150 μ g.mL⁻¹) was incubated with CpG-A at different concentrations (0 to 20 μ M). Interactions were monitored by the quantification of Trp fluorescence with an excitation at 295 nm and emission at 330 nm. Results are representative of three independent experiments.

Figure 2: Bacterial DNA can bind to soluble CD93-CTLTD. **A.** Microplate was coated with *E. Coli* DNA at 10 μ g.mL⁻¹. After washing and saturation, plates were overlaid with His-CD93-CTLTD between 0 to 10 μ g.mL⁻¹. **B.** Analyzis of bacterial DNA binding activity to His-CD93-CTLTD by spectrofluorescence. His-CD93-CTLTD (at 150 μ g.mL⁻¹) was incubated with *E.coli* DNA ranging from 0 to 200 μ g.mL⁻¹.

Figure 3: CpG and bacterial DNA boost IL-6 expression in CD93 transfected cells. IMR32 (CD93 negative cells) cells (5 x 10⁵ cells.mL⁻¹) were transfected with or without CD93 (PDR2-CD93 and PDR2-EV respectively) and treated with either *E.coli* DNA at 10 μ g.mL⁻¹ or CpG-A at 10 μ M. The secretion of IL-6 in the supernatant was evaluated by ELISA. Results are presented as the mean \pm SEM from 3 independent experiments. Differences were determined by One-way ANOVA Turkey's test: * difference (P < 0.05), ** difference (P < 0.01), *** difference (P < 0.001).

References

1. Nepomuceno RR, Henschen-Edman AH, Burgess WH, Tenner AJ. cDNA cloning and primary structure analysis of C1qR(P), the human C1q/MBL/SPA receptor that mediates enhanced phagocytosis in vitro. *Immunity*. 1997;6: 119–129.
2. Steinberger P, Szekeres A, Wille S, Stöckl J, Selenko N, Prager E, et al. Identification of human CD93 as the phagocytic C1q receptor (C1qRp) by expression cloning. *J Leukoc Biol*. 2002;71: 133–140.
3. Greenlee MC, Sullivan SA, Bohlson SS. CD93 and related family members: their role in innate immunity. *Curr Drug Targets*. 2008;9: 130–138.
4. McGreal E, Gasque P. Structure-function studies of the receptors for complement C1q. *Biochem Soc Trans*. 2002;30: 1010–1014. doi:10.1042/bst0301010
5. Petrenko O, Beavis A, Klaine M, Kittappa R, Godin I, Lemischka IR. The molecular characterization of the fetal stem cell marker AA4. *Immunity*. 1999;10: 691–700.
6. Greenlee MC, Sullivan SA, Bohlson SS. Detection and characterization of soluble CD93 released during inflammation. *Inflamm Res*. 2009;58: 909. doi:10.1007/s00011-009-0064-0
7. Jeon J-W, Jung J-G, Shin E-C, Choi HI, Kim HY, Cho M-L, et al. Soluble CD93 induces differentiation of monocytes and enhances TLR responses. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010;185: 4921–4927. doi:10.4049/jimmunol.0904011
8. El Kebir D, József L, Pan W, Wang L, Filep JG. Bacterial DNA activates endothelial cells and promotes neutrophil adherence through TLR9 signaling. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009;182: 4386–4394. doi:10.4049/jimmunol.0803044
9. Trevani AS, Chorny A, Salamone G, Vermeulen M, Gamberale R, Schettini J, et al. Bacterial DNA activates human neutrophils by a CpG-independent pathway. *Eur J Immunol*. 2003;33: 3164–3174. doi:10.1002/eji.200324334
10. Hartmann G, Krieg AM. CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes. *Gene Ther*. 1999;6: 893–903. doi:10.1038/sj.gt.3300880
11. Takeshita F, Gursel I, Ishii KJ, Suzuki K, Gursel M, Klinman DM. Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9. *Semin Immunol*. 2004;16: 17–22.
12. Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008;42: 145–151. doi:10.1016/j.cyto.2008.01.006
13. Lee BL, Barton GM. Trafficking of endosomal Toll-like receptors. *Trends Cell Biol*. 2014;24: 360–369. doi:10.1016/j.tcb.2013.12.002
14. Ewald SE, Lee BL, Lau L, Wickliffe KE, Shi G-P, Chapman HA, et al. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature*. 2008;456: 658–662. doi:10.1038/nature07405
15. Lahoud MH, Ahmet F, Zhang J-G, Meuter S, Policheni AN, Kitsoulis S, et al. DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109: 16270–16275. doi:10.1073/pnas.1208796109
16. Nativel B, Figuester A, Andries J, Planesse C, Couprie J, Gasque P, et al. Soluble expression of disulfide-bonded C-type lectin like domain of human CD93 in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Immunol Methods*. 2016; doi:10.1016/j.jim.2016.10.003
17. Planesse C, Nativel B, Iwema T, Gasque P, Robert-Da Silva C, Viranaïcken W. Recombinant human HSP60 produced in ClearColi™ BL21(DE3) does not activate the NFκB pathway. *Cytokine*. 2015;73: 190–195. doi:10.1016/j.cyto.2015.01.028
18. LeBouder E, Rey-Nores JE, Rushmere NK, Grigorov M, Lawn SD, Affolter M, et al. Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003;171: 6680–6689.
19. Lee EJ, Park JH. Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE), Its Ligands, and Soluble RAGE: Potential Biomarkers for Diagnosis and Therapeutic Targets for Human Renal Diseases. *Genomics Inform*. 2013;11: 224–229. doi:10.5808/GI.2013.11.4.224
20. Conway EM, Van de Wouwer M, Pollefeyt S, Jurk K, Van Aken H, De Vriese A, et al. The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Exp Med*. 2002;196: 565–577.

Fig. 1 Nativel et al.

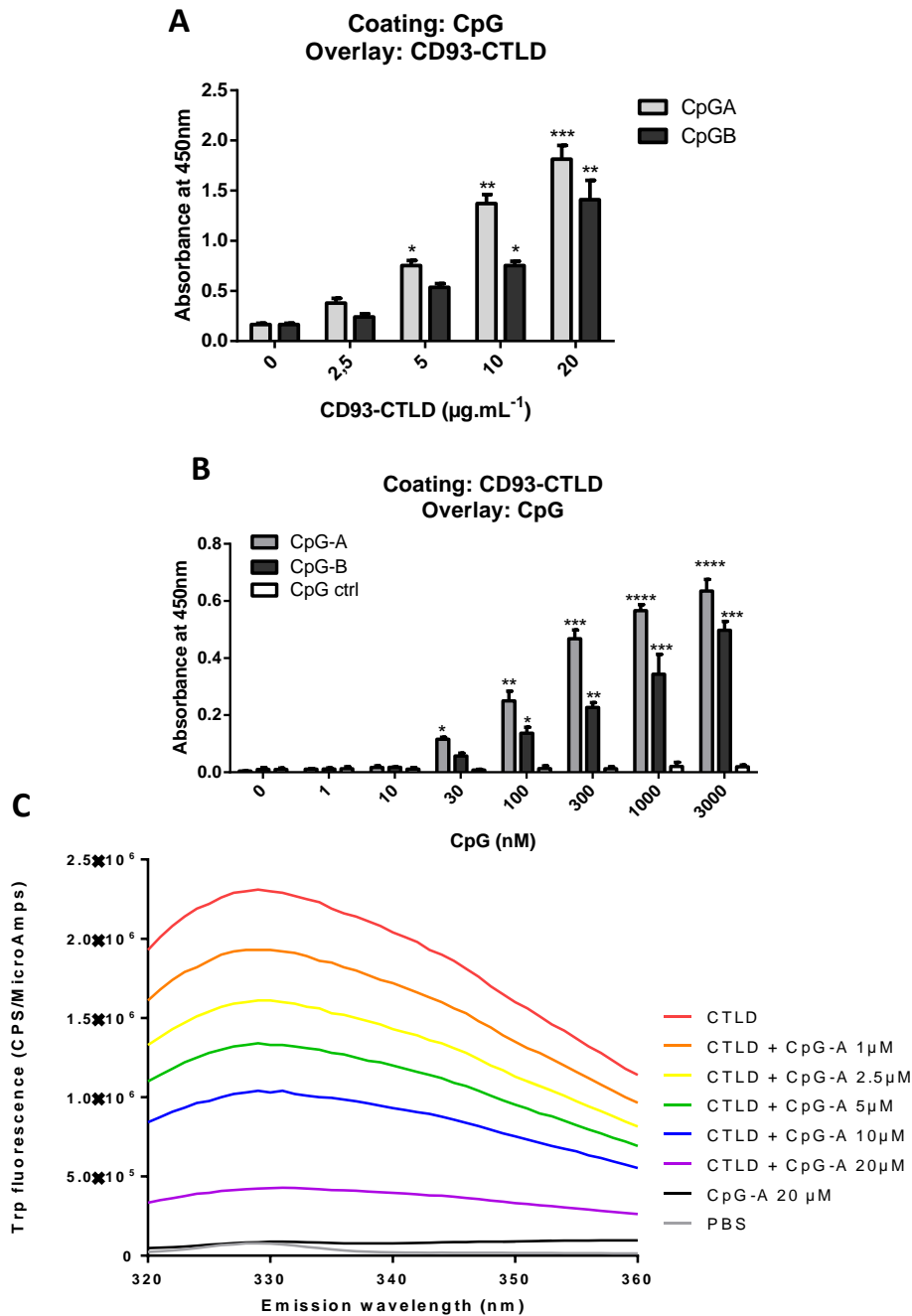


Figure 1: interaction between CpG ODN and CD93-CTL D. **A.** Elisa interaction. Microplate was coated with CpG-A or CpG-B at $1\mu\text{M}$. After washing and saturation, plates were overlaid with His-CD93-CTL D between 0 to $20\mu\text{g.mL}^{-1}$. Mouse anti-CD93 and goat anti-Mouse HRP were used for the revelation by chromogenic substrate. Absorbance was read at 450nm with a reference filter at 570 nm. **B.** Elisa interaction. Microplate was coated with His-CD93-CTL D at $2\mu\text{g.mL}^{-1}$. After washing and saturation, plates were overlaid with biotinylated CpG-A, CpG-B, or CpG-ctrl between 0 to 3 μM . Streptavidine HRP was used for the revelation by chromogenic substrate. Absorbance was read at 450nm with a reference filter at 570 nm. Results are presented as the mean \pm SEM from 3 independent experiments. Differences were determined by One-way ANOVA Turkey's test: * difference ($P < 0.05$), ** difference ($P < 0.01$), *** difference ($P < 0.001$), **** difference ($P < 0.0001$) compared to control. **C.** Analyze of CpG-A binding activity to His-CD93-CTL D by spectrofluorescence. CpG-A binding activity was analyzed by measurement the fluorescence emission spectra of the His-CD93-CTL D (at $150\mu\text{g.mL}^{-1}$) as a function of CpG-A concentration (0 to $20\mu\text{M}$). Interaction were monitoring by the quantification of Trp fluorescence with an excitation at 295 nm and emission at 330 nm. Results are representative of three independent experiments.

Fig. 2 Nativel et al.

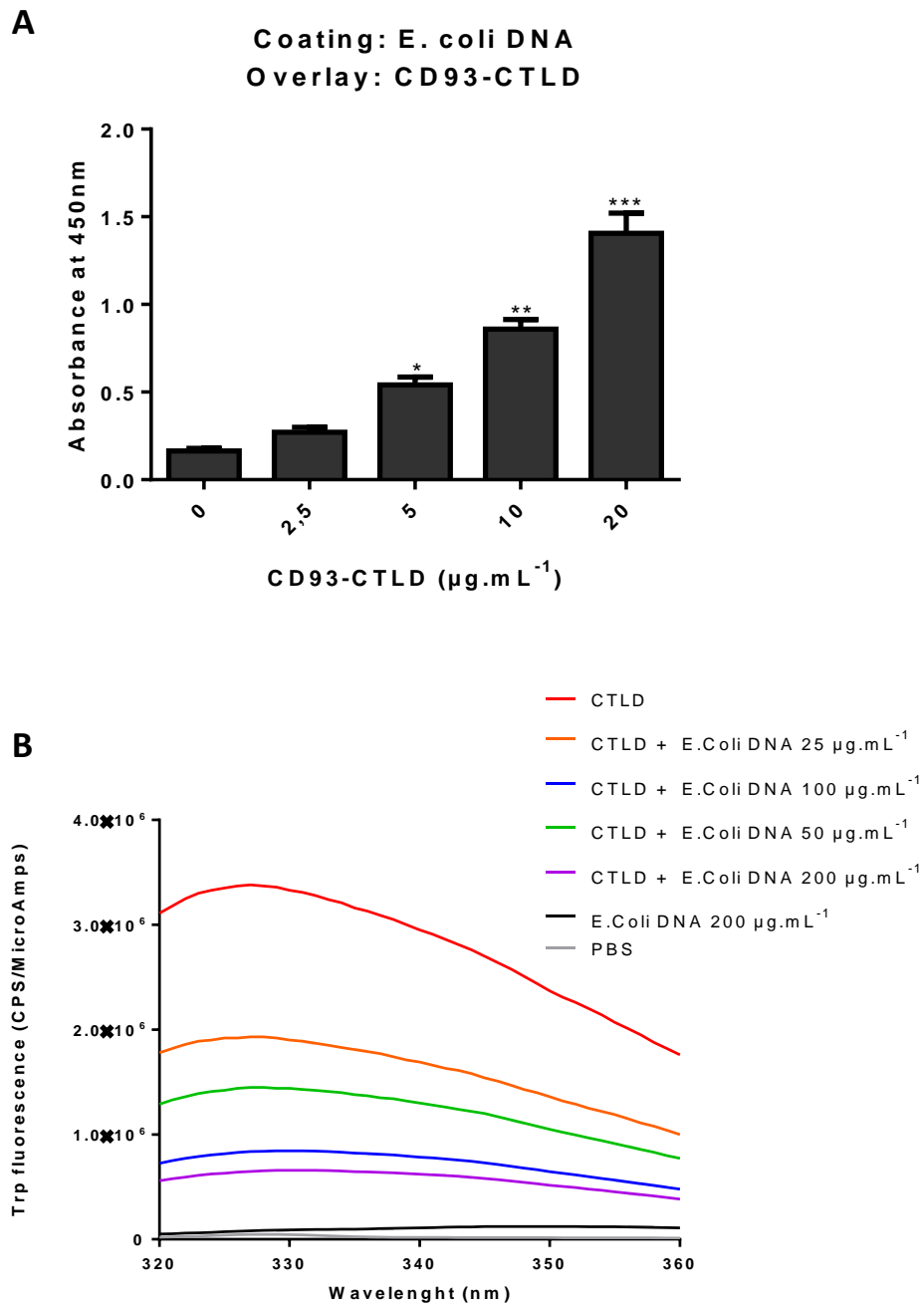


Figure 2: interaction between bacterial DNA and CD93-CTLTD. **A.** Microplate was coated with *E. coli* DNA at $10\mu\text{g.mL}^{-1}$. After washing and saturation, plates were overlayed with His-CD93-CTLTD between 0 to $10\mu\text{g.mL}^{-1}$. Mouse anti-CD93 and goat anti-Mouse HRP were used for the revelation by chromogenic substrate. Absorbance was read at 450nm with a reference filter at 570 nm. **B.** Analyze of bacterial DNA binding activity to His-CD93-CTLTD by spectrofluorescence. *E. coli* DNA binding activity was analyzed by measurement the fluorescence emission spectra of the His-CD93-CTLTD (at $150\mu\text{g.mL}^{-1}$) as a function of *E.coli* DNA concentration (0 to $200\mu\text{g.mL}^{-1}$). Interaction were monitoring by the quantification of Trp fluorescence with an excitation at 295 nm and emission at 330 nm.

Fig. 3 Nativel et al.

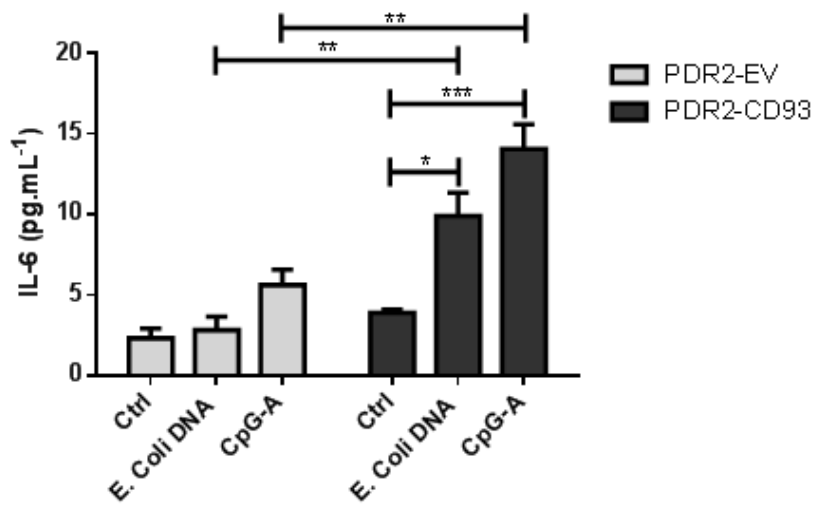


Figure 3: Inflammatory effect of interaction between CD93 and CpG motif in bacterial DNA. IMR32 cells (5×10^5 cells.mL⁻¹) transfected with or without CD93 (PDR2-CD93 and PDR2-EV respectively) were treated with *E.coli* DNA at $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ or CpG-A at $10 \mu\text{M}$. The secretion of IL-6 in the supernatant was evaluated by ELISA. Results are presented as the mean \pm SEM from 3 independent experiments. Differences were determined by One-way ANOVA Turkey's test: * difference ($P < 0.05$), ** difference ($P < 0.01$), *** difference ($P < 0.001$).

6. Etude 6: CD93 a potential new receptor for HMGB1.

Article en cours de rédaction.

Introduction:

CD93 est une protéine membranaire impliquée dans la régulation de l'adhésion cellulaire et de la phagocytose. CD93 possède plusieurs domaines communs avec les autres membres de sa famille (CD141, CD248 et Clec14a), en particulier le domaine CTLD. Chez CD141, ce domaine est impliqué dans l'inflammation, en interagissant avec HMGB1. Nous supposons que CD93 contribue à la reconnaissance de HMGB1, comme le fait CD141, grâce à leur domaine en commun le CTLD. Le but de cette partie est d'étudier l'interaction du CTLD de CD93 avec HMGB1 et de définir le domaine de HMGB1 responsable de cette interaction.

Méthodologie:

-Analyse de l'interaction entre le CTLD-CD93 et HMGB1. Pour cela nous allons réaliser un « ELISA interaction », une SPR (Surface Plasmon Resonance), une immunoprécipitation et un pull-down.

-Etude de l'interaction entre le CTLD-CD93 et les différents types et domaines de HMGB1. Pour cela nous réaliserons une production des différents types et domaines de HMGB1, et procéderons à un « ELISA interaction ».

Résultats:

Nous avons mis en évidence que la protéine CTLD-CD93 était capable d'interagir avec HMGB1. Nous avons également identifié que la queue acide de HMGB1 possède un rôle critique dans cette interaction. De plus il n'y a aucune implication de l'état redox de HMGB1 qui influence cette interaction.

Conclusion:

Il donc été mis en lumière que la protéine CTLD-CD93 était capable d'interagir avec HMGB1, plus précisément au niveau de sa queue acide. CD93 est clivé de la surface des monocytes et neutrophiles humain induisant la libération de sCD93. Par conséquent, nous émettons l'hypothèse que le CTLD de CD93 est capable d'interagir avec HMGB1 quand il est libéré dans le milieu extracellulaire. Ainsi, durant les phénomènes de nécrose ou d'inflammation sCD93 pourrait agir comme scavenger de HMGB1 et inhiber son activité pro-inflammatoire.

C-Type Lectin Like domain of human CD93 a potential receptor for HMGB1

Brice Nativel [a,b](#), Thomas Iwema [b,e](#), Jessica Andries [b](#), Philippe Gasque [b,c,d](#), Wildriss Viranaicken [b,c,*](#)

a. Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète athérombose Réunion Océan Indien (DÉTROI), Saint-Denis de La Réunion, France

b. GRI, EA4517, Université de la Réunion, Saint-Denis F-97400, France

c. Université de La Réunion, INSERM1187, CNRS 9192, IRD 249, UM 134 Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), Saint-Denis de La Réunion, France

d. Laboratoire de Biologie, LICE-OI, CHU de la Réunion, 97400, France

e. CALIXAR, 60 Avenue Rockefeller, 69008 Lyon, France

* Corresponding author Wildriss Viranaicken at: UMR PIMIT, Plateforme Technologique CYROI, 2, rue Maxime Rivière, 97490, Sainte-Clotilde, Ile de La Réunion, France. E-mail address: wildriss.viranaicken@univ-reunion.fr

Abstract

CD93 belongs to a family of innate immune receptors call CLR (C-type lectin receptors) and involved in the control of inflammatory processes in acute and chronic settings. Other family members with a C-type lectin-like domain (CTLD) include thrombomodulin (CD141), endosialin (CD248) and Clec14A. It has been demonstrated that CD141 can sequester HMGB1.

As CD93 is closely related to CD141, we specifically address the capacity of CD93 to interact with HMGB1. Using several biochemical approach we an interaction of CD93 trough it CTLD to HMGB1.. This interaction occurs independently of redox state of HMGB1through the acidic tail of HMGB1As soluble form of CD93 (sCD93) has been shown to be abundantly released in clinical and experimental inflammatory diseases our data suggest a possible regulatory activity of CD93 CTLD to control HMGB1 alarmin activity in a manner reminiscent of sCD141 and sRAGE.

Keywords: CD93, C-type lectin-like domain, HMGB1, Alarmin, inflammation.

Introduction

CD93 belongs to a family of innate immune receptors call CLR (C-type lectin receptors) and involved in the control of inflammatory processes in acute and chronic settings. CD93 is a type 1 glycosylated transmembrane protein with distinctive structural motifs including a C-type lectin-like domain (CTLD) and a series of five epidermal growth factor-like (EGF) domains, a mucin domain, a single transmembrane domain, and an intracellular domain [1–3]. CD93 is abundantly expressed by endothelial cells, platelets and by subsets of lymphocytes. Expression has also been described for monocytes and dendritic cells and is rapidly decreased upon cell differentiation. In rodents, CD93 is best known as the AA4.1 antigen, a marker particularly abundant on hematopoietic stem cells [3]. In the rat, CD93 is expressed by natural killer cells and may be involved in the control of innate immune activation processes [4,5]. Several pools of CD93 have been described, whether it is expressed at the cell membrane, cytosolic and under secreted forms particularly in response to tissue inflammation [4,6–8].

CD93 is a member of a family known as “the group XIV of C-type lectin” [9] and with a domain composition and organisation which bears resemblance to the other member of this family: thrombomodulin (CD141) [10], endosialin (CD248, also known as tumor endothelial marker number one, TEM1) [11] and Clec14A [12]. The CTLD of membrane form of CD141 has potent anti-inflammatory activity [13]. Furthermore, it has been demonstrated that sCD141 can sequester the nuclear protein HMGB1 (high-mobility group-B1) DNA-binding protein [14]. HMGB1 is known to control nuclear stabilisation of DNA, but it has an additional role as an alarmin or DAMP (Damage Associated Molecular Pattern) in mediating robust inflammation. By scavenging HMGB1, sCD141 may control the inflammatory response.

HMGB1 is comprised of 3 domains: A-box, B-box, and a highly acidic C-terminal tail. HMGB1 own 3 critical cysteins for it function (C23, C45, and C106). C23 and C45 are present in the A-box and formed a disulfide bond. In the extracellular compartment fully reduced HMGB1 (HMGB1-SH) acts as a chemokine, disulfide HMGB1 (HMGB1-SS) as a cytokine, and sulfonyl HMGB1 (HMGB1-SO) promotes immunological tolerance [15].

Moreover, it has been shown that CD93 is secreted (sCD93) in response to diverse infectious and inflammatory settings in animal models and in patients [16,17]. We hypothesize that like sCD141, sCD93 has the capacity to interact with HMGB1. Thus, we decided to focus on the interaction of the soluble form of CD93-CTLD and HMGB1.

Materials and methods

Production of recombinant proteins: CD93-CTLD and HMGB1.

HMGB1 and CD93-CTLD protein was produced as describe previously [18,19]. The different domain of HMGB1 was produced using the same protocol but with sequence coding for human HMGB1 A-box domain (residues 1-84), B-box domain (residues 84 to 164), or B-box and acidic tail domain (residues 84-215). As describe previously, HMGB1 was produce and purified as disulfide bonded form in HBS (Hepes 50mM,150 mM NaCl). To obtain reduced HMGB1 (HMGB1 SH) DDT were added to HMGB1 SS at 10mM followed by dialysis against HBS with 1mM DTT.

GelRed agarose gel electrophoresis was carried out to be sure that recombinant protein preparation lacks DNA or RNA. LAL assay was carried out to be sure that recombinant protein preparation lacks LPS, and level of LPS was under 1ng.L^{-1} . The proteins were quantified by bicinchoninic acid assay (BCA Assay). All recombinants proteins were stored at -80°C after flash frozen in liquid nitrogen.

Test of CTLD-HMGB1 interaction by ELISA.

Maxisorp microplate (Nunc, Danemark) 96 well plates were coated with 100 μL of HMGB1 or HMGB1's domain at $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ overnight in PBS at 4°C . Wells were washed with Tris Buffered Saline (TBS) one time and with TBS-Tween 0.1% (v/v) three times followed by saturation with blocking buffer (PBS with 0.1% Tween 20 and 5% BSA) for 30 min at 25°C . After washing, plates were overlayed with his-CTLD-CD93 in blocking buffer (from 0 to $5\mu\text{g.mL}^{-1}$), incubated for 2 h at 25°C . Then washed with washing buffer, and plates were incubated with anti-CD93 (clone P1C5, $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ in blocking buffer) for 1 h at 25°C . Plates were washed, then treated 30 min with anti-mouse HRP and finally the potent interactions were revealed using TMB One (Promega, France) as HRP substrate and reaction was stopped with HCl 0.2 mol.L^{-1} . Absorbance was read at 450nm with a reference filter at 570 nm.

Alternatively, Maxisorp microplate was coated with $100\mu\text{L}$ HisCD93-CTLD at $2\mu\text{g.mL}^{-1}$ and saturated as above. HMGB1 was added at different concentrations (from 0 to $5\mu\text{g.mL}^{-1}$). Plate was incubated 30 min at room temperature. After a washing step, ELISA was revealed as above with anti-mouse HRP and TMB One.

Cell culture and Cell transfection

IMR32 cell were transfected with PDR2 empty vector (PRD2-EV) or PDR2-CD93 as describe previously [16]. IMR32 transfected cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium 1640 completed with 10% (v/v) Foetal Bovine Serum (FBS), 2 mmol.mL^{-1} glutamine, 100 U.mL^{-1} penicillin, $100\mu\text{g.mL}^{-1}$ streptomycin, $0.5\mu\text{g.mL}^{-1}$ amphotericin B (PAN Biotech, Germany) at 37°C , 5% CO_2 in a humidified cell culture incubator.

Flow cytometry

IMR32 cell transfected with PRD2-EV or PDR2-CD93 were harvested after two washes with PBS, then pelleted at 800 g for 5 min. Cells were incubated with 5% (w/v) BSA in PBS for 20 min at room temperature under agitation, then with or without HMGB1-His at $2\mu\text{g.mL}^{-1}$ in PBS-BSA for 1 h at

room temperature under agitation. Primary and secondary antibodies were diluted in PBS-BSA and incubated at room temperature with agitation for 45 min. Primary antibody was anti-HMGB1 (clone W18, Santa cruz) at 1:75 dilution, and secondary antibody was anti-mouse conjugated to R-Phycoerythrin (polyclonal antibody, Southern Biotech) at 1:500 dilution. After two washes with PBS, cells were harvested in PBS. For each experiment 10000 cells were counted and were analyzed by flow cytometry (Beckman Coulter FC-500-MPL Flow Cytometer, MXP acquisition software and CXP analysis software, version 2.2).

Protein extract

IMR32 cell transfected with PDR2-CD93 or cells were UV radiated at 400 mJ (Stratagene UV Stratalinker 2400) and then incubated at 37°C with 5% CO₂ for up to 4 hours to induce apoptosis. Apoptotic cells (5 x 10⁶ cells) were lysed in 5 mL of PBS with 1% NP40 at 4°C for 15 min. Lysate was centrifuged for 15 min at 15000 g, 4°C,

CD93-CTL D Immunoprecipitation

We used Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) affinity column for immunoprecipitation as describe by the supplier. Briefly, the protein extract from IMR32 cell transfected with PDR2-CD93 was incubated with rabbit IgG (negative control) or rabbit IgG anti-CD93 (produced previously [20]) for 2 h, then load into 500µL of Protein G Sepharose. After several wash, column beads were treated with SDS-PAGE loading buffer without DTT and tested for HMGB1 and CD93 content by western-blotting.

CD93-CTL D pull-down assay

Affinity column was performed using Ni²⁺ (Ni-NTA) (Qiagen, Germany). For Ni-NTA, 500 µg of His-CTL D CD93 were applied onto 0.5 mL of Ni-NTA resin in PBS with 1% NP-40. The apoptotic Jurkat protein extract was pre-cleared on 0.5 mL of Ni-NTA agarose to reduce nonspecific binding during pull-down experiment. Pre-cleared extracts were separated in two parts; one was loaded on Ni-NTA resin (negative control) and the other part to Ni-NTA-His-CTL D CD93. After washing with 10 bed volumes of PBS-NP40 with 30 mM imidazole, proteins bound to the resin were eluted with 2 mL of PBS-NP40 with 300 mM imidazole. Eluted fractions were tested for HMGB1 content by Western-blotting.

SDS-PAGE and Western blotting analysis

SDS-PAGE and Western blotting were conducted as previously described [18]. For Western blotting, the membrane was incubated with a monoclonal antibody against human CD93 (clone mNI-11) or against HMGB1 (clone W-18) at 1:1000 dilution. Membranes were washed three times for 5 min and incubated with a 1:2000 dilution of goat horseradish peroxidase conjugated anti-mouse (Vector Labs) for 1 h. Membranes were washed with TBS-Tween 20 0,2% three times and developed with the Novared system (Vector Labs) according to the manufacturer's protocol.

SPR analyses of CD93 CTLD-HMGB1 interaction and data evaluation

Analyses were performed on a BIAcore 3000 instrument (GE Healthcare). Immobilizations were performed using the amine coupling chemistry in 150 mM NaCl, 10 mM Hepes, pH 7.4, 0.005% surfactant P20 (HBS-P) on CM5 sensor chips (GE Healthcare). Recombinant HMGB1-FL was diluted to 10 µg/ml in 10 mM sodium acetate (pH 4.5) and CD93 -CTL D were diluted to 1 µg/ml in 10 mM sodium acetate (pH 5.0) prior to immobilization. Binding to immobilized HMGB1 (1190 RU) and CD93 (1020 RU) was measured at a flow rate of 30 µl/min in HBS-P. A control flow cell submitted to the coupling steps without immobilized protein was used as reference and the specific binding signal was obtained by subtracting the background signal over the reference surface. Regeneration of the surfaces was achieved by injections of 10 µl of 1 M NaCl.

Data were analyzed by global fitting to a 1:1 Langmuir binding model of both the association and dissociation phases for five analyte concentrations simultaneously, using the BIAevaluation 3.2 software (GE Healthcare). Buffer blanks were subtracted from the data sets used for kinetic analysis (double referencing). The apparent equilibrium dissociation constants (K_D) were calculated from the ratio of the dissociation and association rate constants (k_d/k_a). Data fitting yielded satisfactory Chi2 values (< 1.4, see table I).

Statistical Analysis

All data are presented as means ± standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using © GraphPad Prism 6 Software, Inc. One-way ANOVA, followed by Turkey's test were performed to compare each treatments. P values < 0.05 were considered significant.

Results

HMGB1 binds to CD93-CTLD

To test further the hypothesis that HMGB1 could interact with CD93, we first performed an ELISA using highly purified recombinant human HMGB1 protein. Immobilized HMGB1 was able to bind to CTLD-CD93 in dose-dependent manner (Fig. 1A), and conversely, immobilized CTLD-CD93 was able to bind to HMGB1 in a dose-dependent manner (Fig. 1B). Then, we used surface plasmon resonance (SPR) to assess the kinetics of the interaction between CD93-CTLD and immobilized full-length HMGB1 (Fig. 1C). CD93 bound to HMGB1 variants in a dose-dependent manner. Kinetic analyses of the binding curves were performed using global fitting to a 1:1 Langmuir model and the apparent equilibrium constants determined from the ratio of the dissociation and association rate constants (Table I). The K_D values were in the nanomolar range, reflective of high affinity of the interaction between HMGB1 and CD93-CTLD.

CD93-CTLD interact with endogenic HMGB1

In ELISA and SPR one partner was immobilized. Immobilization can induce conformational change and non-specific binding. To rule out errors with this approach, we used interaction assays in aqueous environment, using cells as source of endogenic HMGB1. We used flow cytometer to analyze the cellular interaction of full length CD93 with HMGB1. IMR32 transfected with CD93 (PDR2-CD93) interact with HMGB1 more importantly that IMR32 transfected with empty vector (PDR2-EV) (Fig.2).

Then, we used interaction assays in aqueous environment, using an immunoprecipitation and pull-down. First, we used an affinity column with rabbit IgG anti-CD93 or Rabbit IgG control coupled to a stationary phase through the Fc part of the antibody. We used protein extract from apoptotic Jurkat cell to obtain HMGB1 released during apoptosis. Protein extracts from apoptotic cells were loaded onto the column and after several washes; proteins bound to the stationary phase were eluted and tested for their content for CD93 and HMGB1. We used anti rabbit IgG as control. We observed enrichment for endogenous HMGB1 and CD93 immobilized to the column (Fig. 3A). Next, we used an affinity column pull-down assay using CTLD-CD93 coupled to a stationary phase through its histidine tag. Protein extracts from apoptotic Jurkat cells were loaded onto the column and after several washes; proteins bound to the stationary phase were eluted and tested for their content for HMGB1. We observed enrichment for endogenous HMGB1 immobilized to His-CTLD CD93 (Fig. 3B).

Characterization of the interaction between HMGB1 and CD93-CTLD

To characterize the interaction of HMGB1 and CD93-CTLD, we produced different domains of HMGB1: A-box domain, B-box domain, or B-box and acidic tail domain (Fig. 4A) or HMGB1 with or without disulfide bond (Fig. 4B). We observe a different migration profile between HMGB1-SS and HMGB1-SH, this difference is the consequence of the lost of the disulfide bridge.

We first performed an ELISA using full length of different oxidation of HMGB1. Immobilized HMGB1 with (HMGB1-SS) or without (HMGB1-SH) disulfide bond were able to bind to CTLD-CD93 (Fig. 5A).

We next performed an ELISA using different domains of HMGB1, immobilized A-box SH, B-box, and A-box SS (data not show), weren't able to bind to CTLD-CD93. While the B-box with the acidic tail was able to bind to CTLD-CD93 (Fig. 5B).

Discussion

There is a growing list of damage-associated molecular patterns (DAMP) derived from the host such as the HMGB1, heat shock proteins and S100, many of which will signal through the same PRRs (TLR4, TLR2, RAGE) as those used for the recognition of pathogen associated molecular patterns (PAMP). This recognition is critically important for the activation of innate immune cells such as macrophages.

CD93 could be released in the extracellular milieu by matrix metalloproteases [7]. Shedding of CD93 might also contribute to elevated levels of sCD93 observed in several inflammatory settings [16]. More recent investigations have suggested that sCD93 controls innate immune activation of monocytes and monocyte cell lines engaged by several membrane and cytosolic TLR [8]. Our study further suggests that sCD93 behaves as a scavenger molecule in a manner particularly reminiscent of sCD141 and sRAGE through its capacity to interact with HMGB1.

We demonstrate that HMGB1 can interact with CD93. This was confirmed by: ELISA interaction, SPR, Immunoprecipitation, and receptor-ligand pull-down. The presence of the disulfide bridge of HMGB1 is no required for the interaction of CD93.

The interaction domain of HMGB1 with the DNA, p53, and TLR4 is present in HMG boxes [21]. Whereas the binding domain of RAGE receptor is present in the acidic tail (residue 150-183) [22]. The acidic C-terminal domain forms a flexible structure which can reversibly interact intramolecularly with the HMG boxes and modulate binding to DNA and other proteins [23]. We also identified indirectly the acidic tail as the interaction domain with the CTLD of CD93.

CD93 is indeed an acute phase protein and its expression is highly increased in inflamed tissues such as stroke [24]. We don't know whether sCD93 can be released in the injury but our data would suggest that it may contribute to the scavenging of HMGB1 proinflammatory activities. CD93 gene had arisen from CD141 gene duplication and our data suggest functional conservation of the N-terminal domain between both proteins [4]. It will be interesting to address the expression levels of sCD93 in diseases patients and whether complexes of HMGB1 with sCD93 would be detected. It will also be interesting to address the molecular properties of HMGB1 complex with sCD93 and the relation to TLR2, TLR4 and RAGE signalling capacities. We also should not ignore the possible interaction between CD93 membrane form and HMGB1 associated or not with other molecules.

Conclusion

This is the first description of CD93-HMGB1 interaction, which may be important to better understand the role of CD93. We considered that the innate immune function of CD93 could be mediated in a manner reminiscent of sCD141 and sRAGE through the scavenging of harmful proinflammatory molecules.

Acknowledgments

We thank the members of PIMIT/GRI and DÉTROI/GEICO laboratories for helpful discussions.

We acknowledge access to the SPR facility of the Partnership for Structural Biology in Grenoble.

This work was supported by CPER FEDER GR11 Phase IV. BN hold a fellowship (DIREC 20131515) from Regional council of Reunion Island.

TABLE I :Kinetic and dissociation constants for binding of CD93 (CTL D) to immobilized full-length HMGB1

	Immobilized HMGB1 (full length)			
	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)	Chi2
CD93 (1st exp)	9.43×10^5	3.95×10^{-3}	4.18	1.32
CD93 (2nd exp)	1.13×10^6	3.74×10^{-3}	3.31	1.39

Figures legend

Figure 1: interaction between HMGB1 and CD93-CTL D. (A) Microplate was coated with HMGB1 at $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. After washing and saturation, plates were overlaid with His-CD93-CTL D between 0 to $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Mouse anti-CD93 and goat anti-Mouse HRP were used for the revelation by chromogenic substrate. (B) Microplate was coated with His-CD93-CTL D at $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. After washing and saturation, plates were overlaid with HMGB1 between 0 to $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Anti-HMGB1 (W18) antibody and secondary HRP antibody were used for the revelation by chromogenic substrate. Results are presented as the mean \pm SEM from 3 independent experiments. Differences were determined by One-way ANOVA Turkey's test: * difference ($P < 0.05$), ** difference ($P < 0.01$), *** difference ($P < 0.001$), **** difference ($P < 0.0001$) compared to control. (C) SPR kinetic analysis of the interaction between CD93-CTL D and immobilized HMGB1. Ninety μl of CD93 ($1, 2, 4, 8$ and $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$) were injected over 1190 RU of immobilized HMGB1. The specific binding signals shown were obtained by subtracting the background signal over a reference surface with no protein immobilized and further subtracting buffer blanks from the data sets. Fits are shown as dotted lines and were obtained by global fitting of the data using a 1:1 Langmuir binding model. The results shown are representative of 2 experiments. See Numerical data in Table I.

Figure 2: Flow cytometry interaction between HMGB1 and CD93. IMR32 cells were pelleted then were incubated with (+HMGB1) or without HMGB1 (-HMGB1) at $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Primary antibody was anti-HMGB1, and secondary antibody was anti-mouse conjugated to R-Phycoerythrin. Cells were analyzed in cytometer.

Figure 3: Endogenous HMGB1 interacts with CD93-CTL D. (A) Immunoprecipitation assay on control or anti-CD93 beads using IMR32-PDR2-CD93 cell lysates. Protein eluted purification was confirmed by SDS-PAGE followed by western blot using P1C5 antibody against CD93 or anti-HMGB1 antibody (clone W18). (B) Pull-down assay of HMGB1 on control (Ni-NTA) or CD93-CTL D beads (Ni-NTA His-CD93-CTL D) using Jurkat cell lysates. Protein eluted purification was confirmed by SDS-PAGE followed by western blot anti-HMGB1 antibody (clone W18).

Figure 4: Production of His-CD93-CTL D, different types of HMGB1 and HMGB1's domains. (A) Gel SDS-PAGE of His-CD93-CTL D, His-HMGB1-SH, His-A-box SH domain, His-B-box domain, or His-B-box and acidic tail domain (B-box Cter) with DTT. Gel was colored with Coomassie Blue. (B) Gel SDS-PAGE of His-HMGB1-SS (without DTT) and His-HMGB1-SH (with DTT). Gel was colored with Coomassie Blue.

Figure 5: ELISA interaction between different types of HMGB1 and HMGB1's domains and CD93-CTL D. (A) Microplate was coated with HMGB1-SS or HMGB1-SH at $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. After washing and saturation, plates were overlaid with His-CD93-CTL D at $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Mouse anti-CD93 and goat anti-Mouse HRP were used for the revelation by chromogenic substrate. (B) Microplate was coated with HMGB1-SH, A-box SH, B-box or B-box with the acidic tail at $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. After washing and saturation, plates were overlaid with His-CD93-CTL D at $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Mouse anti-CD93 and goat anti-Mouse HRP were used for the revelation by chromogenic substrate. Results are presented as the mean \pm SEM from 3 independent experiments. Differences were determined by One-way ANOVA Turkey's test: * difference ($P < 0.05$), ** difference ($P < 0.01$), and *** difference ($P < 0.001$) compared to control.

References

- [1] M.C. Greenlee, S.A. Sullivan, S.S. Bohlson, CD93 and related family members: their role in innate immunity, *Curr. Drug Targets*. 9 (2008) 130–138.
- [2] E. McGreal, P. Gasque, Structure-function studies of the receptors for complement C1q, *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2002) 1010–1014. doi:10.1042/bst0301010.
- [3] O. Petrenko, A. Beavis, M. Klaine, R. Kittappa, I. Godin, I.R. Lemischka, The molecular characterization of the fetal stem cell marker AA4, *Immunity*. 10 (1999) 691–700.
- [4] Y.D. Dean, E.P. McGreal, H. Akatsu, P. Gasque, Molecular and cellular properties of the rat AA4 antigen, a C-type lectin-like receptor with structural homology to thrombomodulin, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 34382–34392. doi:10.1074/jbc.M006229200.
- [5] G. Løvik, K. Larsen Sand, J.G. Iversen, B. Rolstad, C1qRp Elicits a Ca⁺⁺ Response in Rat NK Cells but Does not Influence NK-Mediated Cytotoxicity, *Scand. J. Immunol.* 53 (2001) 410–415. doi:10.1046/j.1365-3083.2001.00895.x.
- [6] Y.D. Dean, E.P. McGreal, P. Gasque, Endothelial cells, megakaryoblasts, platelets and alveolar epithelial cells express abundant levels of the mouse AA4 antigen, a C-type lectin-like receptor involved in homing activities and innate immune host defense, *Eur. J. Immunol.* 31 (2001) 1370–1381. doi:10.1002/1521-4141(200105)31:5<1370::AID-IMMU1370>3.0.CO;2-B.
- [7] S.S. Bohlson, R. Silva, M.I. Fonseca, A.J. Tenner, CD93 Is Rapidly Shed from the Surface of Human Myeloid Cells and the Soluble Form Is Detected in Human Plasma, *J. Immunol.* 175 (2005) 1239–1247. doi:10.4049/jimmunol.175.2.1239.
- [8] J.-W. Jeon, J.-G. Jung, E.-C. Shin, H.I. Choi, H.Y. Kim, M.-L. Cho, S.-W. Kim, Y.-S. Jang, M.-H. Sohn, J.-H. Moon, Y.-H. Cho, K.-L. Hoe, Y.-S. Seo, Y.W. Park, Soluble CD93 induces differentiation of monocytes and enhances TLR responses, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 185 (2010) 4921–4927. doi:10.4049/jimmunol.0904011.
- [9] K. Drickamer, C-type lectin-like domains, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9 (1999) 585–590.
- [10] M. Van de Wouwer, E.M. Conway, Novel functions of thrombomodulin in inflammation, *Crit. Care Med.* 32 (2004) S254–261.
- [11] W.J. Rettig, P. Garin-Chesa, J.H. Healey, S.L. Su, E.A. Jaffe, L.J. Old, Identification of endosialin, a cell surface glycoprotein of vascular endothelial cells in human cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 10832–10836.
- [12] S.-S. Rho, H.-J. Choi, J.-K. Min, H.-W. Lee, H. Park, H. Park, Y.-M. Kim, Y.-G. Kwon, Clec14a is specifically expressed in endothelial cells and mediates cell to cell adhesion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404 (2011) 103–108. doi:10.1016/j.bbrc.2010.11.075.
- [13] E.M. Conway, M. Van de Wouwer, S. Pollefeyt, K. Jurk, H. Van Aken, A. De Vriese, J.I. Weitz, H. Weiler, P.W. Hellings, P. Schaeffer, J.-M. Herbert, D. Collen, G. Theilmeier, The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways, *J. Exp. Med.* 196 (2002) 565–577.
- [14] K. Abeyama, D.M. Stern, Y. Ito, K. Kawahara, Y. Yoshimoto, M. Tanaka, T. Uchimura, N. Ida, Y. Yamazaki, S. Yamada, Y. Yamamoto, H. Yamamoto, S. Iino, N. Taniguchi, I. Maruyama, The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 1267–1274. doi:10.1172/JCI22782.
- [15] H. Yang, D.J. Antoine, U. Andersson, K.J. Tracey, The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis, *J. Leukoc. Biol.* 93 (2013) 865–873. doi:10.1189/jlb.1212662.

- [16] M.C. Greenlee, S.A. Sullivan, S.S. Bohlsion, Detection and characterization of soluble CD93 released during inflammation, *Inflamm. Res.* 58 (2009) 909. doi:10.1007/s00011-009-0064-0.
- [17] A. Mälarstig, A. Silveira, D. Wågsäter, J. Öhrvik, A. Bäcklund, A. Samnegård, M. Khademi, M.-L. Hellenius, K. Leander, T. Olsson, M. Uhlén, U. de Faire, P. Eriksson, A. Hamsten, Plasma CD93 concentration is a potential novel biomarker for coronary artery disease, *J. Intern. Med.* 270 (2011) 229–236. doi:10.1111/j.1365-2796.2011.02364.x.
- [18] B. Nativel, A. Figuester, J. Andries, C. Planesse, J. Couprie, P. Gasque, W. Viranaicken, T. Iwema, Soluble expression of disulfide-bonded C-type lectin like domain of human CD93 in the cytoplasm of *Escherichia coli*, *J. Immunol. Methods.* (2016). doi:10.1016/j.jim.2016.10.003.
- [19] B. Nativel, M. Marimoutou, V.G. Thon-Hon, M.K. Gunasekaran, J. Andries, G. Stanislas, C. Planesse, C.R. Da Silva, M. Césari, T. Iwema, P. Gasque, W. Viranaicken, Soluble HMGB1 is a novel adipokine stimulating IL-6 secretion through RAGE receptor in SW872 preadipocyte cell line: contribution to chronic inflammation in fat tissue, *PloS One.* 8 (2013) e76039. doi:10.1371/journal.pone.0076039.
- [20] E.P. McGreal, N. Ikewaki, H. Akatsu, B.P. Morgan, P. Gasque, Human C1qRp is identical with CD93 and the mNI-11 antigen but does not bind C1q, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 168 (2002) 5222–5232.
- [21] Huan Yang, H. Wang, S.S. Chavan, U. Andersson, High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1): The Prototypical Endogenous Danger Molecule, *Mol. Med.* 21 (2015) S6–S12. doi:10.2119/molmed.2015.00087.
- [22] H.J. Huttunen, C. Fages, J. Kuja-Panula, A.J. Ridley, H. Rauvala, Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis, *Cancer Res.* 62 (2002) 4805–4811.
- [23] J.P. Rowell, K.L. Simpson, K. Stott, M. Watson, J.O. Thomas, HMGB1-facilitated p53 DNA binding occurs via HMG-Box/p53 transactivation domain interaction, regulated by the acidic tail, *Struct. Lond. Engl.* 1993. 20 (2012) 2014–2024. doi:10.1016/j.str.2012.09.004.
- [24] D. Harhausen, V. Prinz, G. Ziegler, K. Gertz, M. Endres, H. Lehrach, P. Gasque, M. Botto, P.F. Stahel, U. Dirnagl, W. Nietfeld, G. Trendelenburg, CD93/AA4.1: A Novel Regulator of Inflammation in Murine Focal Cerebral Ischemia, *J. Immunol.* 184 (2010) 6407–6417. doi:10.4049/jimmunol.0902342.

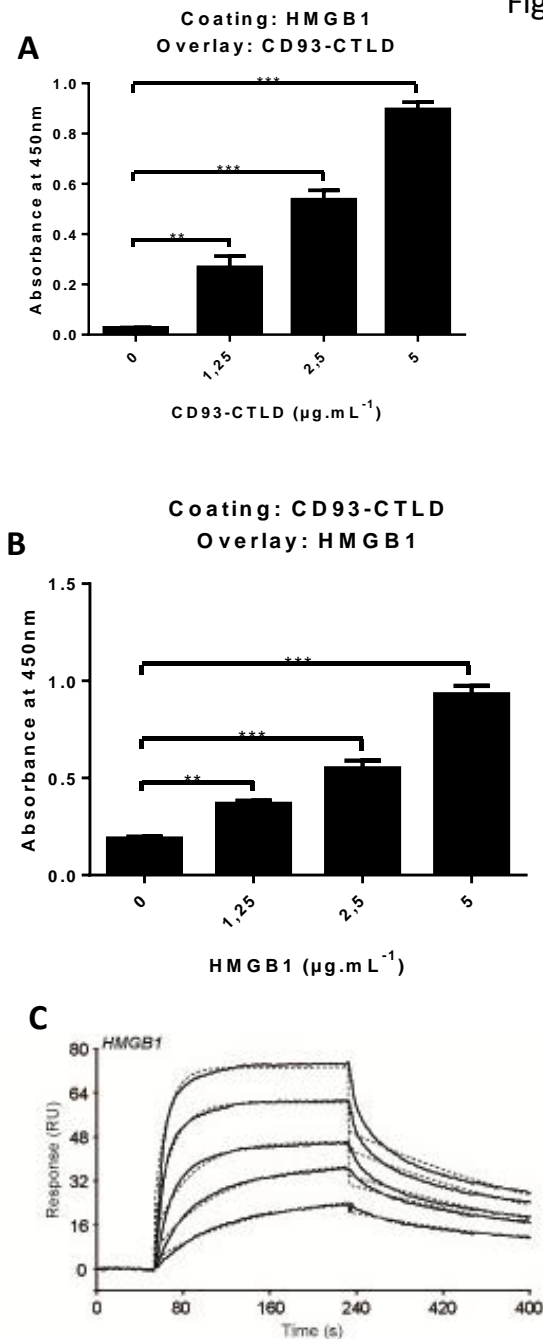


Figure 1: interaction between HMGB1 and CD93-CTL D. (A) Microplate was coated with HMGB1 at $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. After washing and saturation, plates were overlaid with His-CD93-CTL D between 0 to $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Mouse anti-CD93 and goat anti-Mouse HRP were used for the revelation by chromogenic substrate. (B) Microplate was coated with His-CD93-CTL D at $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. After washing and saturation, plates were overlaid with HMGB1 between 0 to $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Anti-HMGB1 (W18) antibody and secondary HRP antibody were used for the revelation by chromogenic substrate. Results are presented as the mean \pm SEM from 3 independent experiments. Differences were determined by One-way ANOVA Turkey's test: * difference ($P < 0.05$), ** difference ($P < 0.01$), *** difference ($P < 0.001$), **** difference ($P < 0.0001$) compared to control. (C) SPR kinetic analysis of the interaction between CD93-CTL D and immobilized HMGB1. Ninety μl of CD93 ($1, 2, 4, 8$ and $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$) were injected over 1190 RU of immobilized HMGB1. The specific binding signals shown were obtained by subtracting the background signal over a reference surface with no protein immobilized and further subtracting buffer blanks from the data sets. Fits are shown as dotted lines and were obtained by global fitting of the data using a 1:1 Langmuir binding model. The results shown are representative of 2 experiments. See Numerical data in Table I.

Fig. 2 Nativel et al.

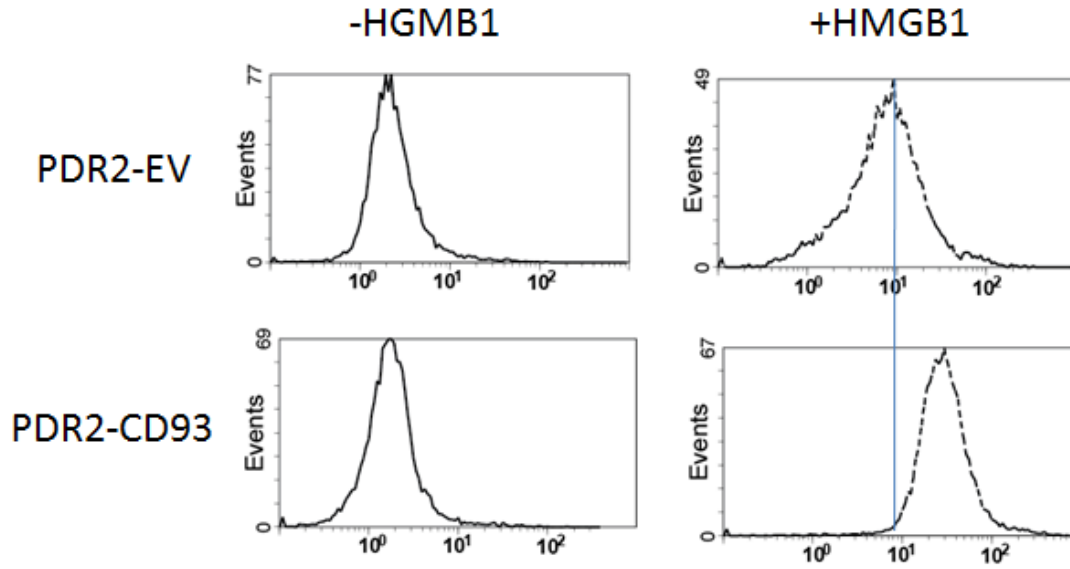


Figure 2: Flow cytometry interaction between HMGB1 and CD93. IMR32 cells were pelleted then were incubated with (+HMGB1) or without HMGB1 (-HMGB1) at 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Primary antibody was anti-HMGB1, and secondary antibody was anti-mouse conjugated to R-Phycoerythrin. Cells were analyzed in cytometer.

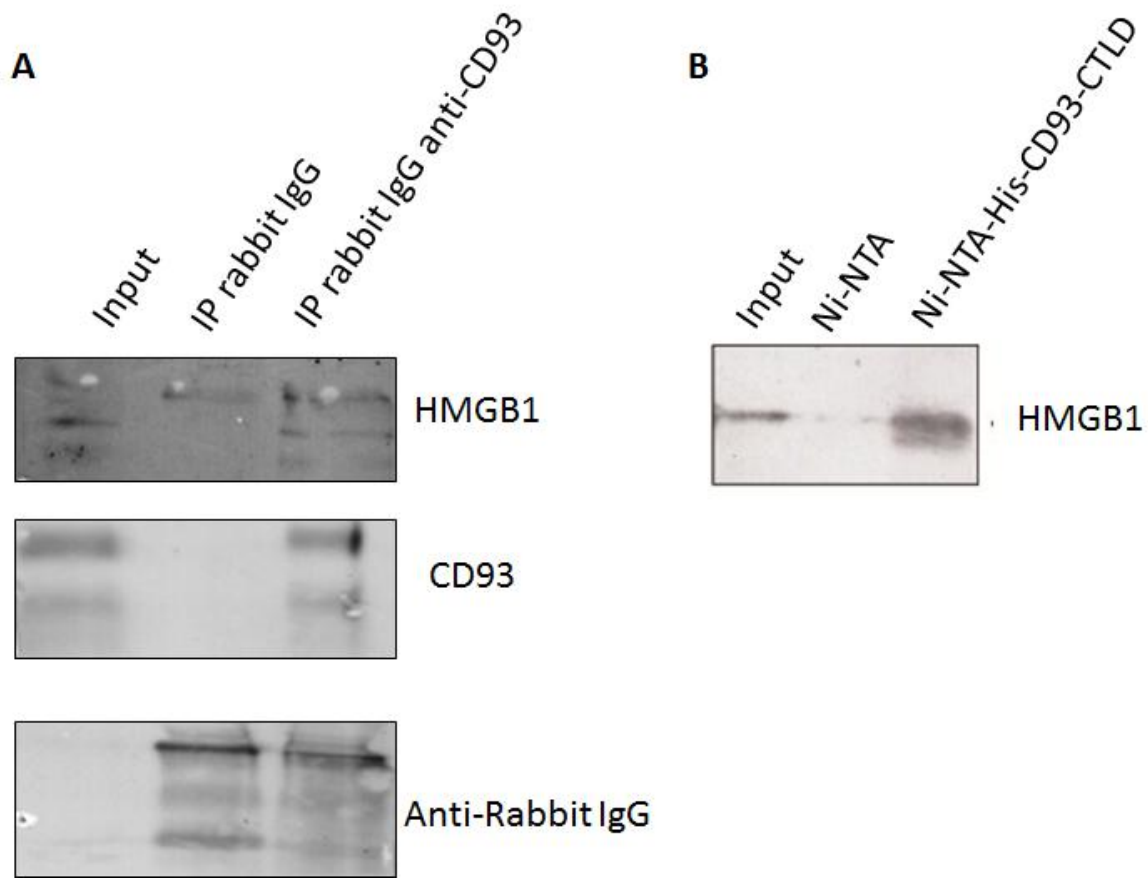


Figure 3: Endogenous HMGB1 interacts with CD93-CTLD. (A) Immunoprecipitation assay on control or anti-CD93 beads using IMR32-PDR2-CD93 cell lysates. Protein eluted purification was confirmed by SDS-PAGE followed by western blot using P1C5 antibody against CD93 or anti-HMGB1 antibody (clone W18). (B) Pull-down assay of HMGB1 on control (Ni-NTA) or CD93-CTLD beads (Ni-NTA His-CD93-CTLD) using Jurkat cell lysates. Protein eluted purification was confirmed by SDS-PAGE followed by western blot anti-HMGB1 antibody (clone W18).

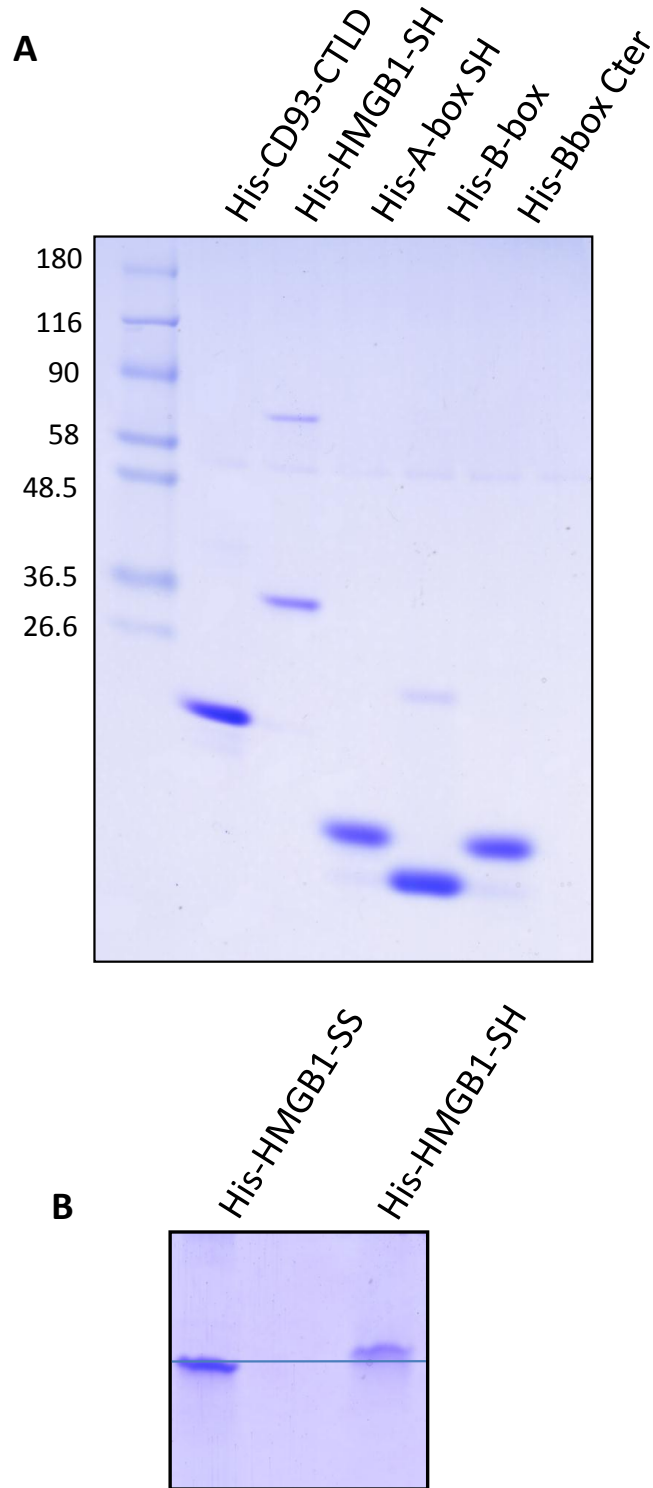


Figure 4: Production of His-CD93-CTLD, different types of HMGB1 and HMGB1's domains. (A) Gel SDS-PAGE of His-CD93-CTLD, His-HMGB1-SH, His-A-box SH domain, His-B-box domain, or His-B-box and acidic tail domain (B-box Cter) with DTT. Gel was colored with Coomassie Blue. (B) Gel SDS-PAGE of His-HMGB1-SS (without DTT) and His-HMGB1-SH (with DTT). Gel was colored with Coomassie Blue.

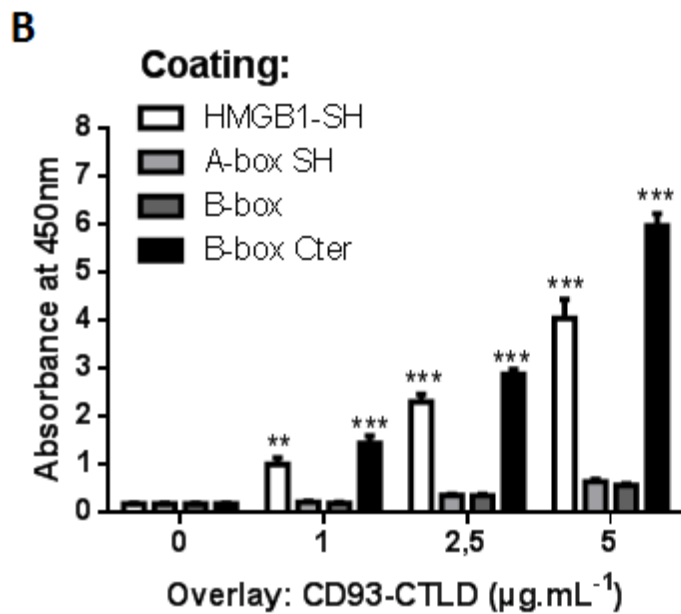
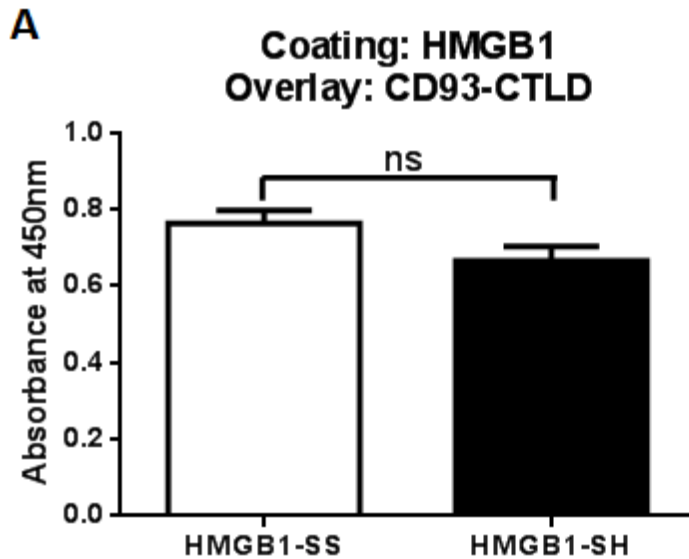


Figure 5: ELISA interaction between different types of HMGB1 and HMGB1's domains and CD93-CTLD. (A) Microplate was coated with HMGB1-SS or HMGB1-SH at 2 µg.mL⁻¹. After washing and saturation, plates were overlaid with His-CD93-CTLD at 5 µg.mL⁻¹. Mouse anti-CD93 and goat anti-Mouse HRP were used for the revelation by chromogenic substrate. (B) Microplate was coated with HMGB1-SH, A-box SH, B-box or B-box with the acidic tail at 2 µg.mL⁻¹. After washing and saturation, plates were overlaid with His-CD93-CTLD at 5 µg.mL⁻¹. Mouse anti-CD93 and goat anti-Mouse HRP were used for the revelation by chromogenic substrate. Results are presented as the mean ± SEM from 3 independent experiments. Differences were determined by One-way ANOVA Turkey's test: * difference (P < 0.05), ** difference (P < 0.01), and *** difference (P < 0.001) compared to control.

V. Discussion

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont consisté à explorer les mécanismes de deux DAMP HMGB1 et HSP60 et du PAMP LPS. Ces molécules sont impliquées dans de nombreuses maladies inflammatoires. La connaissance du mode d'action de ces molécules aussi bien au niveau cellulaire que moléculaire, est essentielle pour la mise en place de traitement de ces maladies.

Les différents points de discussion abordés dans ce chapitre visent à proposer une analyse globale et intégrée de l'ensemble des données issues de ce travail de thèse. À ce titre, nous aborderons plus particulièrement les principaux résultats relatifs aux modes d'action des DAMP dans les mécanismes de l'inflammation, particulièrement HMGB1. Puis nous nous intéresserons aux interactions entre les DAMP et les PAMP, dans leur capacité de modulation de l'inflammation, dans lequel le LPS sera discuté. Enfin nous discuterons des récepteurs impliqués dans la reconnaissance des PAMP et DAMP, avec la mise en évidence d'un potentiel nouveau récepteur CD93.

Le mode d'action des DAMP dans les mécanismes inflammatoires, en particulier HMGB1.

Il a été démontré dans plusieurs études que dans les maladies inflammatoires, on observe une présence accrue de DAMP dans le sang des patients. L'origine de ces DAMP reste souvent inconnue, mais on connaît leurs fonctions au niveau du système immunitaire dans les cas de réponse à l'inflammation. Le maintien et l'augmentation de ces DAMP dans l'organisme sont problématiques. Il est ainsi nécessaire de connaître les mécanismes qui se mettent en place dans l'installation de ces maladies inflammatoires, les causes et conséquences de la présence de ces DAMP, aussi bien au niveau cellulaire qu'au niveau moléculaire.

Toutes les cellules sont capables de libérer des DAMP, principalement lorsqu'elles subissent une nécrose. Dans les cas de maladie inflammatoire impliquant la nécrose des tissus, la source de DAMP est relativement facile à identifier. En revanche dans d'autres cas cette source de DAMP est plus difficile à identifier. Dans notre étude, nous avons mis en évidence un nouveau tissu pouvant être responsable d'une forte source de DAMP, le tissu adipeux. Nous savons qu'il existe un lien étroit entre les marqueurs de l'inflammation et l'obésité, plus précisément au niveau du tissu adipeux.

Le tissu adipeux est composé de nombreux types cellulaires comme des cellules immunitaires, des adipocytes et des pré-adipocytes. Les principales cellules productrices de cytokines inflammatoires et de DAMP sont les cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes, cellules dendritiques entre autres) [541]. On peut se demander si l'inflammation du tissu adipeux est à l'origine de l'infiltration des macrophages et des autres cellules immunitaires ou si l'infiltration de ces cellules est à l'origine de l'inflammation du tissu adipeux. L'implication des cellules autres que les cellules immunitaires dans l'inflammation du tissu adipeux n'est pas réellement décrite. Nous avons montré que les pré-adipocytes peuvent également être une source de facteurs inflammatoires comme des cytokines, des chimiokines et des DAMP.

En plus de cela, le HMGB1 libéré par les pré-adipocytes serait au centre d'un phénomène inflammatoire global impliquant toutes les cellules du tissu adipeux. Une des hypothèses est la libération active de HMGB1 par les pré-adipocytes, associée à l'oxydation de ses cystéines et ainsi régulerait la fonction biologique et inflammatoire de HMGB1 (Figure 13). En effet, lorsque HMGB1

est libéré par les cellules, l'ensemble de ses 3 cystéines est sous forme réduite sans pont disulfure (HMGB1-SH). Dans ces conditions HMGB1 a une fonction chimiokine et il va attirer les cellules immunitaires au sein du tissu adipeux. De plus HMGB1 induit la production de chimiokine (MCP-1) qui va là encore permettre d'attirer les cellules immunitaires au sein du tissu adipeux. Dans un second temps apparaît du HMGB1-SS avec son activité pro-inflammatoire, issue de l'oxydation de HMGB1 dans le milieu oxydant extracellulaire [157]. Ce mécanisme d'oxydation a également été mis en avant pour d'autres DAMP [542], comme la famille S100. Il est de plus en plus évident que les modifications oxydatives des résidus de cystéine dans les S100 peuvent être essentielles dans la régulation de leur activité. L'oxydation modérée de la cystéine est réversible dans les systèmes biologiques, alors que les oxydants puissants peuvent modifier de façon irréversible cet acide aminé [543], comme pour HMGB1. Ainsi, en plus du type et de la quantité de DAMP, l'état redox pourrait influencer les fonctions des DAMP au sein du système immunitaire [542].

Différentes hypothèses portent sur la source initiale de HMGB1. Dans le cadre de l'obésité, le tissu adipeux serait une source importante de HMGB1. Au cours du développement de l'obésité et avant l'installation de l'inflammation, on observe un fort taux de lipides et d'acides gras libres, au niveau du tissu adipeux qui induirait la production de facteurs inflammatoires et de DAMP par les pré-adipocytes [544,545]. Le développement du tissu adipeux s'accompagne d'une augmentation de la nécrose de ce même tissu adipeux, ce phénomène pourrait constituer la source initiale de HMGB1 [546]. HMGB1 serait également au centre d'une boucle d'activation rétroactive, dans lequel la production active de HMGB1 par les pré-adipocytes agirait de manière autocrine, et induirait la production de cytokines inflammatoires mais également de HMGB1. HMGB1 agirait également de manière paracrine en activant les cellules voisines et les cellules immunitaires résidentes. On sait que HMGB1 est exprimé de façon active par les macrophages. HMGB1 pourrait être ainsi celui qui initie et maintient l'inflammation au sein du tissu adipeux. Cela reconforte l'idée que l'inflammation au sein du tissu adipeux serait la cause de l'entrée de cellules immunitaires. Ce mécanisme d'action peut être étendu à l'ensemble des tissus touchés dans les cas de maladies inflammatoires chroniques. D'ailleurs, comme HMGB1 peut se retrouver dans le sang, cette inflammation peut ensuite toucher l'ensemble des tissus du corps.

Ces cytokines inflammatoires induites suite à la stimulation par HMGB1 seraient responsables également de l'installation du diabète. Le taux de HMGB1 dans le sang est corrélé avec l'obésité [467] et la présence de cytokines inflammatoires dans le sang [465]. De plus, il est plus présent chez les personnes non-obèses et atteintes de diabète que chez les personnes saines [465]. Ce taux de HMGB1 dans le sang est encore plus élevé dans le cas où les patients sont obèses et diabétiques. Cela montre bien que HMGB1 est lié aux pathologies associées à l'obésité comme le diabète et plus généralement associées aux maladies inflammatoires.

Ce mécanisme d'action moléculaire et cellulaire observé pour HMGB1 peut être étendu à une grande partie des DAMP. Les DAMP seraient ainsi les molécules responsables du maintien de l'inflammation dans les maladies inflammatoires chroniques. Dans une balance entre molécules et cellules pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, les DAMP feraient pencher la balance en faveur des pro-inflammatoires.

Les DAMP sont souvent associés à l'augmentation de l'inflammation. Néanmoins, l'action des DAMP sur l'inflammation est souvent beaucoup plus complexe. Certains DAMP dans des conditions

particulières ne possèdent pas d'activité pro-inflammatoire, comme par exemple HMGB1 ou S100 oxydés qui n'ont plus d'activité pro-inflammatoire. De même dans la capacité de réparation tissulaire liée au DAMP, cette fonction est beaucoup plus complexe. Comme par exemple pour HMGB1, où une forte production est délétère alors qu'une production plus modérée entraîne une meilleure réparation du tissu.

L'interaction entre PAMP et DAMP dans leur capacité à moduler l'inflammation.

Comprendre le mécanisme de régulation de ces DAMP via leurs interactions avec des PAMP est essentiel pour l'étude de leurs fonctions. Les phénomènes d'interaction entre PAMP et DAMP sont essentiels dans la réponse immunitaire. Elle permet une réponse plus importante dès les premiers stades d'une éventuelle infection, avant même une multiplication du pathogène. Il est très souvent décrit une action synergique du complexe DAMP/PAMP, qui induirait une réponse inflammatoire plus importante que la simple addition des effets du PAMP et du DAMP. Par exemple, notre étude ainsi que d'autres études ont montré que HSP60 peut se lier étroitement au LPS et améliorer son activité biologique. Ni les préparations de HSP60 hautement purifiées ou produites dans notre expérience dans des bactéries exemptes de LPS inflammatoire, ni le LPS seul à des concentrations correspondant à celles trouvées dans des préparations HSP60 contaminées ne pourraient induire une production de cytokines pro-inflammatoires identique aux préparations de HSP60 contaminées [349,360].

D'un point de vue pratique, la production de ces DAMP recombinants se fait généralement dans les bactéries *E. coli*. Le fait que la plupart de ces DAMP produits en bactéries active les récepteurs TLR2 et TLR4, initialement décrits comme des capteurs de molécules microbiennes telles que le LPS et les lipoprotéines, permet de se poser des questions. L'objectif est alors de savoir si les contaminations microbiennes sont responsables en partie ou en totalité de l'activité inflammatoire et biologique des DAMP. Cela souligne combien il est crucial de travailler avec des préparations de DAMP qui sont totalement exemptes de contaminants microbiens afin de comprendre le rôle exclusif de ces DAMP dans les nombreux processus cellulaires dans lesquels ils sont impliqués.

Nous avons montré clairement les biais qui peuvent exister dans les méthodes de production de DAMP, surtout leur capacité à interagir avec des PAMP. Nous avons vu que les bactéries utilisées étaient une source importante de PAMP, et que les DAMP produits pouvaient interagir avec une affinité plus ou moins forte avec les PAMP, cette interaction est ainsi fortement favorisée dans ce contexte de production de protéines. Notre étude et de nombreuses autres études ont montré que l'activité inflammatoire attribuée à certains DAMP était en fait due à des contaminations par des protéines, comme les HSP [349]. D'ailleurs, d'autres DAMP sont aujourd'hui en cours d'investigation sur ces problèmes de contamination. HMGB1 est par exemple aujourd'hui de plus en plus critiqué pour sa capacité inflammatoire intrinsèque [547].

Différents tests mettent en avant l'absence de contamination par du LPS comme la polymyxine B. Ce test est basé sur une forte affinité entre le LPS et la polymyxine B qui permettrait de séparer LPS de la protéine recombinante. Il n'est toutefois pas impossible d'imaginer que l'affinité entre le LPS et la protéine soit plus forte s'opposant ainsi au déplacement du LPS vers la polymyxine B. Une autre technique est le dosage de LPS via le test LAL assay, là encore la présence de protéines possédant une affinité pour le LPS induit une sous-estimation du taux réel de contaminant par du LPS. Néanmoins, comme souvent les DAMP agissent de façon synergique avec les contaminants cela

entraîne une réponse inflammatoire même avec de faibles taux de LPS contaminants. De plus certaines protéines peuvent entrer en interaction avec du LPS avec plus ou moins de grande affinité, et les contaminations par du LPS seront ainsi très problématiques. Il est ainsi intéressant de prendre en compte cette nouvelle technique de production de protéines recombinantes en bactérie ClearColi. Chez ces bactéries, le LPS produit est pourvu du lipide A non-inflammatoire, il perd ainsi son activité inflammatoire. De ce fait, l'étude de toutes les protéines recombinantes produites dans ce système éviterait le biais des contaminations par du LPS.

L'utilisation de ClearColi peut cependant être critiquée sur le fait que seul le LPS est éliminé, mais pas l'ensemble des autres contaminants possibles, comme l'ADN bactérien, les lipoprotéines, ou encore les peptidoglycanes. Ainsi pour les protéines ayant une affinité pour ce type de contaminant, le problème reste le même, comme par exemple pour la production de HMGB1.

De plus le problème général dans la production de protéines en bactéries, est l'absence de modification post traductionnelle, rendant souvent des protéines inactives. La principale modification importante pour les protéines est la présence de pont disulfure. Nous avons mis en place un nouveau système de production de protéines en bactérie utilisant des enzymes favorisant la formation de pont disulfure chez les bactéries.

De même lors d'études sur l'action de certains PAMP, par exemple dans l'étude du LPS il est nécessaire d'avoir des préparations pures de LPS, car des contaminations de LPS par d'autres constituants bactériens peuvent poser problème. Nous avons montré dans notre étude que le LPS de *P.gingivalis* présente des propriétés inflammatoires différentes selon le profil de purification du LPS, et donc que la présence de contaminations influence grandement son activité pro-inflammatoire.

Par ailleurs, il existe des bactéries Gram- qui possèdent plusieurs types de LPS à leur surface, et lors de leurs purifications, ce n'est pas un LPS qui est étudié mais l'ensemble des effets de ces LPS. Là encore en fonction de la structure des LPS, ils auront plus ou moins d'affinité pour les récepteurs, et donc plus ou moins d'effet inflammatoire. Comme le montre notre expérience de purification de LPS issue de bactérie *E.coli* standard ou *E.coli* ClearColi sur laquelle le LPS a été modifié. Cette modification du LPS entraîne une perte totale d'activité pro-inflammatoire du LPS. De même pour les différentes souches de bactéries, celles-ci auront des LPS différents et donc des propriétés inflammatoires différentes. Nous avons mis en évidence que les LPS issues de souches de bactéries différentes telles qu' *E.coli* et *P.gingivalis*, ont des propriétés inflammatoires différentes.

Ainsi lors d'études d'interaction entre DAMP et LPS, beaucoup de paramètres peuvent influencer cette interaction (structure du LPS, contamination, multiple LPS) et ainsi induire un effet amplifié ou diminué de la propriété inflammatoire.

Nous avons clairement montré que certains DAMP n'ont pas d'activité inflammatoire mais peuvent acquérir ses propriétés inflammatoires en présence de PAMP, comme dans le cas de HSP60. Au vu de ce résultat il convient de revoir les activités inflammatoires des autres DAMP connus pour leurs activités intrinsèques de molécule pro-inflammatoire, et ainsi de vérifier leurs activités inflammatoires avec et sans PAMP. De plus, certaines protéines peuvent ainsi être classées comme DAMP lorsqu'elles possèdent des propriétés éliciteurs de l'inflammation lorsqu'elles sont en présence de PAMP.

Les récepteurs impliqués dans la reconnaissance des PAMP et DAMP.

La reconnaissance des PAMP et DAMP par les cellules du système immunitaire est très importante pour permettre la défense de l'organisme. Beaucoup de PRR sont aujourd'hui décrits, ils sont très étudiés et classés en plusieurs catégories. Ils peuvent être définis en fonction de leur localisation cellulaire ou de leur famille protéiques. On ne comprend pas bien pourquoi, malgré l'hétérogénéité structurelle des DAMP et des PAMP, ils partagent la capacité de lier et d'activer les mêmes PRR, souvent TLR2, TLR4 et RAGE, pour déclencher une réponse immunitaire [12]. Un même récepteur peut ainsi interagir avec une multitude de ligands.

La réciproque est également valide, il est décrit qu'un même DAMP peut interagir avec différents types de PRR. C'est le cas de HMGB1 capable d'interagir avec une grande variété de récepteurs. Les principaux récepteurs connus pour HMGB1 sont TLR4, TLR2 et RAGE. De plus du fait de sa capacité à interagir avec certains PAMP, il peut se lier à d'autres récepteurs comme à TLR9 lorsqu'il est associé à de l'ADN. Le revers de cette capacité d'interaction avec de nombreux PAMP est la présence de contaminant dans les préparations pouvant induire l'activation d'un récepteur à cause justement de ce contaminant et non pas de HMGB1 lui-même. La protéine HMGB1 que nous avons produite dans des *E. coli* interagit avec récepteur RAGE mais pas avec les récepteurs TLR2 et TLR4. Ceci conforte l'idée que notre protéine ne comporte pas de contaminant bactérien. De plus cela appuie l'idée que le récepteur préférentiel de HMGB1 est bien RAGE et non pas les TLR, qui seraient eux activés que lorsque HMGB1 est complexé avec un PAMP. Ces PAMP seraient donc à l'origine de la capacité de HMGB1 à interagir avec d'autres récepteurs. Ceci est en concordance avec la critique concernant la capacité inflammatoire de HMGB1 [547]. Cette hypothèse peut s'appliquer également à d'autres DAMP.

Sur l'ensemble des PRR, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à une protéine de la famille des CLR, CD93. Nous avons étudié plus précisément sa fonction de récepteur. Nous avons montré que le CTLD était un domaine important impliqué dans l'activité réceptrice de CD93. Grâce à son CTLD, CD93 est capable d'interagir avec des PAMP comme le LPS, l'ADN bactérien et les CpG ODN. CD93 existe sous forme membranaire et sous forme soluble. Nous avons montré que la forme soluble de CTLD était capable d'interagir avec le LPS et de jouer un rôle antagoniste du LPS. Nous avons également déterminé que la forme soluble et membranaire de CD93 est capable d'interagir avec l'ADN bactérien et les CpG ODN. La forme membranaire agit comme récepteur de l'ADN bactérien ou de CpG ODN et induit la production de cytokines inflammatoires. CD93 est également capable d'interagir avec les DAMP comme HMGB1 et HSP60. Il serait ainsi possible que CD93 reconnaisse ces PAMP et DAMP sous forme de complexes, par exemple les complexes HMGB1/LPS ou HSP60/LPS. Nous avons décrit principalement ces interactions dans un modèle moléculaire et non physiologique. Il convient de définir plus précisément l'aspect physiologique et biologique de ces interactions surtout au niveau de la réponse immunitaire inflammatoire.

La régulation du système immunitaire est très importante car une sur-activation de la réponse immunitaire inflammatoire ou un maintien de cette réponse au fil du temps peut entraîner des maladies inflammatoires chroniques. Un des mécanismes possibles pour limiter cela est de générer des formes solubles du même PRR impliqué dans l'activation de la cellule, à travers la sécrétion ou le clivage de ce récepteur. Cette activité a été décrite pour de nombreux PRR dont les plus connus sont les TLR et RAGE [20,548]. Nous pouvons émettre l'hypothèse que CD93 utilise le même mécanisme.

Lorsque CD93 reste au niveau de la membrane, il peut agir en tant que récepteur pour les PAMP et DAMP et induire une voie d'activation pro-inflammatoire. Lorsque le CD93 est soluble, il est un antagoniste de la forme membranaire, et il agit donc comme anti-inflammatoire. Cette activité anti-inflammatoire avait également été décrite pour un membre de sa famille, la TM qui est régulée là aussi par le CTLD de TM [424]. Ce mécanisme est également démontré pour le récepteur RAGE, qui peut être libéré (sRAGE) et jouer l'activité antagoniste de son récepteur RAGE membranaire [20]. Donc, nous proposons ici un nouveau rôle de CD93 comme récepteur pour les DAMP et PAMP. CD93 serait capable de moduler la réponse inflammatoire, en stimulant la production de cytokine lorsqu'il est membranaire, ou agissant comme antagoniste lorsqu'il est soluble.

On peut néanmoins critiquer cette hypothèse sur le fait que nous n'utilisons que le domaine CTLD de CD93 et non pas l'ensemble de la protéine. Cette activité antagoniste peut-être ainsi due uniquement au domaine CTLD alors que la protéine sCD93 entière pourrait avoir des effets pro- ou anti-inflammatoires. C'est ce que nous observons avec HMGB1 qui lorsqu'elle est intègre possède un effet pro-inflammatoire alors que le domaine Box-A seul possède un effet antagoniste [230].

Pour résumer, notre étude suggère que le CTLD de CD93 se comporte comme une molécule piège dans sa capacité à séquestrer les DAMP et les PAMP, d'une manière qui rappelle particulièrement sTM et sRAGE (Figure 29).

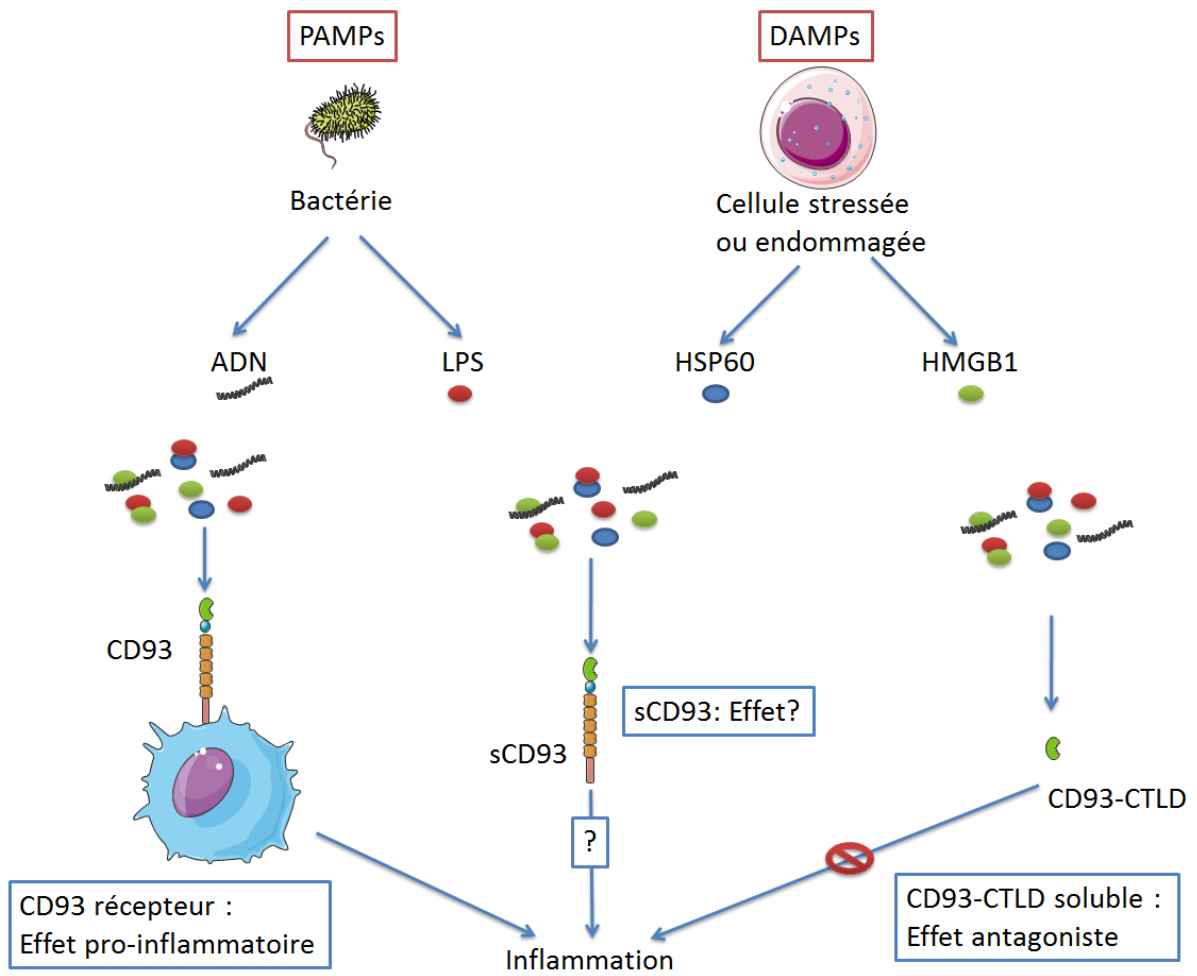


Figure 27. Schéma bilan de l'action de CD93 sur l'inflammation

VI. Conclusion et perspective

L'activation du système immunitaire conduit à la mise en place d'un mécanisme inflammatoire. L'inflammation peut être déclenchée par une grande variété de signaux. Elle peut être induite par des « signaux de dommage » ou DAMP provenant des cellules du soi comme dans les cellules endommagées. Cette inflammation est dite "stérile". L'inflammation peut également être induite par le non soi c'est-à-dire par des « signaux pathogéniques » ou PAMP qui sont des motifs conservés, exprimés par les micro-organismes pathogènes.

Les PAMP correspondent à l'ensemble des motifs moléculaires présents chez les micro-organismes pathogènes. Chaque constituant d'un pathogène, ADN, glycoprotéines ou encore lipoprotéines, peut être considéré comme PAMP. Il existe ainsi une très grande variété de PAMP possédant différents motifs qui induisent différents types de réponses. Ainsi, en fonction du type de pathogène reconnu, on observe une activation différentielle des cellules infectées et la mise en place d'une réponse inflammatoire en adéquation avec le type de pathogène, par exemple une réponse antivirale avec la production d'interféron. Toutefois certains motifs n'induisent pas de réaction immunitaire, c'est par exemple le cas du LPS issu des bactéries de *ClearColi*. Il existe également des différences de reconnaissance de ces PAMP en fonction de l'espèce étudiée. En fonction de l'espèce de bactéries on aura ou non une réponse inflammatoire. C'est ainsi que le LPS de *P. gingivalis* n'induit aucune réponse inflammatoire.

Cette action différentielle des PAMP selon leur origine, structure et espèce, jouerait un rôle très important dans l'étude des maladies inflammatoires chroniques causées initialement par une infection et un maintien du pathogène ou du PAMP dans l'organisme. Il conviendrait ainsi d'analyser des corrélations entre une maladie inflammatoire et les pathogènes ou PAMP associés chez des patients.

Les DAMP sont des molécules du soi présentes dans nos cellules où ils assurent leurs fonctions propres et restent inaccessibles pour des cellules immunitaires. Lorsqu'ils se retrouvent en dehors de la cellule, ils activent le système immunitaire, c'est le cas par exemple de HMGB1. Selon le mode de libération des DAMP (actif/apoptose ou passif/nécrose) la réponse du système immunitaire peut être différente. En plus de leur fonction d'activation du système immunitaire, ils ont également une fonction de réparation tissulaire. Les DAMP vont ainsi permettre de recruter et d'activer aussi bien les cellules immunitaires, que les cellules de réparation.

Pour permettre toutes ces fonctions des DAMP, il est important de bien réguler leurs activités. Une mauvaise régulation de l'activité de ces DAMP est souvent la cause de maladies inflammatoires chroniques. Cette régulation peut passer par différents mécanismes, comme la mise en place de modification post traductionnelle pour permettre la libération active. En dehors des cellules, la régulation des différentes fonctions des DAMP est également importante. Un mécanisme de régulation décrit est la modulation de l'oxydation des DAMP par exemple sur les résidus cystéines, rendant le DAMP actif ou inactif. Ce phénomène d'oxydation est également retrouvé dans les cas d'apoptose pour réguler la fonction des DAMP dans le cas de mort cellulaire programmée et ainsi éviter l'activation du système immunitaire. Dans le cas de l'apoptose, on observe également une séquestration des DAMP pour éviter leurs libérations. Cette régulation en dehors de la cellule peut

passer également par l'interaction avec d'autres protéines qui vont induire une augmentation ou une diminution de ses propriétés inflammatoires, comme HMGB1.

Cette capacité d'interaction est justement l'une des propriétés des DAMP, qui est capable de se lier à un PAMP et d'induire un effet synergique sur la réponse inflammatoire. Certains DAMP n'ont pas d'effet pro-inflammatoire intrinsèque, ils acquièrent cette fonction lorsqu'ils lient un PAMP, c'est le cas de HSP60. Cet effet synergique est très important pour l'élimination des pathogènes. Une infection entrainera souvent l'attaque des cellules qui, suite à cette attaque, libéreront des DAMP. Ces derniers pourront alors reconnaître les PAMP présents, induisant une réponse immunitaire plus rapide et plus intense, qu'en présence du PAMP seul. L'ensemble de ces processus permet la mise en place d'une réponse immunitaire dès les premiers stades de l'infection. Cette interaction entre DAMP et PAMP est également la cause de maladies inflammatoires chroniques, par la mise en place d'une immunité innée contre le DAMP qui était à l'origine dirigée contre la PAMP.

Les récepteurs jouent également un rôle dans l'action synergique de l'interaction entre PAMP et DAMP. Le complexe DAMP/PAMP peut se lier au récepteur de l'un comme de l'autre. En prenant en considération cela, lorsqu'on veut étudier le mécanisme d'action d'un DAMP ou d'un PAMP il est important de travailler avec des protéines dont la pureté est assurée. En effet, certains DAMP sont connus pour n'avoir aucune activité inflammatoire. Donc si une réponse inflammatoire était observée en présence de ce DAMP, il faudrait se poser la question d'une éventuelle contamination par un PAMP. C'est ce que nous avons observé pour HSP60.

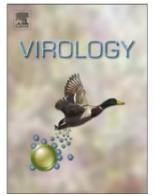
Il serait curieux de revoir l'ensemble des DAMP pour leur propriété inflammatoire intrinsèque et leur capacité d'interaction et de modulation de l'inflammation avec certain PAMP. Ceci laisse ainsi encore un énorme champ d'investigation pour l'étude de ces interactions, sans compter l'implication de leurs récepteurs, et leurs effets sur le système immunitaire qui peuvent être extrêmement variés.

Des récepteurs de l'immunité ont été décrits mais leur rôle précis est encore inconnu. C'est le cas de CD93 qui, comme nous l'avons montré, pourrait être un potentiel récepteur pour les PAMP et DAMP. CD93 est capable d'interagir avec des PAMP tels que le LPS, l'ADN bactérien ou encore les CpG ODN. La forme soluble du domaine CTLD de CD93 a des effets antagonistes sur le LPS, alors que la forme membranaire de CD93 agit comme amplificateur de l'activité pro-inflammatoire de l'ADN bactérien et du CpG ODN. En plus des PAMP, CD93 est capable d'interagir avec les DAMP comme HMGB1 ou HSP60. Les récepteurs TLR2, TLR4 et RAGE peuvent lier différents DAMP ou PAMP, par analogie CD93 pourrait être également un récepteur multi-ligands.

Il serait intéressant d'analyser le profil d'expression de CD93 en fonction des cellules, car il est décrit que les cellules endothéliales possèdent une grande quantité de CD93 à leur surface. Ce CD93 pourrait ainsi servir de senseur pour tous types d'agression aussi bien infectieuses par la reconnaissance des PAMP, que traumatiques par la reconnaissance des DAMP. Il serait intéressant également d'analyser CD93 complexé à d'éventuel DAMP ou PAMP dans les maladies inflammatoires chroniques.

Annexe: Autre article issu de mon travail.

Au cours de ma thèse j'ai également participé à l'élaboration d'un article en association avec l'équipe de PIMIT. Au cours de cette étude j'ai été appelé pour ma maîtrise de la technique de cytométrie en flux. L'article est intitulé : « **The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- β production and apoptosis induction** ».



The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- β production and apoptosis induction

Etienne Frumence^a, Marjolaine Roche^a, Pascale Krejbich-Trotot^a, Chaker El-Kalamouni^a, Brice Nativel^b, Philippe Rondeau^b, Dorothée Missé^c, Gilles Gadea^a,
Wildriss Viranaicken^{a,n}, Philippe Desprès^{a,n}

⁷ Université de la Réunion, UM 134 Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), INSERM U1187, CNRS UMR9192, IRD UMR249, Plateforme Technologique CYROI, 97490 Sainte Clotilde, France

⁸ Université de la Réunion, UMR Diabète Athérombose Thérapies Réunion Océan Indien (DeTROI), INSERM U1188, Plateforme Technologique CYROI, 97490 Sainte Clotilde, France

⁹ Laboratoire MIVEGEC, UMR 224 IRD/CNRS/UM, 34394 Montpellier, France

article info

Article history:

Received 15 January 2016
Returned to author for revisions 29 February 2016

Accepted 8 March 2016

Available online 6 April 2016

Keywords:

Zika virus
Arbovirus
Emerging virus
Viral pathogenicity
Apoptosis
Oxidative stress
Innate immunity
Type-I interferon
Human epithelial cells

abstract

Zika virus (ZIKV) is an emerging flavivirus since the first epidemics in South Pacific in 2007. The recent finding that ZIKV is now circulating in Western Hemisphere and can be associated to severe human diseases, warrants the need for its study. Here we evaluate the susceptibility of human lung epithelial A549 cells to South Pacific epidemic strain of ZIKV isolated in 2013. We showed that ZIKV growth in A549 cells is greatly efficient. ZIKV infection resulted in the secretion of IFN- β followed by the expression of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , and transcriptional activity of IFIT genes. At the maximum of virus progeny production, ZIKV triggers mitochondrial apoptosis through activation of caspases-3 and -9. Whereas at early infection times, the rapid release of IFN- β which exerts an antiviral effect against ZIKV might delay apoptosis in infected cells.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The mosquito-borne Zika virus (ZIKV) is a newly emerging arbovirus that belongs to the flavivirus genus of the Flaviviridae family. Mosquito *Aedes* (Ae.) species with mainly *Ae. aegypti* are the vectors of ZIKV transmission (Li et al., 2012; Wong et al., 2013). Serological evidence points to a widespread distribution of epi-zoonotic ZIKV in the northern half of the African continent, as well as in many countries in South-East Asia (Alera et al., 2015; Berthet et al., 2014; Buathong et al., 2015; Diallo et al., 2014; Grard et al., 2014; Hayes, 2009). For decades, human ZIKV infections have remained sporadic till 2007 when a large outbreak of ZIKA fever was reported on Yap Island (Micronesia) (Duffy et al., 2009). ZIKV

has recently gained a medical importance following the large-scale epidemics in the South Pacific especially in French Polynesia in 2013 (Hancock et al., 2014). The expansion of ZIKV in the South and Central America has been recently documented emphasizing the remarkable capacity of ZIKV to spread to non-endemic regions worldwide (Campos et al., 2015; Enfissi et al., 2016; Zanluca et al., 2015). Classically, human disease known as Zika fever is characterized by fever, maculopapular rash, headache, conjunctivitis, arthralgia and myalgia. Evidence of perinatal transmission of ZIKV has been initially documented during 2013/14 epidemic of ZIKV in French Polynesia (Besnard et al., 2014). High incidence of congenital microcephaly has been recently associated to ZIKV in Brazil (Dyer, 2015). Neurological complications such as Guillain-Barré syndrome were also documented during the major outbreak of ZIKV in French Polynesia (Oehler et al., 2014). No strategies for disease control are available to date. The finding that ZIKV is newly emerging has

⁸ Corresponding authors.

E-mail addresses: wildriss.viranaicken@univ-reunion.fr (W. Viranaicken), philippe.despres@univ-reunion.fr (P. Desprès).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2016.03.0060042-6822> &
2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

highlighted the need for an in-depth characterization of circulating strains responsible for the epidemics of Zika fever.

The purpose of our study was to improve our knowledge on the replication of ZIKV in human cells and the host-cell responses to viral infection. The clinical isolate PF-25013-18 of ZIKV was iso-lated from a patient during the epidemic of Zika fever in French Polynesia in 2013. Recently, Hamel et al. (2015) reported that primary human fibroblasts and immature dendritic cells are per-missive to the PF-25013-18 strain of ZIKV. The enhanced expres-sion of pattern recognition receptors RIG-I, MDA5 and TLR3 as well as Interferon-Stimulated Genes (ISGs) OAS2, ISG15 and MX1, were detected in human fibroblasts infected with ZIKV. Also, expression of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β was induced by ZIKV. Lastly, the efficiency of ZIKV growth was associated with the induction of autophagy in human fibroblasts. Flaviviruses have been shown to infect epithelial cells (Suthar et al., 2012; Umareddy et al., 2007) and the permissiveness of human lung epithelial A549 cells to ZIKV has been recently reported (Hamel et al., 2015). In the

present study, we evaluated the ability of ZIKV strain PF-25013-18 to replicate in A549 cells. The growth of ZIKV strain in A549 cells was highly efficient and stimulated the production of Type-I interferons (IFNs), ISGs, and pro-inflammatory cytokines. Importantly, we showed that ZIKV replication resulted in a rather delayed mitochondrial apoptosis in human epithelial cells.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and antibodies

Recombinant interferon- β (IFN- β) and TNF- α were purchased from Peprtech. The pan-caspase inhibitor, Z-VAD-fmk was pur-chased from Promega. The autophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA), the autophagy inducer rapamycin and the anti- β -tubulin antibody TUB 2.1 were purchased from Sigma-Aldrich. Anti-pan flavivirus E monoclonal antibody 4G2 was purchased from RD

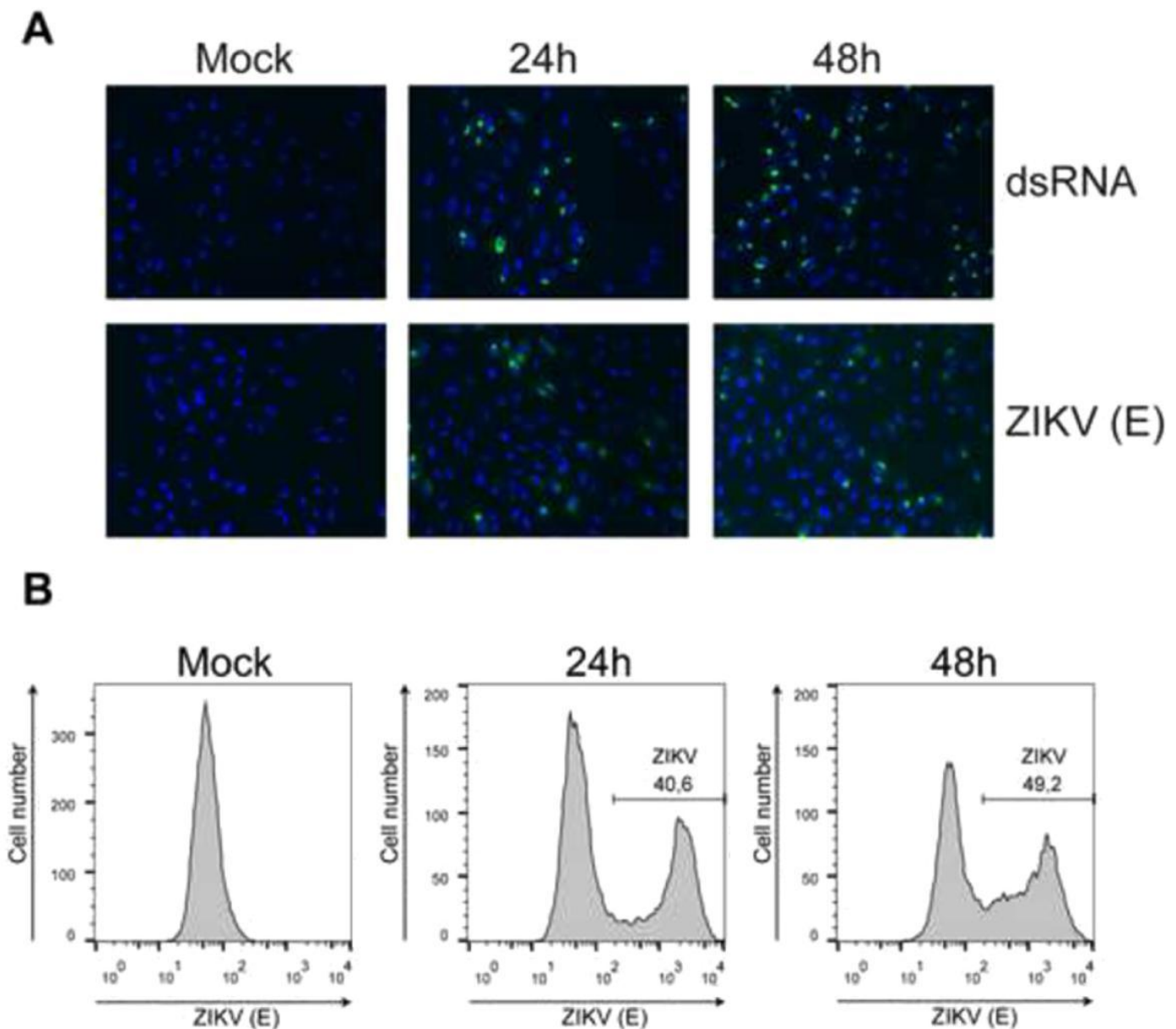


Fig. 1. Replication ZIKV strain PF-25013-18 in A549 cells. A549 cells were infected 24 h and 48 h with ZIKV strain PF-25013-18 at MOI of 5 or mock-infected. In (A), cells were immunostained with anti-dsRNA antibody J2 (dsRNA) or anti-pan flavivirus E protein monoclonal antibody 4G2 [ZIKV (E)]. Nuclei were stained with DAPI. In (B), expression of ZIKV E protein was analyzed by flow cytometry assay using 4G2 antibody. Percentages of positive cells were gated. Data are representative of three individual experiments.

Biotech, anti-dsRNA J2-1104 antibody was purchased from English & Scientific Consulting Kft, anti-cleaved form of Caspase-3 anti-body D3E9, anti-cleaved form of Caspase-9 antibody D2D4 and rabbit anti-LC3B antibody were purchased from Cell Signal Technology. Anti-PARP p85 Fragment antibody was purchased from Promega. Goat anti-mouse Alexa Fluor 488 IgG (H β L) and donkey anti-rabbit Alexa Fluor 594 IgG (H β L) antibody were purchased from Invitrogen. Anti-rabbit immunoglobulin-horseradish peroxidase and anti-mouse immunoglobulin-horseradish peroxidase conjugates antibodies were purchased from Vector Labs.

2.2. Virus and cell lines

The clinical isolate PF-25013-18 of ZIKV has been previously described (Hamel et al., 2015). In this study, ZIKV was amplified in Vero cells (ATCC, CCL-81) and stored at 80 °C. Human lung epithelial A549 (ATCC, CCL-185) and Vero cells were cultured at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C in MEM Eagle medium, supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 2 mmol L⁻¹-L-Glutamine, 1 mmol L⁻¹ sodium pyruvate, 100 U mL⁻¹ penicillin, 0.1 mg mL⁻¹ streptomycin and 0.5 mg mL⁻¹ fungizone (PAN Biotech).

2.3. Plaque-forming assay

For plaque-forming assay, Vero cells were seeded in 24-well culture plates. Tenfold dilutions of virus samples were prepared in duplicate in culture medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 0.2 mL of each dilution was added to the cells. The plates were incubated for 2 h at 37 °C. Unabsorbed virus was removed after which 0.5 ml of culture medium supplemented with 0.8% carboxymethylcellulose (CMC) was added to each well, followed by an incubation at 37 °C for 4 days. The CMC overlay was removed and the cells were stained with 0.5% crystal violet in 20% ethanol. Plaques were counted and expressed as plaque-forming units per mL (PFU mL⁻¹).

2.4. Immunofluorescence assay

A549 cells grown on glass coverslips were fixed and permeabilized by immersion in cold absolute ethanol for 10 min, and conserved at 20 °C. Fixed cells were rehydrated with PBS and blocked with 1% Bovine Serum Albumin in PBS (PBS-BSA) for

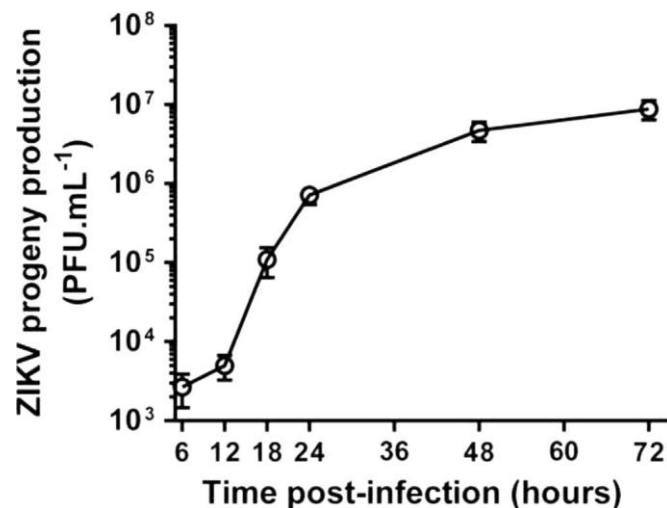


Fig. 2. Efficient ZIKV growth in A549 cells. A549 cells were infected with ZIKV strain PF-25013-18 at MOI of 5. Viral growth was determined by plaque assay on Vero cells. Virus titers are presented as the mean (7SEM) from three independent experiments.

30 min. Coverslips were incubated 1 h with primary antibodies (1:200) in PBS-BSA and then 30 min with the secondary antibodies (1:500). Goat anti-mouse Alexa Fluor 488 IgG and donkey anti-rabbit Alexa Fluor 594 IgG were used as secondary antibodies. Nucleus morphology was revealed by DAPI staining. Coverslips were mounted in Vectashield (Vector Labs), and fluorescence was observed using a Nikon Eclipse E2000-U microscope. Images were obtained using a Hamamatsu ORCA-ER camera and the imaging software NIS-Element AR (Nikon).

2.5. Flow cytometry assay

A549 cells were grown on 100-mm Petri dishes. About 10⁶ cells were harvested and fixed with 3.7% formaldehyde in PBS for 20 min. Fixed cells were permeabilized with cold absolute ethanol for 5 min and then blocked with PBS-BSA for 10 min. Cells were stained with primary mouse antibodies (1:200) for 20 min and then with goat anti-mouse Alexa Fluor 488 IgG (1:500) for 20 min. Cells were subjected to a flow cytometric analysis using FACScan flow cytometer (Becton Dickinson). Results were analyzed with FlowJo software.

2.6. MTT assay

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] 2,5-diphenyltetrazolium bromide) at 5 mg mL⁻¹ was added on A549 cells cultured in a 96-well plate at a density of 5000 cells per well. Following 1 h incubation, MTT medium was removed and the insoluble formazan was solubilized with 100 μ L of DMSO. Absorbance of converted dye was measured at 570 nm with a background subtraction at 690 nm.

2.7. Western blotting

Cell lysates were performed in RIPA lysis buffer. All subsequent step of immunoblotting was performed as described (Nativel et al., 2013; Viranaicken et al., 2011). Primary antibodies were used at 1:500 dilutions. Anti-rabbit immunoglobulin-horseradish peroxidase and anti-mouse immunoglobulin-horseradish peroxidase conjugates were used as secondary antibody (dilution 1:2000). Blots were revealed with ECL detection reagents.

2.8. RT-qPCR

A549 cells were seeded at 3 \times 10⁵ cells in 60-mm Petri dishes. Total RNA was extracted with Trizol Reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. RT-qPCR was performed using M-MLV Reverse Transcriptase and the GoTaq^S qPCR Master Mix (Promega). All steps were conducted according to manufacturer's instructions. The qPCR data sets were analyzed using the Ct method (Livak and Schmittgen, 2001) and the results were normalized to Human Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), which was used as internal control. The primers used in this study are listed in Supplemental table S1.

2.9. Cytokine quantification

A549 cells were plated in 24-well plates at a density of 2.5 \times 10⁴ cells per well. Quantification of secreted IL-6 and IL-1 β was performed using the ELISA kits Ready-SET-Go! (e-Bioscience) according to the manufacturer's protocols.

2.10. IFN reporter cells

The HEK-Blue™ IFN- α / β cell line (InvivoGen) was used for the detection of bioactive IFN- β . Cells seeded in 96-well plates at a density

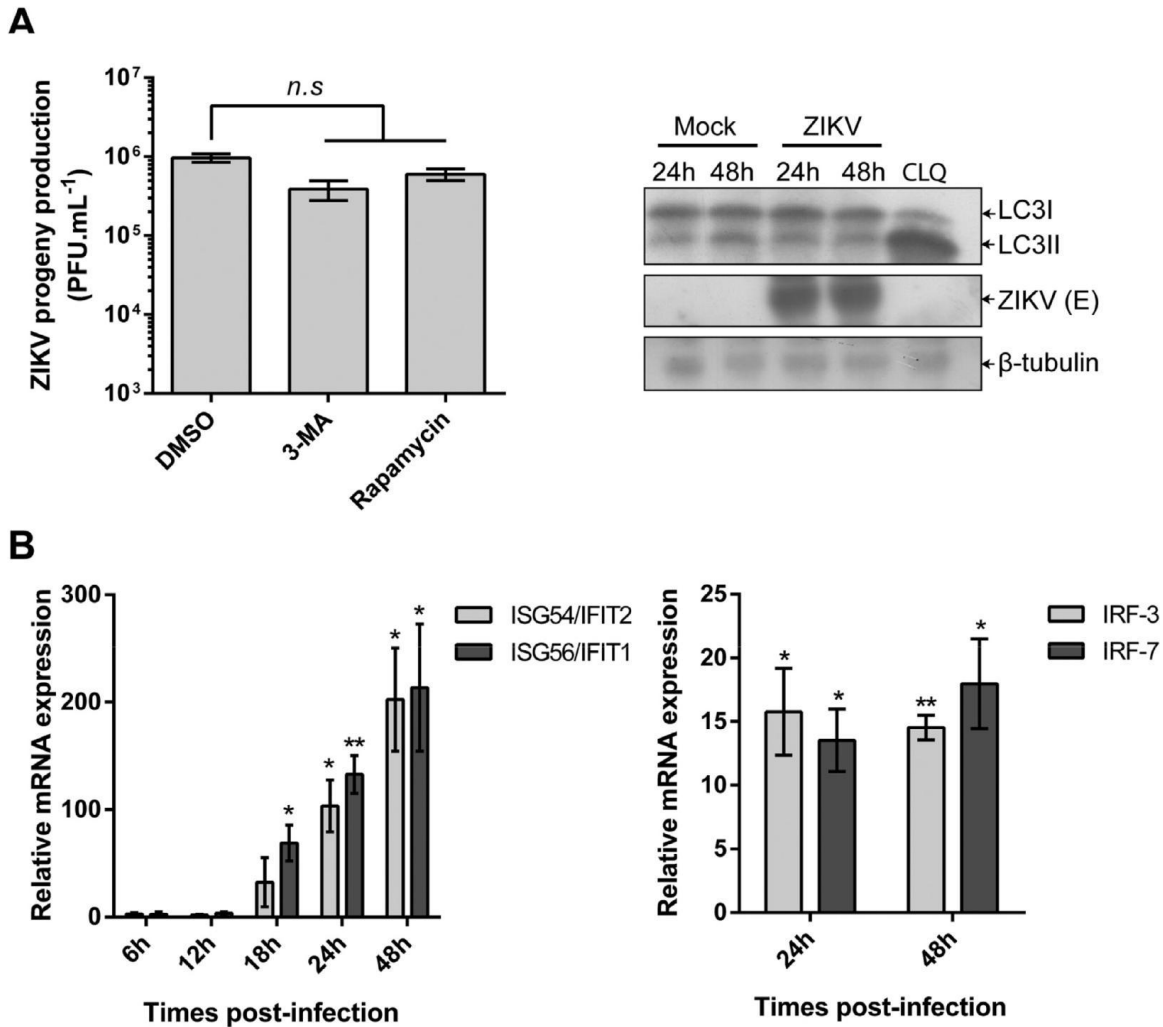


Fig. 3. ZIKV stimulates ISGs but not autophagy. A549 cells were infected with ZIKV at MOI of 5. In (A), left, cells were treated with 3-MA (5 mmol L⁻¹) or 1 mmol L⁻¹ rapamycin two hours after virus exposure or mock-treated (DMSO). Viral progeny production was determined at 24 h post-infection. Results are the mean (7SEM) from three independent experiments. Right, cell extracts were analyzed with anti-LC3B I/II antibody or 4G2 antibody. Antibody against β-tubulin served as protein loading control. As a positive control, cells were treated 24 h with 50 mmol L⁻¹ chloroquine (CLQ) which served as a potent inducer of autophagy. In (B), mRNA levels of ISG 54 and 56 (left) or IRF-3 and IRF-7 (right) were quantified over time by RT-qPCR. Results are expressed as the fold induction of transcripts in ZIKV-infected cells relative to those in mock-infected cells. Results are the mean (7SEM) from four independent experiments performed in triplicates. For each time point, p-values were determined based on the comparison with uninfected cells. Statistical values are indicated.

of 10⁴ cells per well were incubated with UV-inactivated cell super-natants. The IFN/SEAP activity was evaluated using the substrate Quanti-blue according to the manufacturer's recommendations.

2.11. Caspase-3/7 activity

A549 cells were cultured in a 96-well plate at a density of 5 × 10³ cells per well. Caspase-3/7 activity in crude cell lysates was measured using Caspase Glo^S 3/7 Assay Kit (Promega) according to the manufacturer's protocols. Caspase activity was quantified by luminescence using a FLUOstar Omega Microplate Reader (BMG LABTECH).

2.12. Measurement of ROS

Intracellular reactive oxygen species (ROS) level was measured using CM-H₂DCFDA dye (Molecular Probes). For total ROS detection, 1 × 10⁶ cells were stained with 10 mmol L⁻¹ CM-H₂DCFDA in phenol red-free media for 45 min at 37 °C in the dark. Mitochondrial ROS were detected using the MitoSOX Red probe (Molecular Probes). For MitoSOX staining, 1 × 10⁶ cells were stained with 5 mmol L⁻¹ dye in phenol red free HBSS with Ca²⁺ and Mg²⁺ (PAN

Biotech) for 45 min at 37 °C in the dark. Cells were then harvested, fixed with 3.7% formaldehyde for 20 min and subjected to a flowcytometric analysis using FACScan flow cytometer.

2.13. Statistical analysis

All values are expressed as mean ± 7SEM of at least of 3 independent experiments. RT-qPCR statistical analysis was carried out by Student's t-test. For other experiments, comparisons between different treatments have been analyzed by a one-way ANOVA test. Values of p < 0.05 were considered statistically significant for a post-hoc Tukey's test. All statistical tests were done using the software Graph-Pad Prism version 5.01. Degrees of significance are indicated in the as follow: *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001, n.s./not significant.

3. Results and discussion

3.1. ZIKV replicates efficiently in A549 cells

To evaluate the susceptibility of A549 cells to ZIKV strain PF-25013-18, cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of

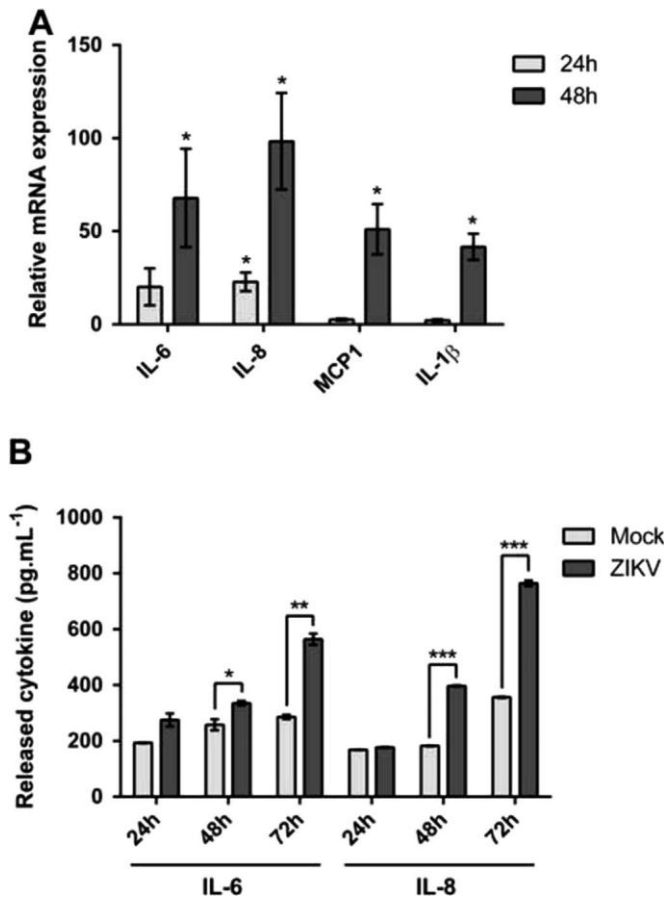


Fig. 4. ZIKV infection induces cytokine expression in A549 cells. A549 cells were infected with ZIKV at MOI of 5. In (A), total RNA were extracted at 24 h and 48 h post-infection and analyzed for the expression of cytokine mRNA by RT-qPCR. Results are expressed as the fold induction of transcripts in ZIKV-infected cells relative to those in mock-infected cells. Results are the mean (7SEM) from four independent experiments performed in triplicates. For each time point, p-values were determined based on the comparison with mock-infected cells. In (B), ELISA kits for the measure of IL-6 or IL-8 production were assessed on the supernatants of infected or mock-infected cells at different times post-infection. As a positive control, cells incubated 24 h with 10 ng mL⁻¹ of TNF- α released 1 ng mL⁻¹ of IL-6 or IL-8. Results are the mean (7SEM) from three independent experiments performed in triplicates. Statistical values are indicated.

5 PFU/cell and viral growth was first analyzed by immuno-fluorescence (IF) analysis using anti-dsRNA J2 antibody or anti-pan flavivirus E protein mAb 4G2 (Fig. 1A). Subcellular distribution of both viral RNA and the envelope E protein was detected in A549 cells at 24 h and 48 h post-infection. By flow cytometry analysis using mAb 4G2, the percentage of infected cells reached the 50% within the 48 h of infection (Fig. 1B). The progeny virus production was measured using a standard plaque-forming assay on Vero cells (Fig. 2). The kinetic of ZIKV growth in A549 cells showed that virus titers significantly increased between 12 h and 18 h post-infection to reach a plateau at almost 7 log PFU mL⁻¹ within the 48 h of infection. Such results showed that the growth of ZIKV strain PF-25013-18 was highly efficient in A549 cells.

3.2. ZIKV infection induces IFIT genes expression but not autophagy

Autophagy is a lysosomal degradation pathway that is implicated in flavivirus infection, although its role still remains discussed (Heaton and Randall, 2011; Lee et al., 2008; Martín-Acebes et al., 2015). It has been suggested that autophagy may promote ZIKV replication through restriction of antiviral innate immune response (Hamel et al., 2015). To determine whether ZIKV

infection involved autophagy in A549 cells, infected cells were treated with the autophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA) and the autophagy inducer rapamycin (Fig. 3A, left). We verified that both drugs were efficient in the control of autophagy in A549 cells (Fig. S1). At 24 h post-infection, no significant change was observed in the growth of ZIKV in A549 cells incubated either with 3-MA or rapamycin when compared with the vehicle control. To confirm the absence of autophagy in A549 cells infected with ZIKV, immunoblot analysis was performed on endogenous microtubule-associated protein light chains LC3-I and LC3-II, the latter being considered as a marker for autophagosomes and their accumulation (Mizushima and Yoshimori, 2007; Tanida et al., 2008) (Fig. 3A, right). LC3 immunoblotting detected no obvious change in the amounts of LC3-II in ZIKV-infected A549 cells when compared with mock-infected cells. These results provided no evidence that autophagy might play a role in the efficiency of ZIKV growth in A549 cells.

There is mounting evidence that the interferon-induced proteins with tetratricopeptide repeats (IFIT) exert antiviral effects against flaviviruses (Daffis et al., 2010; Kimura et al., 2013). Given that dengue virus induced expression of IFIT in A549 cells (Hsu et al., 2013), we investigated whether ZIKV infection stimulates the transcriptional activity of IFIT family genes in these cells. At 18 h post-infection, RT-qPCR analysis showed that ZIKV infection stimulated both ISG56/IFIT1 and ISG54/IFIT2 genes and the amounts of transcripts increased during the time course of infection (Fig. 3B, left). There was a 200-fold increase in the amounts of ISG56/IFIT1 and ISG54/IFIT2 transcripts at 48 h post-infection when compared with mock-infected cells.

The interferon regulatory factors (IRF) 3 and 7 can drive the expression of both ISG56/IFIT1 and ISG54/IFIT2 genes (Barnes et al., 2004; Honda et al., 2005; Sato et al., 2000). Transcriptional activity of IRF-7 was detected in primary human skin fibroblasts infected by ZIKV (Hamel et al., 2015). RT-qPCR analysis was performed to determine whether ZIKV infection stimulates the transcription of both IRF-3 and IRF-7 genes in A549 cells (Fig. 3B, right). There was a 15-fold increase in the amounts of IRF-3 and IRF-7 transcripts at 24 h and 48 h post-infection. Thus, the transcription of IRF-3 and IRF-7 genes as well as ISG56/IFIT1 and ISG54/IFIT2 genes was significantly enhanced in response to ZIKV. Together, these results suggested that antiviral innate immune response can take place in A549 cells infected by ZIKV.

3.3. ZIKV infection stimulates cytokines expression

Production of pro-inflammatory cytokines was detected in patients infected with ZIKV (Tappe et al., 2015). Transcriptional activity of pro-inflammatory IL-1 β , IL-6 and IL-8 genes was observed in primary human skin fibroblasts infected by ZIKV (Hamel et al., 2015). We examined whether ZIKV infection induced expression of IL-6, IL-8, IL-1 β and the Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP1) in A549 cells. The transcriptional activity of these cytokines was monitored by RT-qPCR at 24 h and 48 h post-infection (Fig. 4A). The activation of IL-8 gene was significantly detected within the 24 h of infection whereas transcriptional activity of IL-6, IL-1 β and MCP1 genes started at 48 h. Quantitative ELISA tests detected the presence of soluble IL-8, and a lesser extent IL-6, in the supernatants of A549 cells infected 48 h with ZIKV (Fig. 4B). As already observed in skin fibroblasts, ZIKV infection leads to production of cytokines in human epithelial cells.

3.4. ZIKV infection leads to secretion of IFN- β at early infection times

We next asked whether the ZIKV growth in A549 cells leads to the production of IFN- β . Intracellular IFN- β mRNA was quantified

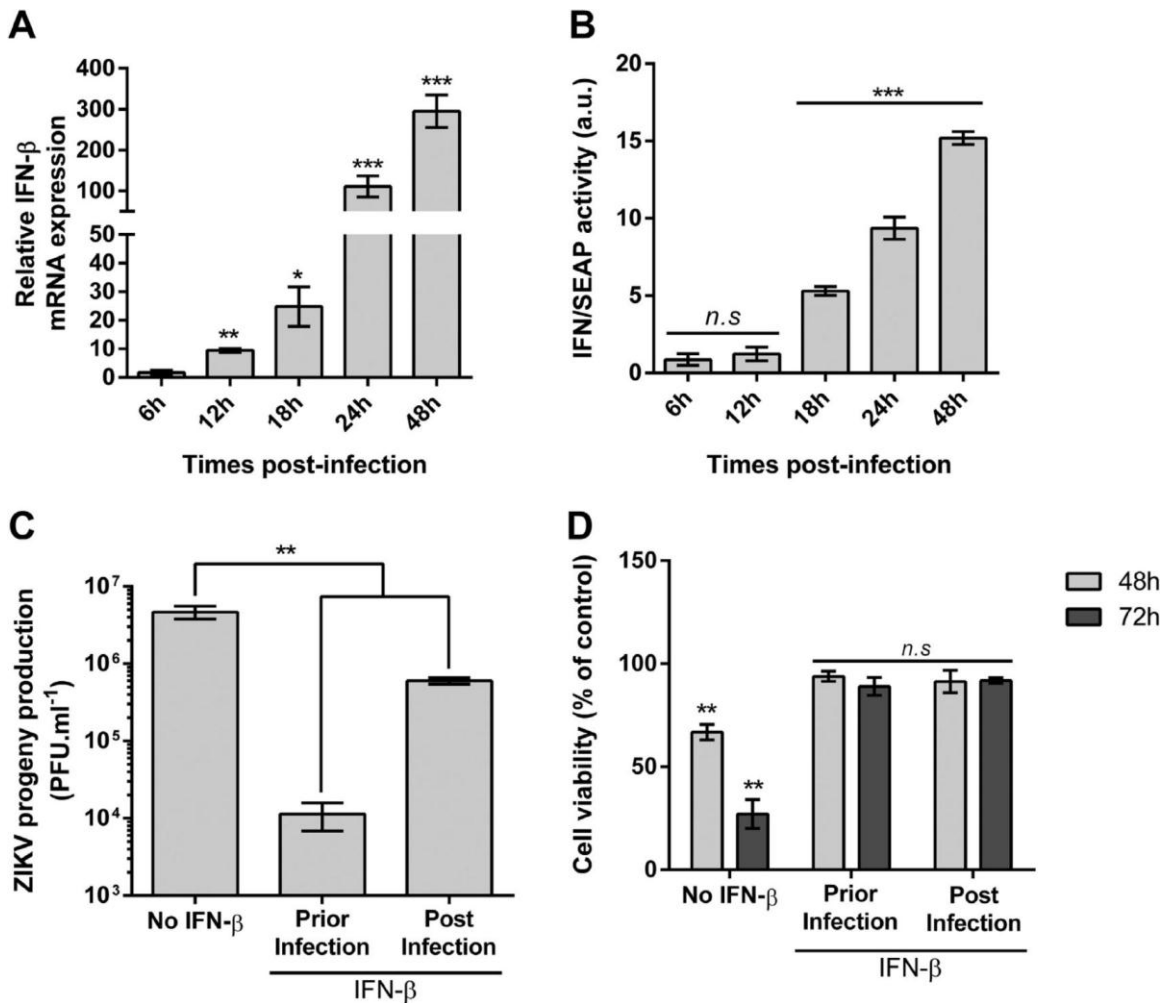


Fig. 5. IFN- β production in response to ZIKV. A549 cells were infected with ZIKV at MOI of 5. In (A), time-course of IFN- β mRNA expression quantified over time by RT-qPCR. Results are expressed as the fold induction of transcripts in ZIKV-infected cells relative to those in mock-infected cells. In (B), time course of IFN- β release in response to ZIKV. HEK-Blue™ IFN- α/β cells were incubated 16 h with UV-inactivated supernatants of ZIKV-infected cells and the extracellular IFN/SEAP activity was measured using Quanti-blue reagent. Results are expressed as the fold induction of IFN/SEAP activity in ZIKV-infected cells relative to those in mock-infected cells. In (C), antiviral effect of IFN- β against ZIKV. A549 cells were treated 24 h prior ZIKV infection or 2 h after ZIKV exposure with IFN- β (10,000 UI mL⁻¹) and virus titers were determined at 48 h post-infection. In (D), IFN- β treatment provides protection against ZIKV-mediated cell death. Viability of ZIKV-infected A549 cells treated with IFN- β as described above or mock-treated (no IFN- β) was measured using MTT assay. Viability was expressed as the percentage of cell metabolic activity in ZIKV-infected cells relative to those in mock-infected cells. No loss of cell viability was observed in ZIKV-infected A549 cells at 24 h post-infection (100% of control). Results are the mean (7SEM) from four independent experiments performed in triplicates. Statistical values are indicated.

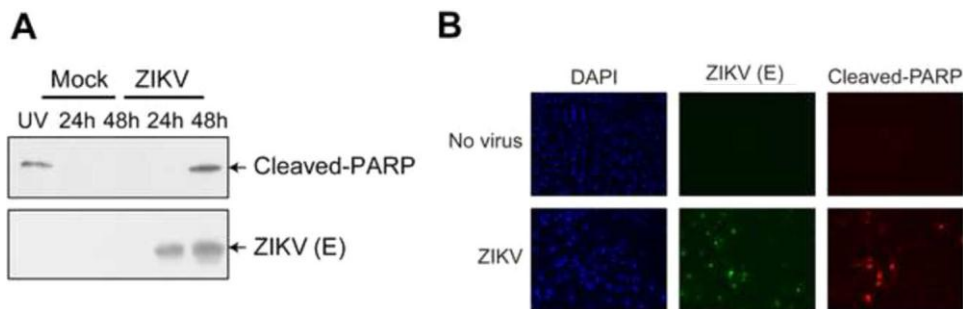


Fig. 6. ZIKV infection induces apoptosis in A549 cells. A549 cells were infected with ZIKV at MOI of 5. The cleavage of PARP in ZIKV-infected cells was analyzed by immunoblot (A) and IF (B) assays using specific antibody against the 85 kDa-cleaved form of PARP. In (A), immune detection of cleaved form of PARP (cleaved-PARP) in cell extracts from infected (ZIKV) or mock-infected (Mock) with ZIKV at different times post-infection. As a positive control for cells in apoptotic state, cells were exposed to UV (400 mJ/cm²). The ZIKV E protein was immunoblotted with 4G2 antibody. In (B), immunostaining of cleaved-PARP in cells infected 48 h with ZIKV. The ZIKV E protein was immunostained with 4G2 antibody. Nuclei were stained with DAPI. The data are representative of three independent experiments.

by RT-qPCR at different time-points of infection (Fig. 5A). The transcriptional activity of the IFN- β gene in ZIKV-infected A549 cells was significantly detected as soon as 12 h post-infection. The amounts of IFN- β mRNA transcripts strongly increased between

18 h and 24 h post-infection. At 48 h post-infection, there was a 300-fold increase in the IFN- β mRNA copy numbers in ZIKV-infected A549 cells when compared with mock-infected cells. To determine whether the IFN- β was biologically active, we used the

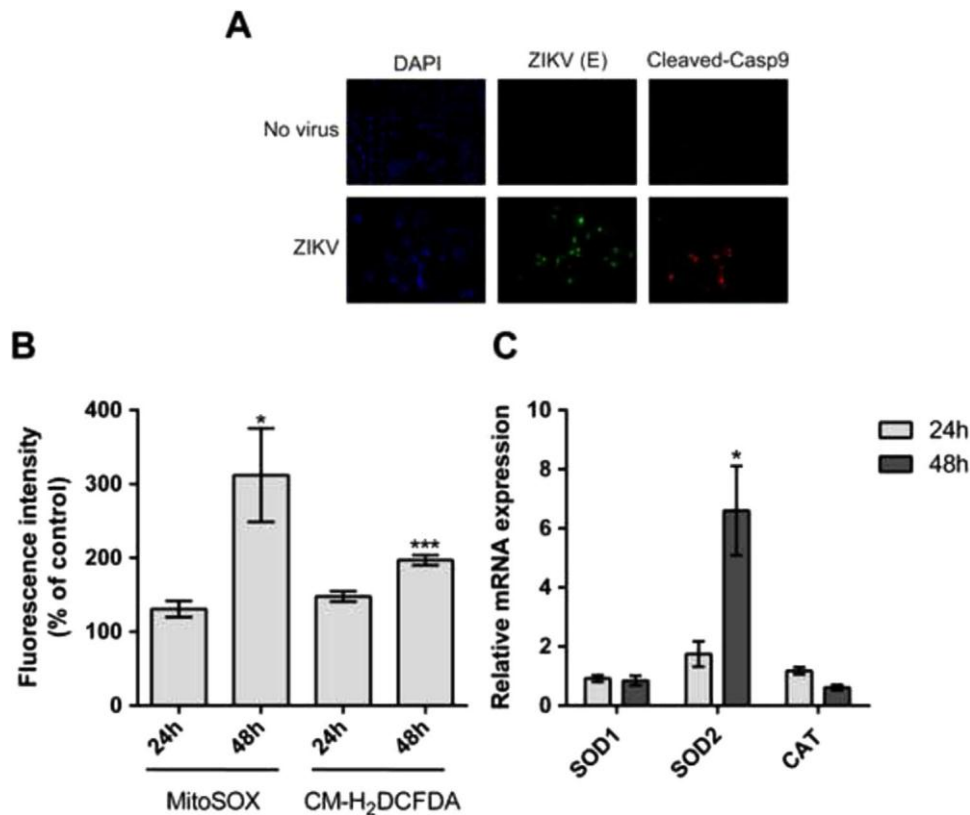


Fig. 7. Caspase-9 activation and mitochondrial ROS production in response to ZIKV infection. A549 cells were infected with ZIKV at MOI of 5. In (A) detection of active caspase-9 at 48 h post-infection by IF analysis using antibody directed against the cleaved form of caspase-9. The ZIKV E protein was detected with 4G2 antibody. Nuclei were stained with DAPI. In (B), the production of total intracellular and mitochondrial ROS was analyzed by flow cytometry using CM-H₂DCFDA dye or MitoSOX, respectively. ROS load was expressed as percentage of mean fluorescence intensity in ZIKV-infected cells relative to those in mock-infected cells (control). In (C), SOD1, SOD2 and CAT mRNA levels were quantified over time by RT-qPCR. Results are expressed as the fold induction of transcripts in ZIKV-infected cells relative to those in mock-infected cells normalized to GAPDH. Results are the mean (7 SEM) from at least three independent experiments performed in triplicates. For each time point, p-values were determined based on the comparison with uninfected cells. Results are the mean (7 SEM) from three independent experiments performed in triplicates. Statistical values are indicated.

reporter HEK-Blue IFN- α/β cells system allowing the measure of Type-I IFN activity (Fig. 5B). The supernatants of ZIKV-infected A549 cells were collected at different time-points of infection, UV-inactivated and then analyzed on HEK-Blue IFN- α/β cells containing the SEAP reporter gene under the control of IFN- α/β inducible ISG54 promoter. The kinetic of SEAP activity coincided with the accumulation of IFN- β mRNA indicating that the release of soluble IFN- β was efficient in ZIKV-infected A549 cells. We noted that the production of bioactive IFN- β correlated with the time course of virus progeny production together with the induction of ISGs.

We determined whether ZIKV-infected A549 cells were sensitive to the action of IFN- β . We first verified that IFN- β has no obvious effect on cell viability along the course of the treatment (Fig. S2). As shown in Fig. 5C, IFN- β pretreatment resulted in a dramatic reduction of progeny virus production at 48 h post-infection when compared with mock-treated ZIKV-infected cells. Such result confirms that IFN- β provides protection against ZIKV infection when host cells are treated prior infection (Hamel et al., 2015). There was a lower inhibition of ZIKV growth when IFN- β was added at 2 h post-infection. Thus, antiviral effect of IFN- β is greatly attenuated once virus replication is established inside infected cells. As shown in Fig. 5D, the viability of ZIKV-infected A549 cells significantly decreased at 48 h post-infection with a cell survival rate lower than 50% within the 72 h. Interestingly, cell viability was essentially preserved when IFN- β was added 2 h post ZIKV exposure though virus progeny production was moderately reduced. These results suggest that IFN- β control of ZIKV replication in A549 cells can promote cell survival.

3.5. ZIKV infection induces mitochondrial apoptosis

The quantification of ZIKV-induced cell death by measuring the release of lactate dehydrogenase (LDH) showed that a loss of cell integrity occurred within the 48 h of infection (Fig. S3). It has been reported that dengue virus infection causes apoptosis in A549 cells (Hsu et al., 2013). To determine whether ZIKV induces apoptosis in A549 cells, immunoblot assay was performed on infected cell lysates using an antibody directed against the 85 kDa-cleaved form of PARP, a hallmark of apoptosis (Fig. 6A). The cleaved form of PARP was significantly detected in ZIKV-infected cells at 48 h post-infection. At this time-point of infection, the cleavage of PARP inside the infected cells was verified by IF analysis (Fig. 6B). These results showed that ZIKV can trigger apoptosis in A549 cells.

To examine whether mitochondria contribute to apoptosis triggered by ZIKV, we investigated the activation of caspase-9 that relies on a mitochondrial permeabilization. At 48 h post-infection, ZIKV-infected A549 cells were immunostained with an antibody directed against the cleaved form of caspase-9 (Fig. 7A). Thus ZIKV infection leads to activation of caspase-9 which plays a central role in the mitochondrial pathway of apoptosis (Susin et al., 1999). We observed that some positive cells for activated caspase-9 were not detected with the anti-E mAb 4G2. An explanation is that ZIKV E protein is subjected to a proteolytic degradation in apoptotic cells. An alternative would be that unidentified extracellular signals contribute to the apoptosis triggered by ZIKV.

Reactive oxygen species (ROS), which are essential in driving mitochondrial apoptosis (Fleury et al., 2002), may play a role in apoptosis triggered by flavivirus (Olagner et al., 2014). To

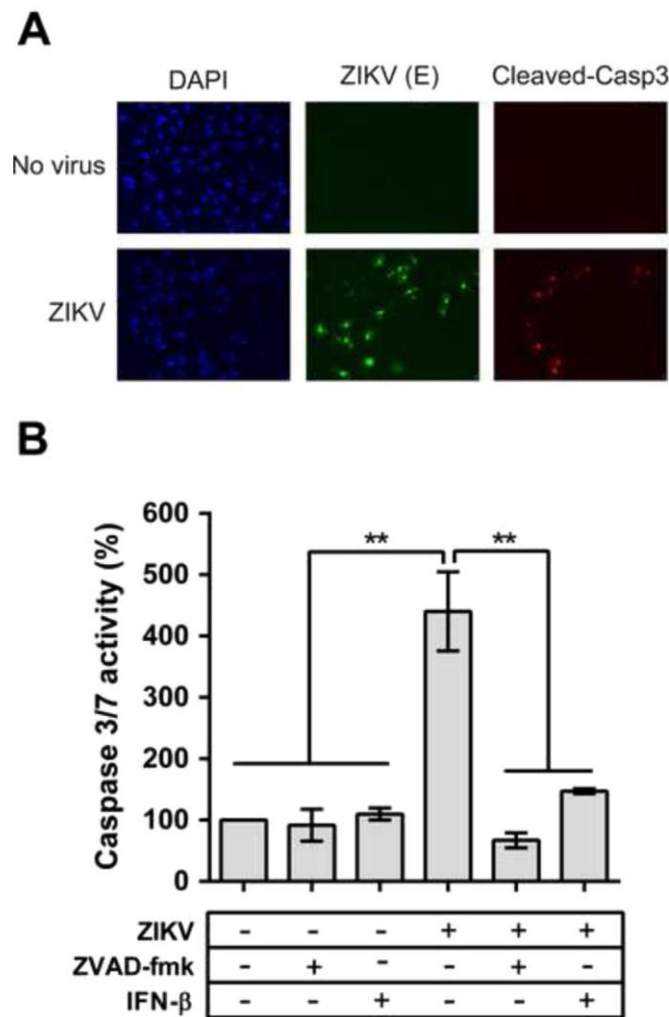


Fig. 8. IFN β -mediated inhibition of caspase-3 activity in ZIKV-infected cells. A549 cells were infected with ZIKV at MOI of 5. In (A), detection of active caspase-3 at 48 h post-infection by IF analysis using antibody directed against the cleaved form of caspase-3. The ZIKV E protein was detected with 4G2 antibody. Nuclei were stained with DAPI. In (B), caspase-3/7 activity in cell extracts infected 48 h with ZIKV was analyzed using the Caspase Glo 3/7 kit. Cells were incubated with pan-caspase inhibitor ZVAD-fmk (50 mM) or IFN- β (10,000 UI mL⁻¹) at 2 h post-infection. The caspase-3/7 activity was determined as a percentage of caspase activity in ZIKV-infected cells relative to that in mock-infected cells. For each time point, p-values were determined based on the comparison with mock-infected cells. Statistical values are indicated.

determine whether the ZIKV-mediated apoptosis involves the production of mitochondrial ROS, ZIKV-infected A549 cells were loaded with the ROS-sensitive probe MitoSOX for 30 min and cells were processed for analysis using flow cytometry (Fig. 7B). As a control, the infected cells were probed with CM-H₂DCFDA as a general indicator of the intracellular oxidative stress. There was a strong increase in the MitoSOX signal from 24 h to 48 h post-infection suggesting a causal relationship between induction of apoptosis and accumulation of mitochondrial ROS (Fig. 7B). ROS are tightly regulated by antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SODs) and catalase (CAT) (Sena and Chandel, 2012). At 48 h post-infection, there was a marked increase in the amount of the mitochondrial SOD2 gene transcripts in response to ZIKV whereas no significant transcriptional activity was observed with SOD1 or Catalase gene (Fig. 7C). Altogether, these results suggest that ZIKV infection stimulated the production of mitochondrial ROS in A549 cells at 48 h post-infection leading to an increase in the expression level of SOD2 concomitantly to induction of apoptosis through activation of caspase-9.

3.6. IFN- β prevents apoptosis in A549 cells infected with ZIKV

Since IFN- β treatment after ZIKV exposure promoted cell survival (Fig. 5D), we asked whether IFN- β could prevent the activation of executioner caspase-3. By IF assay using antibody against the cleaved form of caspase-3, we showed that ZIKV infection leads to activation of caspase-3 in A549 cells at 48 h post-infection (Fig. 8A). Using a caspase-3/7 assay kit, we confirmed a significant increase of caspase-3/7 activity at 48 h post-infection (Fig. 8B). As a control, pan-caspase inhibitor Z-VAD-fmk inhibited caspase-3 in A549 cells infected with ZIKV. A basal level of caspase 3/7 activity was observed in A549 cells treated with IFN- β 2 h after ZIKV exposure (Fig. 8B). Such result suggests that IFN- β is able to prevent apoptosis in human cells infected by ZIKV.

4. Conclusion

In the present study, we demonstrated that replication of the ZIKV strain PF-25013-18 isolated during the epidemic of Zika fever in French Polynesia in 2013 is highly efficient in human epithelial A549 cells with virus progeny production reaching up to 7 log PFU mL⁻¹ at 48 h post-infection. There was no evidence that ZIKV infection activates autophagy in A549 cells as it has been previously observed in human fibroblasts (Hamel et al., 2015). The efficient growth of ZIKV in A549 cells stimulated the expression of IRF3 and IRF7 at 24 h post-infection concomitantly to the expression of ISGs such as IFIT gene family members. The replication of ZIKV in A549 cells also stimulated the production of IFN- β and soluble pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and IL-8, as well as MCP1. It would be worth assessing their role in the pathogenesis of ZIKV infections in humans (Suthar et al., 2013; Tappe et al., 2015; Winter et al., 2004).

Both IFN- β and viral molecular patterns can induce transcription of ISG56/IFIT2 and ISG54/IFIT1 genes belonging to the ISG56 genes family (Fensterl and Sen, 2011). It has been reported that ISG56/IFIT1 acts as inhibitor of cellular and viral processes during flavivirus infection and can form a complex with ISG54/IFIT2 which is known to promote apoptosis by a mitochondrial pathway (Reich, 2013). Transcriptional activity of ISG56/IFIT2 and ISG54/IFIT1 genes was detected in A549 cells concomitantly to the production of soluble IFN- β in response to ZIKV infection. In light of the inhibitory effects of both ISG56/IFIT1 and ISG54/IFIT2 on viral infection, it is urgent to investigate their role in the pathogenicity of ZIKV in vitro.

For the first time, our data demonstrate that ZIKV infection can trigger apoptosis through activation of caspases-3 and -9. Induction of apoptosis occurred at maximum of progeny virus production and was associated to the accumulation of mitochondrial ROS. Improved knowledge of the mechanisms by which ZIKV strain PF-25013-18 activates the mitochondrion-dependent apoptotic pathway will help to better understand the pathogenic properties of epidemic ZIKV strains in human cells (Catteau et al., 2004; Courageot et al., 2003; Ghosh Roy et al., 2014; Martins et al., 2012). We noted that activation of apoptosis was concomitant to the production of pro-inflammatory cytokines. Among them, IL-1 β has been implicated as an extracellular signal in the initiation of intrinsic apoptotic pathway (Grunnet et al., 2009; Wang et al., 2005). Whether the release of cytokines such as IL-1 β might play a role in apoptosis observed in ZIKV-infected A549 cells is an important issue that remains to be investigated.

Our data confirmed that IFN- β exerts a potent antiviral effect against ZIKV (Hamel et al., 2015). However, addition of IFN- β shortly after exposure to ZIKV has been shown to result in a moderate inhibition of viral growth indicating that antiviral effect of IFN- β against ZIKV becomes rapidly attenuated once virus

replication is established in A549 cells. As it has been observed with different flaviviruses, ZIKV has the ability to subvert the action of IFN- β (Diamond, 2009; Green et al., 2014; Muñoz-Jordán and Fredericksen, 2010). Whether ZIKV-encoded proteins such as NS4B and NS5 might be involved in the inhibition of IFN- β signaling will be the subject of further investigation (Laurent-Rolle et al., 2014; Mazzon et al., 2009; Morrison et al., 2012). We can not rule out that viral RNA as well as viral replication complexes were sequestered in a manner that prevents the action of IFN- β pathway as well as antiviral ISGs (Miorin et al., 2012).

In the study reported here, we show that ZIKV infection of A549 cells involved the release of bioactive IFN- β at early infection times. While IFN- β was much less efficient at inhibiting ZIKV replication inside infected A549 cells, it was able to prevent apoptosis revealing a protective role for IFN- β . Ongoing studies are now aimed at determining whether the early release of IFN- β can lead to an appropriate survival of ZIKV-infected epithelial cells and therefore this might be a mechanism that promotes viral growth in delaying apoptosis.

Acknowledgments

We thank Patrick Mavingui, Pascale Guiraud, Olivier Meilhac and Philippe Gasque for helpful discussions. We would like to thank Mai-Lormeau and Didier Musso for kindly providing the ZIKV strain PF-25013-18. DM and PD were supported by the Grant ANR-12-BSV3-0004-01 (KerARBO) from the Agence Nationale de la Recherche, France. EF and BN were supported by grants DIREC 20121399 and DIREC 20131515, respectively, from the Conseil Régional de l'île de La Réunion, France.

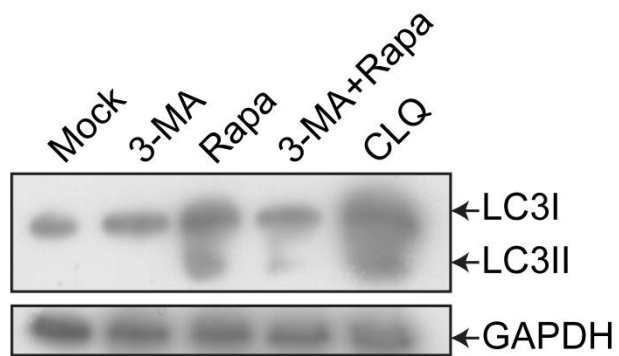
Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2016.03.006>.

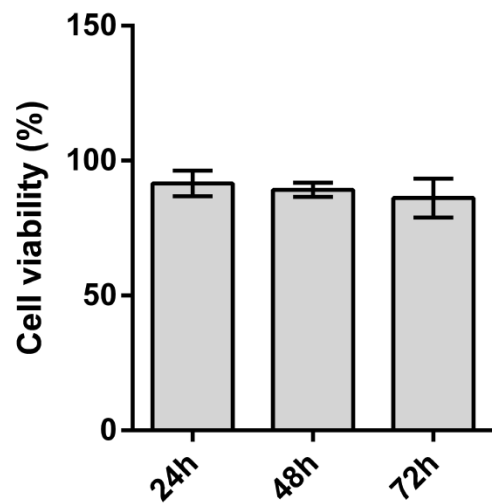
References

- Alera, M.T., Hermann, L., Tac-An, I.A., Klungthong, C., Rutvisuttinunt, W., Manasa-tienkij, W., Villa, D., Thaisomboonsuk, B., Velasco, J.M., Chinnawirotpisan, P., Lago, C.B., Roque, V.G., Macareo, L.R., Srikiatkachorn, A., Fernandez, S., Yoon, I.-K., 2015. Zika virus infection, Philippines, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 722–724. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2104.141707>.
- Barnes, B.J., Richards, J., Mancl, M., Hanash, S., Beretta, L., Pitha, P.M., 2004. Global and distinct targets of IRF-5 and IRF-7 during innate response to viral infection. *J. Biol. Chem.* 279, 45194–45207. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M400726200>.
- Berthet, N., Nakouné, E., Kamgang, B., Selekon, B., Descorps-Declère, S., Gessain, A., Manuguerra, J.-C., Kazanji, M., 2014. Molecular characterization of three Zika flaviviruses obtained from sylvatic mosquitoes in the Central African Republic. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt* N 14, 862–865. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2014.1607>.
- Besnard, M., Lasterie, S., Teissier, A., Cao-Lormeau, V., Musso, D., 2014. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill* 19.
- Buathong, R., Hermann, L., Thaisomboonsuk, B., Rutvisuttinunt, W., Klungthong, C., Chinnawirotpisan, P., Manasatienkij, W., Nisalak, A., Fernandez, S., Yoon, I.-K., Akrawee, P., Pipat, T., 2015. Detection of Zika Virus Infection in Thailand, 2012–2014. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 93, 380–383. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.15-0022>.
- Campos, G.S., Bandeira, A.C., Sardi, S.I., 2015. Zika Virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1885–1886. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2110.150847>.
- Catteau, A., Courageot, M.P., Desprès, P., 2004. Flaviviruses and apoptosis regulation. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 36, 171–189.
- Courageot, M.-P., Catteau, A., Desprès, P., 2003. Mechanisms of dengue virus-induced cell death. *Adv. Virus Res.* 60, 157–186.
- Daffis, S., Sretzter, K.J., Schriewer, J., Li, J., Yoon, S., Errett, J., Lin, T.-Y., Schneller, S., Züst, R., Dong, H., Thiel, V., Sen, G.C., Fensterl, V., Klimstra, W.B., Pierson, T.C., Buller Jr, R.M., Shi, M.G., Diamond, M.S., P.-Y., 2010. 2⁰-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature* 468, 452–456. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09489>.
- Diallo, D., Sall, A.A., Diagne, C.T., Faye, O., Faye, O., Ba, Y., Hanley, K.A., Buenemann, M., Weaver, S.C., Diallo, M., 2014. Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. *PLoS One* 9, e109442. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0109442>.
- Diamond, M.S., 2009. Mechanisms of evasion of the type I interferon antiviral response by flaviviruses. *J. Interferon Cytokine* 29, 521–530. <http://dx.doi.org/10.1089/jir.2009.0069>.
- Duffy, M.R., Chen, T.-H., Hancock, W.T., Powers, A.M., Kool, J.L., Lanciotti, R.S., Pre-trick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., Guillaumot, L., Griggs, A., Bel, M., Lambert, A.J., Laven, J., Kosoy, O., Panella, A., Biggerstaff, B.J., Fischer, M., Hayes, E.B., 2009. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* 360, 2536–2543. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>.
- Dyer, O., 2015. Zika virus spreads across Americas as concerns mount over birth defects. *BMJ* 351, h6983. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.h6983>.
- Enfissi, A., Codrington, J., Roosblad, J., Kazanji, M., Rousset, D., 2016. Zika virus genome from the Americas. *Lancet*. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00003-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00003-9).
- Fensterl, V., Sen, G.C., 2011. The ISG56/IFIT1 gene family. *J. Interferon Cytokine Res.* 31, 71–78. <http://dx.doi.org/10.1089/jir.2010.0101>.
- Fleury, C., Mignotte, B., Vayssières, J.-L., 2002. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 84, 131–141.
- Ghosh Roy, S., Sadigh, B., Datan, E., Lockshin, R.A., Zakeri, Z., 2014. Regulation of cell survival and death during Flavivirus infections. *World J. Biol. Chem.* 5, 93–105. <http://dx.doi.org/10.4331/wjbc.v5.i2.93>.
- Grard, G., Caron, M., Mombo, I.M., Nkoghe, D., Mbouï Ondo, S., Jiolle, D., Fontenille, D., Paupy, C., Leroy, E.M., 2014. Zika virus in Gabon (Central Africa)—2007: a new threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2681. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002681>.
- Green, A.M., Beatty, P.R., Hadjilaou, A., Harris, E., 2014. Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. *J. Mol. Biol.* 426, 1148–1160. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2013.11.023>.
- Grunnet, L.G., Aikin, R., Tonnesen, M.F., Paraskevas, S., Blaauw, L., Størling, J., Rosenberg, L., Billestrup, N., Maysinger, D., Mandrup-Poulsen, T., 2009. Proinflammatory cytokines activate the intrinsic apoptotic pathway in beta-cells. *Diabetes* 58, 1807–1815. <http://dx.doi.org/10.2337/db08-0178>.
- Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., Perera-Lecoin, M., Surasombattapana, P., Taligiani, L., Thomas, F., Cao-Lormeau, V.-M., Choumet, V., Briant, L., Desprès, P., Amara, A., Yssel, H., Missé, D., 2015. Biology of Zika Virus Infection in human skin cells. *J. Virol.* 89, 8880–8896. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00354-15>.
- Hancock, W.T., Marfel, M., Bel, M., 2014. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1960. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2011.141380>.
- Hayes, E.B., 2009. Zika virus outside Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1347–1350. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1509.090442>.
- Heaton, N.S., Randall, G., 2011. Dengue virus and autophagy. *Viruses* 3, 1332–1341. <http://dx.doi.org/10.3390/v3081332>.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., Taniguchi, T., 2005. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434, 772–777. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03464>.
- Hsu, Y.-L., Shi, S.-F., Wu, W.-L., Ho, L.-J., Lai, J.-H., 2013. Protective roles of interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT3) in dengue virus infection of human lung epithelial cells. *PLoS One* 8, e79518. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0079518>.
- Kimura, T., Katoh, H., Kayama, H., Saiga, H., Okuyama, M., Okamoto, T., Umemoto, E., Matsuura, Y., Yamamoto, M., Takeda, K., 2013. Ifit1 Inhibits Japanese Encephalitis Virus Replication through Binding to 5⁰ Capped 2⁰-O Unmethylated RNA. *J. Virol.* 87, 9997–10003. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00883-13>.
- Laurent-Rolle, M., Morrison, J., Rajsbbaum, R., Macleod, J.M.L., Pisanelli, G., Pham, A., Ayllon, J., Miorin, L., Martínez-Romero, C., tenOever, B.R., García-Sastre, A., 2014. The interferon signaling antagonist function of yellow fever virus NS5 protein is activated by type I interferon. *Cell Host Microbe* 16, 314–327. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.07.015>.
- Lee, Y.-R., Lei, H.-Y., Liu, M.-T., Wang, J.-R., Chen, S.-H., Jiang-Shieh, Y.-F., Lin, Y.-S., Yeh, T.-M., Liu, C.-C., Liu, H.-S., 2008. Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. *Virology* 374, 240–248. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2008.02.016>.
- Li, M.L., Wong, P.S.J., Ng, L.C., Tan, C.H., 2012. Oral susceptibility of Singapore *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) to Zika Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1792. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001792>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta}(C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Martín-Acebes, M.A., Blázquez, A.-B., Saiz, J.-C., 2015. Reconciling West Nile virus with the autophagic pathway. *Autophagy* 11, 861–864. <http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2015.1037062>.
- Martins, S., de, T., Silveira, G.F., Alves, L.R., dos Santos, C.N.D., Bordignon, J., 2012. Dendritic cell apoptosis and the pathogenesis of dengue. *Viruses* 4, 2736–2753. <http://dx.doi.org/10.3390/v4112736>.
- Mazzon, M., Jones, M., Davidson, A., Chain, B., Jacobs, M., 2009. Dengue virus NS5 inhibits interferon-alpha signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation. *J. Infect. Dis.* 200, 1261–1270. <http://dx.doi.org/10.1086/605847>.
- Miorin, L., Albornoz, A., Baba, M.M., D'Agaro, P., Marcello, A., 2012. Formation of membrane-defined compartments by tick-borne encephalitis virus contributes

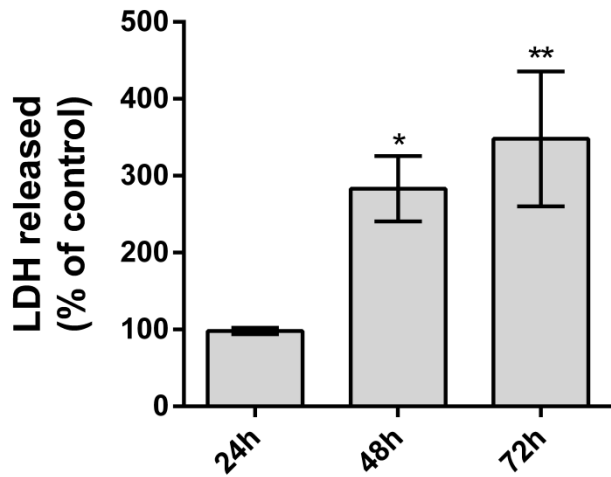
- to the early delay in interferon signaling. *Virus Res.* 163, 660–666. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2011.11.020>.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., 2007. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3, 542–545.
- Morrison, J., Aguirre, S., Fernandez-Sesma, A., 2012. Innate immunity evasion by Dengue virus. *Viruses* 4, 397–413. <http://dx.doi.org/10.3390/v4030397>.
- Muñoz-Jordán, J.L., Fredericksen, B.L., 2010. How flaviviruses activate and suppress the interferon response. *Viruses* 2, 676–691. <http://dx.doi.org/10.3390/v2020676>.
- Nativel, B., Marimoutou, M., Thon-Hon, V.G., Gunasekaran, M.K., Andries, J., Sta-nislas, G., Planesse, C., Da Silva, C.R., Césari, M., Iwema, T., Gasque, P., Vir-anaicken, W., 2013. Soluble HMGB1 is a novel adipokine stimulating IL-6 secretion through RAGE receptor in SW872 preadipocyte cell line: contribution to chronic inflammation in fat tissue. *PLoS One* 8, e76039. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0076039>.
- Oehler, E., Watrin, L., Larre, P., Leparc-Goffart, I., Lastere, S., Valour, F., Baudouin, L., Mallet, H., Musso, D., Ghawche, F., 2014. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome—case report, French Polynesia, December 2013. *EuroSurveill* 19, 19.
- Olagnier, D., Peri, S., Steel, C., van Montfoort, N., Chiang, C., Beljanski, V., Sliker, M., He, Z., Nichols, C.N., Lin, R., Balachandran, S., Hiscott, J., 2014. Cellular oxidative stress response controls the antiviral and apoptotic programs in dengue virus-infected dendritic cells. *PLoS Pathog.* 10, e1004566. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004566>.
- Reich, N.C., 2013. A death-promoting role for ISG54/IFIT2. *J. Interferon Cytokine* 33, 199–205. <http://dx.doi.org/10.1089/jir.2012.0159>.
- Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N., Taniguchi, T., 2000. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- α / β gene induction. *Immunity* 13, 539–548.
- Sena, L.A., Chandel, N.S., 2012. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol. Cell* 48, 158–167. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.025>.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prévost, M.-C., Alzari, P.M., Kroemer, G., 1999. Mitochondrial Release of Caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J. Exp. Med.* 189, 381–394. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.189.2.381>.
- Suthar, M.S., Aguirre, S., Fernandez-Sesma, A., 2013. Innate immune sensing of flaviviruses. *PLoS Pathog.* 9, e1003541. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003541>.
- Suthar, M.S., Brassil, M.M., Blahnik, G., Gale, M., 2012. Infectious clones of novel Lineage 1 and Lineage 2 West Nile Virus strains WNV-TX02 and WNV-Madagascar. *J. Virol.* 86, 7704–7709. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00401-12>.
- Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., 2008. LC3 and autophagy. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 445, 77–88. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4_4.
- Tappe, D., Pérez-Girón, J.V., Zammarchi, L., Rissland, J., Ferreira, D.F., Jaenisch, T., Gómez-Medina, S., Günther, S., Bartoloni, A., Muñoz-Fontela, C., Schmidt-Chanasit, J., 2015. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Med. Microbiol. Immunol.*, 1–5. <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-015-0445-7>.
- Umareddy, I., Pluquet, O., Wang, Q., Vasudevan, S.G., Chevet, E., Gu, F., 2007. Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. *Viol. J.* 4, 91. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-4-91>.
- Viranaicken, W., Gasmi, L., Chaumet, A., Durieux, C., Georget, V., Denoulet, P., Larcher, J.-C., 2011. Irf3 and L-NF90 traffic to the nucleolus granular component: alternatively-spliced exon 3 encodes a nucleolar localization motif. *PLoS One* 6, e22296. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0022296>.
- Wang, X., Kong, K., Qi, W., Ye, W., Song, P., 2005. Interleukin-1 β induction of neuron apoptosis depends on p38 mitogen-activated protein kinase activity after spinal cord injury. *Acta Pharmacol. Sin.* 26, 934–942. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00152.x>.
- Winter, P.M., Dung, N.M., Loan, H.T., Kneen, R., Wills, B., Thu, L.T., House, D., White, N.J., Farrar, J.J., Hart, C.A., Solomon, T., 2004. Proinflammatory cytokines and chemokines in humans with Japanese encephalitis. *J. Infect. Dis.* 190, 1618–1626. <http://dx.doi.org/10.1086/423328>.
- Wong, P.-S.J., Li, M.I., Chong, C.-S., Ng, L.-C., Tan, C.-H., 2013. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): a potential vector of Zika virus in Singapore. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2348. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002348>.
- Zanluca, C., de Melo, V.C.A., Mosimann, A.L.P., dos Santos, G.I.V., dos Santos, C.N.D., Luz, K., 2015. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 569–572. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760150192>.



Supplemental Fig.S1. Both 3-MA and rapamycin drugs are functional in A549 cells. A549 cells were mock-treated with DMSO or treated with either 5 mmol L⁻¹ 3-MA or 1 μ mol L⁻¹ rapamycin (Rapa), co-treated with 3-MA and rapamycin or treated with 50 μ mol L⁻¹ chloroquine (CLQ) for 24 h. Cell extracts were analyzed for the autophagosomal marker LC3 using anti-LC3B I/II antibody. Rabbit polyclonal antibody raised against GAPDH (Santa-Cruz Biotech) served as protein loading control.



Supplemental Fig. S2. IFN- β treatment has no effect on cell viability. Viability of A549 cells treated with IFN- β for various times was measured using MTT assay. Viability was expressed as the percentage of cell metabolic activity in treated cells relative to those in mock-treated cells. Results are the mean (\pm SEM) from three independent experiments performed in triplicates.



Supplemental Fig. S3. ZIKV infection results in a loss of cell integrity. Measurement of LDH activity in A549 cells infected with ZIKV. A549 cells were seeded in 96-well plates at a density of 104 cells per well and infected with ZIKV at MOI of 5. Supernatants were collected at various times post-infection and transferred to a new 96-well plate. The LDH activity was determined using the CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promega) in accordance with manufacturer's procedure. The change in the absorbance was recorded at 490 nm. The LDH values were expressed as a percentage of LDH release from mock-infected cells at each time post-infection. Results are the mean (\pm SEM) from three independent experiments performed in triplicates.

Reference	Gene	Forward Primer	Reverse Primer	Size (bp)
NM_002046.5	GAPDH	GGGAGCCAAAAGGGTCATCA	TGATGGCATGGACTGTGGTC	202
NM_002176.2	IFN- β	GTTCGTGTTGTCAACATGACCA	TCAATTGCCACAGGAGCTTCT	150
NM_001547.4	ISG54	GAGCCTTCTCAAAGCACACC	CTGGTCACCTGGGGAAACTA	214
NM_001548.4	ISG56	GCATTTTCATCGTCATCAATGGA	GAGGAGCCTGGCTAAGCAAA	150
NM_001572.3	IRF-7	CTCCCCACGCTATACCATCTAC	CCAGCTTTCTGGAGTTCTCATT	272
NM_001571.5	IRF-3	CCTCACGACCCACATAAAATCT	GTAGAAGGCTGTCACCTCGAAC	332
NM_000600.3	IL-6	AAAGCTGCGCAGAATGAGAT	AAAGAGGCACTGGCAGAAAA	350
NM_000584.3	IL-8	ATGACTTCCAAGCTGGCCGTG	TGCACCCAGTTTTCTTGGGG	256
NM_000576.2	IL-1 β	TTCGACACATGGGATAACGA	TCTTTCAACACGCAGGACAG	259
NM_002982.3	MCP1	CAATAGGAAGATCTCAGTGC	GTGTTCAAGTCTTCGGAGTT	192
NM_000454.4	SOD1	ACCAGTGTGCGGCCAATGATG	GCTGTACCAGTGCAGGTCCTCA	187
NM_000636.2	SOD2	AAGCTGACGGCTGCATCTGTTG	CGTGCTCCACACATCAATCCC	162
NM_001752.3	CAT	AGTCTCGCCGCATCTTCAACAG	TCTGGGACTTCTGGAGCCTACG	214

Table S1. List of primers for RT-qPCR analysis

Références bibliographique

1. Wenceslau CF, McCarthy CG, Szasz T, Spitler K, Goulopoulou S, Webb RC, et al. Mitochondrial damage-associated molecular patterns and vascular function. *Eur Heart J.* 2014;35: 1172–1177. doi:10.1093/eurheartj/ehu047
2. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: Signal Os that Spur Autophagy and Immunity. *Immunol Rev.* 2012;249: 158–175. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x
3. Zhang Q, Kang R, Herbert J, Zeh I, Lotze MT, Tang D. DAMPs and autophagy. *Autophagy.* 2013;9: 451–458. doi:10.4161/auto.23691
4. Pisetsky DS. The Translocation of Nuclear Molecules During Inflammation and Cell Death. *Antioxid Redox Signal.* 2013;20: 1117–1125. doi:10.1089/ars.2012.5143
5. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol.* 2007;81: 28–37. doi:10.1189/jlb.0306170
6. Nastase MV, Young MF, Schaefer L. Biglycan A Multivalent Proteoglycan Providing Structure and Signals. *J Histochem Cytochem.* 2012;60: 963–975. doi:10.1369/0022155412456380
7. Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol.* 2000;12: 1539–1546.
8. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 2002;418: 191–195. doi:10.1038/nature00858
9. Merendino AM, Bucchieri F, Campanella C, Marcianò V, Ribbene A, David S, et al. Hsp60 is actively secreted by human tumor cells. *PloS One.* 2010;5: e9247. doi:10.1371/journal.pone.0009247
10. Piccinini AM, Midwood KS, Piccinini AM, Midwood KS. DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling, DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling. *Mediat Inflamm Mediat Inflamm.* 2010;2010, 2010. doi:10.1155/2010/672395, 10.1155/2010/672395
11. Frey H, Schroeder N, Manon-Jensen T, Iozzo RV, Schaefer L. Biological interplay between proteoglycans and their innate immune receptors in inflammation. *FEBS J.* 2013;280: 2165–2179. doi:10.1111/febs.12145
12. Schaefer L. Complexity of Danger: The Diverse Nature of Damage-associated Molecular Patterns. *J Biol Chem.* 2014;289: 35237–35245. doi:10.1074/jbc.R114.619304
13. Dauphinee SM, Karsan A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* 2006;86: 9–22. doi:10.1038/labinvest.3700366
14. Yang H, Wang H, Ju Z, Ragab AA, Lundbäck P, Long W, et al. MD-2 is required for disulfide HMGB1–dependent TLR4 signaling. *J Exp Med.* 2015;212: 5. doi:10.1084/jem.20141318
15. Iwaki D, Nishitani C, Mitsuzawa H, Hyakushima N, Sano H, Kuroki Y. The CD14 region spanning amino acids 57–64 is critical for interaction with the extracellular Toll-like receptor 2 domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;328: 173–176. doi:10.1016/j.bbrc.2004.12.162

16. Geijtenbeek TBH, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009;9: 465–479. doi:10.1038/nri2569
17. Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol.* 2002;2: 77–84. doi:10.1038/nri723
18. Yamasaki S, Ishikawa E, Sakuma M, Hara H, Ogata K, Saito T. Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nat Immunol.* 2008;9: 1179–1188. doi:10.1038/ni.1651
19. Cambi A, Figdor C. Necrosis: C-type lectins sense cell death. *Curr Biol CB.* 2009;19: R375-378. doi:10.1016/j.cub.2009.03.032
20. Lee EJ, Park JH. Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE), Its Ligands, and Soluble RAGE: Potential Biomarkers for Diagnosis and Therapeutic Targets for Human Renal Diseases. *Genomics Inform.* 2013;11: 224–229. doi:10.5808/GI.2013.11.4.224
21. Kokkola R, Andersson A, Mullins G, Ostberg T, Treutiger C-J, Arnold B, et al. RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages. *Scand J Immunol.* 2005;61: 1–9. doi:10.1111/j.0300-9475.2005.01534.x
22. Rani SG, Sepuru KM, Yu C. Interaction of S100A13 with C2 domain of receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics.* 2014;1844: 1718–1728. doi:10.1016/j.bbapap.2014.06.017
23. Sakaguchi M, Murata H, Yamamoto K, Ono T, Sakaguchi Y, Motoyama A, et al. TIRAP, an Adaptor Protein for TLR2/4, Transduces a Signal from RAGE Phosphorylated upon Ligand Binding. *PLOS ONE.* 2011;6: e23132. doi:10.1371/journal.pone.0023132
24. Shear MJ, Turner FC, Perrault A, Shovelton T. Chemical Treatment of Tumors. V. Isolation of the Hemorrhage-Producing Fraction from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*) Culture Filtrate. *J Natl Cancer Inst.* 1943;4: 81–97. doi:10.1093/jnci/4.1.81
25. Mührladt PF, Golecki JR. Asymmetrical distribution and artifactual reorientation of lipopolysaccharide in the outer membrane bilayer of *Salmonella typhimurium*. *Eur J Biochem.* 1975;51: 343–352.
26. Rollauer SE, Soorshjani MA, Noinaj N, Buchanan SK. Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;370. doi:10.1098/rstb.2015.0023
27. Galloway SM, Raetz CR. A mutant of *Escherichia coli* defective in the first step of endotoxin biosynthesis. *J Biol Chem.* 1990;265: 6394–6402.
28. Onishi HR, Pelak BA, Gerckens LS, Silver LL, Kahan FM, Chen MH, et al. Antibacterial agents that inhibit lipid A biosynthesis. *Science.* 1996;274: 980–982.
29. Belunis CJ, Clementz T, Carty SM, Raetz CR. Inhibition of lipopolysaccharide biosynthesis and cell growth following inactivation of the *kdtA* gene in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1995;270: 27646–27652.
30. Heinrichs DE, Yethon JA, Whitfield C. Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol.* 1998;30: 221–232.

31. Amor K, Heinrichs DE, Fridrich E, Ziebell K, Johnson RP, Whitfield C. Distribution of Core Oligosaccharide Types in Lipopolysaccharides from *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2000;68: 1116–1124. doi:10.1128/IAI.68.3.1116-1124.2000
32. Holst O. Chemical structure of the core region of lipopolysaccharides. *Endotoxin in Health and Disease*. Marcel Dekker Inc.; 1999. pp. 305–330.
33. Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect*. 2002;4: 837–851.
34. Kauffmann F. The serology of the coli group. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1947;57: 71–100.
35. Lerouge I, Vanderleyden J. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS Microbiol Rev*. 2002;26: 17–47.
36. Brandenburg K, Koch MH, Seydel U. Phase diagram of deep rough mutant lipopolysaccharide from *Salmonella minnesota* R595. *J Struct Biol*. 1992;108: 93–106.
37. Aurell CA, Wistrom AO. Critical aggregation concentrations of gram-negative bacterial lipopolysaccharides (LPS). *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;253: 119–123. doi:10.1006/bbrc.1998.9773
38. Seydel U, Koch MH, Brandenburg K. Structural polymorphisms of rough mutant lipopolysaccharides Rd to Ra from *Salmonella minnesota*. *J Struct Biol*. 1993;110: 232–243. doi:10.1006/jsbi.1993.1026
39. Brandenburg K, Andrä J, Müller M, Koch MHJ, Garidel P. Physicochemical properties of bacterial glycopolymers in relation to bioactivity. *Carbohydr Res*. 2003;338: 2477–2489.
40. Bello G, Eriksson J, Terry A, Edwards K, Lawrence MJ, Barlow D, et al. Characterization of the Aggregates Formed by Various Bacterial Lipopolysaccharides in Solution and upon Interaction with Antimicrobial Peptides. *Langmuir*. 2015;31: 741–751. doi:10.1021/la503267k
41. Hitchcock PJ, Leive L, Mäkelä PH, Rietschel ET, Strittmatter W, Morrison DC. Lipopolysaccharide nomenclature--past, present, and future. *J Bacteriol*. 1986;166: 699–705.
42. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. In: Whistler R, Wolfan M, editors. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. New York: Academic press; 1965. pp. 83–91.
43. Westphal O, Lüderitz O, Bister F. Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Z Für Naturforschung B*. 1952;7: 148–155. doi:10.1515/znb-1952-0303
44. Galanos C, Lüderitz O, Westphal O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur J Biochem*. 1969;9: 245–249.
45. Chart H, Rowe B. Purification of lipopolysaccharide from strains of *Yersinia enterocolitica* belonging to serogroups O3 and O9. *FEMS Microbiol Lett*. 1991;61: 341–345.
46. Lee H-K, Lee J, Tobias PS. Two Lipoproteins Extracted from *Escherichia coli* K-12 LCD25 Lipopolysaccharide Are the Major Components Responsible for Toll-Like Receptor 2-Mediated Signaling. *J Immunol*. 2002;168: 4012–4017. doi:10.4049/jimmunol.168.8.4012

47. Mølvig J, Baek L. Removal of endotoxin from culture media by a polymyxin B sepharose column. The activity of contaminating endotoxin in culture media measured by the interleukin 1 inducing effect on human monocyte cultures and by the Limulus test. *Scand J Immunol.* 1987;26: 611–619.
48. Davis MR, Goldberg JB. Purification and visualization of lipopolysaccharide from Gram-negative bacteria by hot aqueous-phenol extraction. *J Vis Exp JoVE.* 2012; doi:10.3791/3916
49. Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2000;165: 618–622.
50. Chaby R, Sarfati SR, Szabó L. Colorimetric estimation of 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid in oligosaccharides with diphenylamine. *Anal Biochem.* 1974;58: 123–129.
51. Macgee J, Doudoroff M. A new phosphorylated intermediate in glucose oxidation. *J Biol Chem.* 1954;210: 617–626.
52. Weissbach A, Hurwitz J. The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli* B. I. Identification. *J Biol Chem.* 1959;234: 705–709.
53. Levin J, Bang FB. THE ROLE OF ENDOTOXIN IN THE EXTRACELLULAR COAGULATION OF LIMULUS BLOOD. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1964;115: 265–274.
54. Ding JL, Ho B. Endotoxin detection--from limulus amoebocyte lysate to recombinant factor C. *Subcell Biochem.* 2010;53: 187–208. doi:10.1007/978-90-481-9078-2_9
55. Roslansky PF, Novitsky TJ. Sensitivity of Limulus amoebocyte lysate (LAL) to LAL-reactive glucans. *J Clin Microbiol.* 1991;29: 2477–2483.
56. Tsuji K, Steindler KA. Use of magnesium to increase sensitivity of Limulus amoebocyte lysate for detection of endotoxin. *Appl Environ Microbiol.* 1983;45: 1342–1350.
57. Brandenburg K, Howe J, Gutsman T, Garidel P. The expression of endotoxic activity in the Limulus test as compared to cytokine production in immune cells. *Curr Med Chem.* 2009;16: 2653–2660.
58. Dehus O, Hartung T, Hermann C. Endotoxin evaluation of eleven lipopolysaccharides by whole blood assay does not always correlate with Limulus amoebocyte lysate assay. *J Endotoxin Res.* 2006;12: 171–180. doi:10.1179/096805106X102156
59. Gutschmann T, Howe J, Zähringer U, Garidel P, Schromm AB, Koch MHJ, et al. Structural prerequisites for endotoxic activity in the Limulus test as compared to cytokine production in mononuclear cells. *Innate Immun.* 2010;16: 39–47. doi:10.1177/1753425909106447
60. Eperon S, De Groote D, Werner-Felmayer G, Jungi TW. Human monocytoïd cell lines as indicators of endotoxin: comparison with rabbit pyrogen and Limulus amoebocyte lysate assay. *J Immunol Methods.* 1997;207: 135–145.
61. Tsai CM, Frasch CE. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 1982;119: 115–119.
62. Caroff M, Chaby R, Karibian D, Perry J, Deprun C, Szabó L. Variations in the carbohydrate regions of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides: electrophoretic, serological, and structural features. *J Bacteriol.* 1990;172: 1121–1128.

63. Le Blay K, Gueirard P, Guiso N, Chaby R. Antigenic polymorphism of the lipopolysaccharides from human and animal isolates of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol Read Engl*. 1997;143 (Pt 4): 1433–1441. doi:10.1099/00221287-143-4-1433
64. Freitag R, Fix M, Brüggemann O. Analysis of endotoxins by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 1997;18: 1899–1905. doi:10.1002/elps.1150181028
65. Le Dur A, Chaby R, Szabó L. Isolation of two protein-free and chemically different lipopolysaccharides from *Bordetella pertussis* phenol-extracted endotoxin. *J Bacteriol*. 1980;143: 78–88.
66. Carty CL, Gehring U, Cyrus J, Bischof W, Heinrich J. Seasonal variability of endotoxin in ambient fine particulate matter. *J Environ Monit JEM*. 2003;5: 953–958.
67. Lane SR, Nicholls PJ, Sewell RDE. The measurement and health impact of endotoxin contamination in organic dusts from multiple sources: focus on the cotton industry. *Inhal Toxicol*. 2004;16: 217–229. doi:10.1080/08958370490277164
68. Rylander R. Endotoxin in the environment--exposure and effects. *J Endotoxin Res*. 2002;8: 241–252. doi:10.1179/096805102125000452
69. Cavagna G, Foà V, Vigliani EC. Effects in man and rabbits of inhalation of cotton dust or extracts and purified endotoxins. *Br J Ind Med*. 1969;26: 314–321.
70. Douwes J, Wouters I, Dubbeld H, van Zwieten L, Steerenberg P, Doekes G, et al. Upper airway inflammation assessed by nasal lavage in compost workers: A relation with bio-aerosol exposure. *Am J Ind Med*. 2000;37: 459–468.
71. Hasday JD, Bascom R, Costa JJ, Fitzgerald T, Dubin W. Bacterial endotoxin is an active component of cigarette smoke. *Chest*. 1999;115: 829–835.
72. Sandström T, Bjermer L, Rylander R. Lipopolysaccharide (LPS) inhalation in healthy subjects increases neutrophils, lymphocytes and fibronectin levels in bronchoalveolar lavage fluid. *Eur Respir J*. 1992;5: 992–996.
73. Kitz R, Rose MA, Borgmann A, Schubert R, Zielen S. Systemic and bronchial inflammation following LPS inhalation in asthmatic and healthy subjects. *J Endotoxin Res*. 2006;12: 367–374. doi:10.1179/096805106X153934
74. Zielen S, Trischler J, Schubert R. Lipopolysaccharide challenge: immunological effects and safety in humans. *Expert Rev Clin Immunol*. 2015;11: 409–418. doi:10.1586/1744666X.2015.1012158
75. Moreira APB, Texeira TFS, Ferreira AB, Peluzio M do CG, Alfenas R de CG. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br J Nutr*. 2012;108: 801–809. doi:10.1017/S0007114512001213
76. Burcelin R, Luche E, Serino M, Amar J. The gut microbiota ecology: a new opportunity for the treatment of metabolic diseases? *Front Biosci Landmark Ed*. 2009;14: 5107–5117.
77. Camus G, Poortmans J, Nys M, Deby-Dupont G, Duchateau J, Deby C, et al. Mild endotoxaemia and the inflammatory response induced by a marathon race. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 1997;92: 415–422.
78. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol*. 1999;473: 11–30.

79. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *J Med*. 1992;23: 217–244.
80. Bein A, Zilbershtein A, Golosovsky M, Davidov D, Schwartz B. LPS Induces Hyper-Permeability of Intestinal Epithelial Cells. *J Cell Physiol*. 2017;232: 381–390. doi:10.1002/jcp.25435
81. Guo S, Al-Sadi R, Said HM, Ma TY. Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. *Am J Pathol*. 2013;182: 375–387. doi:10.1016/j.ajpath.2012.10.014
82. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56: 1761–1772. doi:10.2337/db06-1491
83. Boutagy NE, McMillan RP, Frisard MI, Hulver MW. Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? *Biochimie*. 2016;124: 11–20. doi:10.1016/j.biochi.2015.06.020
84. Bommer J, Becker KP, Urbaschek R. Potential transfer of endotoxin across high-flux polysulfone membranes. *J Am Soc Nephrol JASN*. 1996;7: 883–888.
85. Trautmann M, Zauser B, Wiedeck H, Buttenschön K, Marre R. Bacterial colonization and endotoxin contamination of intravenous infusion fluids. *J Hosp Infect*. 1997;37: 225–236. doi:10.1016/S0195-6701(97)90251-6
86. Lipscomb IP, Sihota AK, Keevil CW. Comparative Study of Surgical Instruments from Sterile-Service Departments for Presence of Residual Gram-Negative Endotoxin and Proteinaceous Deposits. *J Clin Microbiol*. 2006;44: 3728–3733. doi:10.1128/JCM.01280-06
87. Ravikumar M, Hageman DJ, Tomaszewski WH, Chandra GM, Skousen JL, Capadona JR. The effect of residual endotoxin contamination on the neuroinflammatory response to sterilized intracortical microelectrodes. *J Mater Chem B*. 2014;2: 2517–2529. doi:10.1039/C3TB21453B
88. Gautier T, Lagrost L. Plasma PLTP (phospholipid-transfer protein): an emerging role in “reverse lipopolysaccharide transport” and innate immunity. *Biochem Soc Trans*. 2011;39: 984–988. doi:10.1042/BST0390984
89. Azzam KM, Fessler MB. Crosstalk Between Reverse Cholesterol Transport and Innate Immunity. *Trends Endocrinol Metab*. 2012;23: 169–178. doi:10.1016/j.tem.2012.02.001
90. Kirschning CJ, Au-Young J, Lamping N, Reuter D, Pfeil D, Seilhamer JJ, et al. Similar organization of the lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and phospholipid transfer protein (PLTP) genes suggests a common gene family of lipid-binding proteins. *Genomics*. 1997;46: 416–425. doi:10.1006/geno.1997.5030
91. Levels JHM, Marquart JA, Abraham PR, van den Ende AE, Molhuizen HOF, van Deventer SJH, et al. Lipopolysaccharide is transferred from high-density to low-density lipoproteins by lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein. *Infect Immun*. 2005;73: 2321–2326. doi:10.1128/IAI.73.4.2321-2326.2005
92. Hailman E, Albers JJ, Wolfbauer G, Tu AY, Wright SD. Neutralization and transfer of lipopolysaccharide by phospholipid transfer protein. *J Biol Chem*. 1996;271: 12172–12178.
93. Emancipator K, Csako G, Elin RJ. In vitro inactivation of bacterial endotoxin by human lipoproteins and apolipoproteins. *Infect Immun*. 1992;60: 596–601.

94. Carey FJ, Braude AI, Zalesky M. STUDIES WITH RADIOACTIVE ENDOTOXIN. III. THE EFFECT OF TOLERANCE ON THE DISTRIBUTION OF RADIOACTIVITY AFTER INTRAVENOUS INJECTION OF ESCHERICHIA COLI ENDOTOXIN LABELED WITH CR511. *J Clin Invest.* 1958;37: 441–457.
95. Herring WB, Herion JC, Walker RI, Palmer JG. Distribution and clearance of circulating endotoxin. *J Clin Invest.* 1963;42: 79–87. doi:10.1172/JCI104698
96. Freudenberg MA, Freudenberg N, Galanos C. Time course of cellular distribution of endotoxin in liver, lungs and kidneys of rats. *Br J Exp Pathol.* 1982;63: 56–65.
97. Freudenberg N, Freudenberg MA, Bandara K, Galanos C. Distribution and localization of endotoxin in the reticulo-endothelial system (RES) and in the main vessels of the rat during shock. *Pathol Res Pract.* 1985;179: 517–527. doi:10.1016/S0344-0338(85)80193-X
98. Mimura Y, Sakisaka S, Harada M, Sata M, Tanikawa K. Role of hepatocytes in direct clearance of lipopolysaccharide in rats. *Gastroenterology.* 1995;109: 1969–1976.
99. Bertók L. Physico-chemical defense of vertebrate organisms: the role of bile acids in defense against bacterial endotoxins. *Perspect Biol Med.* 1977;21: 70–76.
100. Bertók L. Effect of bile acids on endotoxin in vitro and in vivo (physico-chemical defense). Bile deficiency and endotoxin translocation. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;851: 408–410.
101. Sipka S, Bruckner G. The immunomodulatory role of bile acids. *Int Arch Allergy Immunol.* 2014;165: 1–8. doi:10.1159/000366100
102. Lüderitz O, Galanos C, Lehmann V, Nurminen M, Rietschel ET, Rosenfelder G, et al. Lipid A: chemical structure and biological activity. *J Infect Dis.* 1973;128: Suppl:17-29.
103. Galanos C, Lüderitz O, Rietschel ET, Westphal O, Brade H, Brade L, et al. Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur J Biochem.* 1985;148: 1–5.
104. Tanamoto K, Zähringer U, McKenzie GR, Galanos C, Rietschel ET, Lüderitz O, et al. Biological activities of synthetic lipid A analogs: pyrogenicity, lethal toxicity, anticomplement activity, and induction of gelation of *Limulus amoebocyte* lysate. *Infect Immun.* 1984;44: 421–426.
105. Jerala R. Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol IJMM.* 2007;297: 353–363. doi:10.1016/j.ijmm.2007.04.001
106. Schumann RR, Leong SR, Flagg GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, et al. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science.* 1990;249: 1429–1431.
107. Myc A, Buck J, Gonin J, Reynolds B, Hammerling U, Emanuel D. The level of lipopolysaccharide-binding protein is significantly increased in plasma in patients with the systemic inflammatory response syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997;4: 113–116.
108. Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med.* 1994;179: 269–277.
109. Labeta MO, Durieux JJ, Fernandez N, Herrmann R, Ferrara P. Release from a human monocyte-like cell line of two different soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14. *Eur J Immunol.* 1993;23: 2144–2151. doi:10.1002/eji.1830230915

110. Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Bazil V, Espevik T, et al. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med.* 1992;176: 1665–1671.
111. Tobias PS, Soldau K, Gegner JA, Mintz D, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem.* 1995;270: 10482–10488.
112. Thomas CJ, Kapoor M, Sharma S, Bausinger H, Zyilan U, Lipsker D, et al. Evidence of a trimolecular complex involving LPS, LPS binding protein and soluble CD14 as an effector of LPS response. *FEBS Lett.* 2002;531: 184–188.
113. Haziot A, Ferrero E, Köntgen F, Hijiya N, Yamamoto S, Silver J, et al. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity.* 1996;4: 407–414.
114. Wurfel MM, Monks BG, Ingalls RR, Dedrick RL, Delude R, Zhou D, et al. Targeted deletion of the lipopolysaccharide (LPS)-binding protein gene leads to profound suppression of LPS responses ex vivo, whereas in vivo responses remain intact. *J Exp Med.* 1997;186: 2051–2056.
115. Dziarski R. Cell-bound albumin is the 70-kDa peptidoglycan-, lipopolysaccharide-, and lipoteichoic acid-binding protein on lymphocytes and macrophages. *J Biol Chem.* 1994;269: 20431–20436.
116. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1999;162: 3749–3752.
117. Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol.* 2002;3: 667–672. doi:10.1038/ni809
118. Gangloff M, Gay NJ. MD-2: the Toll “gatekeeper” in endotoxin signalling. *Trends Biochem Sci.* 2004;29: 294–300. doi:10.1016/j.tibs.2004.04.008
119. Gruber A, Mancek M, Wagner H, Kirschning CJ, Jerala R. Structural model of MD-2 and functional role of its basic amino acid clusters involved in cellular lipopolysaccharide recognition. *J Biol Chem.* 2004;279: 28475–28482. doi:10.1074/jbc.M400993200
120. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi B-S, Lee H, Lee J-O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature.* 2009;458: 1191–1195. doi:10.1038/nature07830
121. Bryant CE, Spring DR, Gangloff M, Gay NJ. The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8: 8–14. doi:10.1038/nrmicro2266
122. Pålsson-McDermott EM, O’Neill LAJ. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology.* 2004;113: 153–162. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01976.x
123. Kagan JC, 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.* 2008;9: 361–368. doi:10.1038/ni1569
124. Tanimura N, Saitoh S, Matsumoto F, Akashi-Takamura S, Miyake K. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;368: 94–99. doi:10.1016/j.bbrc.2008.01.061

125. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 2003;301: 640–643. doi:10.1126/science.1087262
126. Björkbacka H, Fitzgerald KA, Huet F, Li X, Gregory JA, Lee MA, et al. The induction of macrophage gene expression by LPS predominantly utilizes Myd88-independent signaling cascades. *Physiol Genomics*. 2004;19: 319–330. doi:10.1152/physiolgenomics.00128.2004
127. Takayama K, Qureshi N, Ribic E, Cantrell JL. Separation and characterization of toxic and nontoxic forms of lipid A. *Rev Infect Dis*. 1984;6: 439–443.
128. Casella CR, Mitchell TC. Inefficient TLR4/MD-2 Heterotetramerization by Monophosphoryl Lipid A. *PLOS ONE*. 2013;8: e62622. doi:10.1371/journal.pone.0062622
129. Apicella MA. Lipid A Is More than Acyl Chains. *Infect Immun*. 2014;82: 2160–2161. doi:10.1128/IAI.01830-14
130. Brandenburg K, Schromm AB, Koch MH, Seydel U. Conformation and fluidity of endotoxins as determinants of biological activity. *Prog Clin Biol Res*. 1995;392: 167–182.
131. Stöver AG, Da Silva Correia J, Evans JT, Cluff CW, Elliott MW, Jeffery EW, et al. Structure-activity relationship of synthetic toll-like receptor 4 agonists. *J Biol Chem*. 2004;279: 4440–4449. doi:10.1074/jbc.M310760200
132. Pedron T, Girard R, Eustache J, Bulusu AR, Macher I, Radzyner-Vyplel H, et al. New synthetic analogs of lipid A as lipopolysaccharide agonists or antagonists of B lymphocyte activation. *Int Immunol*. 1992;4: 533–540.
133. Kumazawa Y, Nakatsuka M, Takimoto H, Furuya T, Nagumo T, Yamamoto A, et al. Importance of fatty acid substituents of chemically synthesized lipid A-subunit analogs in the expression of immunopharmacological activity. *Infect Immun*. 1988;56: 149–155.
134. Bäckhed F, Normark S, Schweda EKH, Oscarson S, Richter-Dahlfors A. Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications. *Microbes Infect*. 2003;5: 1057–1063. doi:10.1016/S1286-4579(03)00207-7
135. Somerville JE, Cassiano L, Bainbridge B, Cunningham MD, Darveau RP. A novel *Escherichia coli* lipid A mutant that produces an antiinflammatory lipopolysaccharide. *J Clin Invest*. 1996;97: 359–365. doi:10.1172/JCI118423
136. Khan SA, Everest P, Servos S, Foxwell N, Zähringer U, Brade H, et al. A lethal role for lipid A in *Salmonella* infections. *Mol Microbiol*. 1998;29: 571–579.
137. Feist W, Ulmer AJ, Wang MH, Musehold J, Schlüter C, Gerdes J, et al. Modulation of lipopolysaccharide-induced production of tumor necrosis factor, interleukin 1, and interleukin 6 by synthetic precursor Ia of lipid A. *FEMS Microbiol Immunol*. 1992;4: 73–89.
138. Zähringer U, Salvetzki R, Wagner F, Lindner B, Ulmer AJ. Structural and biological characterisation of a novel tetra-acyl lipid A from *Escherichia coli* F515 lipopolysaccharide acting as endotoxin antagonist in human monocytes. *J Endotoxin Res*. 2001;7: 133–146.
139. Ding HF, Nakoneczna I, Hsu HS. Protective immunity induced in mice by detoxified salmonella lipopolysaccharide. *J Med Microbiol*. 1990;31: 95–102. doi:10.1099/00222615-31-2-95

140. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Ulmer AJ, Holst O, Brade H, et al. The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiology*. 1993;187: 169–190. doi:10.1016/S0171-2985(11)80338-4
141. Seydel U, Oikawa M, Fukase K, Kusumoto S, Brandenburg K. Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity. *Eur J Biochem*. 2000;267: 3032–3039.
142. Duerr CU, Zenk SF, Chassin C, Pott J, Gütle D, Hensel M, et al. O-antigen delays lipopolysaccharide recognition and impairs antibacterial host defense in murine intestinal epithelial cells. *PLoS Pathog*. 2009;5: e1000567. doi:10.1371/journal.ppat.1000567
143. Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2002;3: 1033–1040. doi:10.1038/ni1102-1033
144. Bustin M. Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci*. 2001;26: 152–153.
145. Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, et al. HMGB1 in health and disease. *Mol Aspects Med*. 2014;40: 1–116. doi:10.1016/j.mam.2014.05.001
146. Ferrari S, Ronfani L, Calogero S, Bianchi ME. The mouse gene coding for high mobility group 1 protein (HMG1). *J Biol Chem*. 1994;269: 28803–28808.
147. Gariboldi M, De Gregorio L, Ferrari S, Manenti G, Pierotti MA, Bianchi ME, et al. Mapping of the Hmg1 gene and of seven related sequences in the mouse. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc*. 1995;6: 581–585.
148. Bustin M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol*. 1999;19: 5237–5246.
149. Aizawa S, Nishino H, Saito K, Kimura K, Shirakawa H, Yoshida M. Stimulation of transcription in cultured cells by high mobility group protein 1: essential role of the acidic carboxyl-terminal region. *Biochemistry (Mosc)*. 1994;33: 14690–14695.
150. Stott K, Watson M, Howe FS, Grossmann JG, Thomas JO. Tail-mediated collapse of HMGB1 is dynamic and occurs via differential binding of the acidic tail to the A and B domains. *J Mol Biol*. 2010;403: 706–722. doi:10.1016/j.jmb.2010.07.045
151. Blair RH, Horn AE, Pazhani Y, Grado L, Goodrich JA, Kugel JF. The HMGB1 C-Terminal Tail Regulates DNA Bending. *J Mol Biol*. 2016;428: 4060–4072. doi:10.1016/j.jmb.2016.08.018
152. Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, et al. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J*. 2003;22: 5551–5560. doi:10.1093/emboj/cdg516
153. Youn JH, Shin J-S. Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006;177: 7889–7897.
154. Ito I, Fukazawa J, Yoshida M. Post-translational methylation of high mobility group box 1 (HMGB1) causes its cytoplasmic localization in neutrophils. *J Biol Chem*. 2007;282: 16336–16344. doi:10.1074/jbc.M608467200

155. Tang D, Kang R, Xiao W, Wang H, Calderwood SK, Xiao X. The anti-inflammatory effects of heat shock protein 72 involve inhibition of high-mobility-group box 1 release and proinflammatory function in macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007;179: 1236–1244.
156. Antoine DJ, Harris HE, Andersson U, Tracey KJ, Bianchi ME. A Systematic Nomenclature for the Redox States of High Mobility Group Box (HMGB) Proteins. *Mol Med*. 2014;20: 135–137. doi:10.2119/molmed.2014.00022
157. Venereau E, Casalgrandi M, Schiraldi M, Antoine DJ, Cattaneo A, De Marchis F, et al. Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J Exp Med*. 2012;209: 1519–1528. doi:10.1084/jem.20120189
158. Liu A, Fang H, Dirsch O, Jin H, Dahmen U. Oxidation of HMGB1 causes attenuation of its pro-inflammatory activity and occurs during liver ischemia and reperfusion. *PloS One*. 2012;7: e35379. doi:10.1371/journal.pone.0035379
159. Li J, Kokkola R, Tabibzadeh S, Yang R, Ochani M, Qiang X, et al. Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1. *Mol Med Camb Mass*. 2003;9: 37–45.
160. Yang H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, Wang H, Ochani M, Li J, et al. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107: 11942–11947. doi:10.1073/pnas.1003893107
161. Yang H, Lundbäck P, Ottosson L, Erlandsson-Harris H, Venereau E, Bianchi ME, et al. Redox Modification of Cysteine Residues Regulates the Cytokine Activity of High Mobility Group Box-1 (HMGB1). *Mol Med*. 2011;18: 250–259. doi:10.2119/molmed.2011.00389
162. Hoppe G, Talcott KE, Bhattacharya SK, Crabb JW, Sears JE. Molecular basis for the redox control of nuclear transport of the structural chromatin protein Hmgb1. *Exp Cell Res*. 2006;312: 3526–3538. doi:10.1016/j.yexcr.2006.07.020
163. Stros M, Reich J, Kolíbalová A. Calcium binding to HMG1 protein induces DNA looping by the HMG-box domains. *FEBS Lett*. 1994;344: 201–206.
164. Sheflin LG, Fucile NW, Spaulding SW. The specific interactions of HMG 1 and 2 with negatively supercoiled DNA are modulated by their acidic C-terminal domains and involve cysteine residues in their HMG 1/2 boxes. *Biochemistry (Mosc)*. 1993;32: 3238–3248.
165. Park S, Lippard SJ. Redox state-dependent interaction of HMGB1 and cisplatin-modified DNA. *Biochemistry (Mosc)*. 2011;50: 2567–2574. doi:10.1021/bi2000214
166. Huan Yang, Wang H, Chavan SS, Andersson U. High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1): The Prototypical Endogenous Danger Molecule. *Mol Med*. 2015;21: S6–S12. doi:10.2119/molmed.2015.00087
167. Bustin M, Neihart NK. Antibodies against chromosomal HMG proteins stain the cytoplasm of mammalian cells. *Cell*. 1979;16: 181–189.
168. Isackson PJ, Bidney DL, Reeck GR, Neihart NK, Bustin M. High mobility group chromosomal proteins isolated from nuclei and cytosol of cultured hepatoma cells are similar. *Biochemistry (Mosc)*. 1980;19: 4466–4471.

169. Kuehl L, Salmond B, Tran L. Concentrations of high-mobility-group proteins in the nucleus and cytoplasm of several rat tissues. *J Cell Biol.* 1984;99: 648–654.
170. Calogero S, Grassi F, Aguzzi A, Voigtländer T, Ferrier P, Ferrari S, et al. The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat Genet.* 1999;22: 276–280. doi:10.1038/10338
171. Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol.* 2010;12: 823–830. doi:10.1038/ncb0910-823
172. Tang D, Kang R, Livesey KM, Zeh HJ, Lotze MT. High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Activates an Autophagic Response to Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15: 2185–2195. doi:10.1089/ars.2010.3666
173. Tang D, Kang R, Livesey KM, Cheh C-W, Farkas A, Loughran P, et al. Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J Cell Biol.* 2010;190: 881–892. doi:10.1083/jcb.200911078
174. Foglio E, Puddighinu G, Germani A, Russo MA, Limana F. HMGB1 Inhibits Apoptosis Following MI and Induces Autophagy via mTORC1 Inhibition. *J Cell Physiol.* 2016; doi:10.1002/jcp.25576
175. Brezniceanu ML, Völp K, Bösser S, Solbach C, Lichter P, Joos S, et al. HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2003;17: 1295–1297.
176. Park JS, Arcaroli J, Yum H-K, Yang H, Wang H, Yang K-Y, et al. Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2003;284: C870–C879. doi:10.1152/ajpcell.00322.2002
177. Rouhiainen A, Imai S, Rauvala H, Parkkinen J. Occurrence of amphoterin (HMG1) as an endogenous protein of human platelets that is exported to the cell surface upon platelet activation. *Thromb Haemost.* 2000;84: 1087–1094.
178. Merenmies J, Pihlaskari R, Laitinen J, Wartiovaara J, Rauvala H. 30-kDa heparin-binding protein of brain (amphoterin) involved in neurite outgrowth. Amino acid sequence and localization in the filopodia of the advancing plasma membrane. *J Biol Chem.* 1991;266: 16722–16729.
179. Gauley J, Pisetsky DS. The translocation of HMGB1 during cell activation and cell death. *Autoimmunity.* 2009;42: 299–301.
180. Semino C, Angelini G, Poggi A, Rubartelli A. NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1. *Blood.* 2005;106: 609–616. doi:10.1182/blood-2004-10-3906
181. Wang H, Vishnubhakat JM, Bloom O, Zhang M, Ombrellino M, Sama A, et al. Proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor and interleukin 1) stimulate release of high mobility group protein-1 by pituicytes. *Surgery.* 1999;126: 389–392.
182. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science.* 1999;285: 248–251.
183. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol.* 2005;5: 331–342. doi:10.1038/nri1594

184. Kim YH, Kwak MS, Park JB, Lee S-A, Choi JE, Cho H-S, et al. N-linked glycosylation plays a crucial role in the secretion of HMGB1. *J Cell Sci.* 2016;129: 29–38. doi:10.1242/jcs.176412
185. Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, et al. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep.* 2002;3: 995–1001. doi:10.1093/embo-reports/kvf198
186. Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Wilkman E, Pakkanen J, Stenfors J, Tuominen RK, et al. Regulation of monocyte migration by amphoterin (HMGB1). *Blood.* 2004;104: 1174–1182. doi:10.1182/blood-2003-10-3536
187. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* 2010;140: 821–832. doi:10.1016/j.cell.2010.01.040
188. Lamkanfi M, Sarkar A, Vande Walle L, Vitari AC, Amer AO, Wewers MD, et al. Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2010;185: 4385–4392. doi:10.4049/jimmunol.1000803
189. Nyström S, Antoine DJ, Lundbäck P, Lock JG, Nita AF, Högstrand K, et al. TLR activation regulates damage-associated molecular pattern isoforms released during pyroptosis. *EMBO J.* 2013;32: 86–99. doi:10.1038/emboj.2012.328
190. Raucci A, Palumbo R, Bianchi ME. HMGB1: A signal of necrosis. *Autoimmunity.* 2007;40: 285–289. doi:10.1080/08916930701356978
191. Schiller M, Heyder P, Ziegler S, Niessen A, Claßen L, Lauffer A, et al. During apoptosis HMGB1 is translocated into apoptotic cell-derived membranous vesicles. *Autoimmunity.* 2013;46: 342–346. doi:10.3109/08916934.2012.750302
192. Kazama H, Ricci J-E, Herndon JM, Hoppe G, Green DR, Ferguson TA. IMMUNE TOLERANCE INDUCTION BY APOPTOTIC CELLS REQUIRES CASPASE-DEPENDENT OXIDATION OF HMGB1. *Immunity.* 2008;29: 21–32. doi:10.1016/j.immuni.2008.05.013
193. Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombetti S, Mondino A, et al. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J Cell Biol.* 2004;164: 441–449. doi:10.1083/jcb.200304135
194. Galvez BG, Sampaolesi M, Brunelli S, Covarello D, Gavina M, Rossi B, et al. Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability. *J Cell Biol.* 2006;174: 231–243. doi:10.1083/jcb.200512085
195. Messmer D, Yang H, Telusma G, Knoll F, Li J, Messmer B, et al. High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2004;173: 307–313.
196. Dumitriu IE, Baruah P, Valentinis B, Voll RE, Herrmann M, Nawroth PP, et al. Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2005;174: 7506–7515.
197. Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, Valentinis B, Catalanotti F, Giazzon M, et al. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep.* 2004;5: 825–830. doi:10.1038/sj.embor.7400205

198. Schlueter C, Weber H, Meyer B, Rogalla P, Röser K, Hauke S, et al. Angiogenetic signaling through hypoxia: HMGB1: an angiogenetic switch molecule. *Am J Pathol.* 2005;166: 1259–1263. doi:10.1016/S0002-9440(10)62344-9
199. Chavakis E, Hain A, Vinci M, Carmona G, Bianchi ME, Vajkoczy P, et al. High-mobility group box 1 activates integrin-dependent homing of endothelial progenitor cells. *Circ Res.* 2007;100: 204–212. doi:10.1161/01.RES.0000257774.55970.f4
200. Mitola S, Belleri M, Urbinati C, Coltrini D, Sparatore B, Pedrazzi M, et al. Cutting edge: extracellular high mobility group box-1 protein is a proangiogenic cytokine. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2006;176: 12–15.
201. Yang S, Xu L, Yang T, Wang F. High-mobility group box-1 and its role in angiogenesis. *J Leukoc Biol.* 2014;95: 563–574. doi:10.1189/jlb.0713412
202. Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, et al. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature.* 2000;405: 354–360. doi:10.1038/35012626
203. Huttunen HJ, Fages C, Kuja-Panula J, Ridley AJ, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis. *Cancer Res.* 2002;62: 4805–4811.
204. Limana F, Germani A, Zacheo A, Kajstura J, Di Carlo A, Borsellino G, et al. Exogenous high-mobility group box 1 protein induces myocardial regeneration after infarction via enhanced cardiac C-kit+ cell proliferation and differentiation. *Circ Res.* 2005;97: e73-83. doi:10.1161/01.RES.0000186276.06104.04
205. Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 Is a Therapeutic Target for Sterile Inflammation and Infection. *Annu Rev Immunol.* 2011;29: 139–162. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101323
206. Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, et al. The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Is a Cellular Binding Site for Amphoterin MEDIATION OF NEURITE OUTGROWTH AND CO-EXPRESSION OF RAGE AND AMPHOTERIN IN THE DEVELOPING NERVOUS SYSTEM. *J Biol Chem.* 1995;270: 25752–25761. doi:10.1074/jbc.270.43.25752
207. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med.* 2007;13: 1050–1059. doi:10.1038/nm1622
208. Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim J-Y, Strassheim D, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290: C917-924. doi:10.1152/ajpcell.00401.2005
209. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim J-Y, Strassheim D, Ishizaka A, et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem.* 2004;279: 7370–7377. doi:10.1074/jbc.M306793200
210. Ivanov S, Dragoi A-M, Wang X, Dallacosta C, Louten J, Musco G, et al. A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood.* 2007;110: 1970–1981. doi:10.1182/blood-2006-09-044776

211. Yanai H, Ban T, Wang Z, Choi MK, Kawamura T, Negishi H, et al. HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature*. 2009;462: 99–103. doi:10.1038/nature08512
212. Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, Billiar TR, Tsung A. HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol Med Camb Mass*. 2008;14: 476–484. doi:10.2119/2008-00034.Klune
213. Ibrahim ZA, Armour CL, Phipps S, Sukkar MB. RAGE and TLRs: Relatives, friends or neighbours? *Mol Immunol*. 2013;56: 739–744. doi:10.1016/j.molimm.2013.07.008
214. Luan Z-G, Zhang H, Yang P-T, Ma X-C, Zhang C, Guo R-X. HMGB1 activates nuclear factor- κ B signaling by RAGE and increases the production of TNF- α in human umbilical vein endothelial cells. *Immunobiology*. 2010;215: 956–962. doi:10.1016/j.imbio.2009.11.001
215. Lv B, Wang H, Tang Y, Fan Z, Xiao X, Chen F. High-mobility group box 1 protein induces tissue factor expression in vascular endothelial cells via activation of NF- κ B and Egr-1. *Thromb Haemost*. 2009;102: 352–359. doi:10.1160/TH08-11-0759
216. Weber DJ, Allette YM, Wilkes DS, White FA. The HMGB1-RAGE Inflammatory Pathway: Implications for Brain Injury-Induced Pulmonary Dysfunction. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23: 1316–1328. doi:10.1089/ars.2015.6299
217. Liang Y, Hou C, Kong J, Wen H, Zheng X, Wu L, et al. HMGB1 binding to receptor for advanced glycation end products enhances inflammatory responses of human bronchial epithelial cells by activating p38 MAPK and ERK1/2. *Mol Cell Biochem*. 2015;405: 63–71. doi:10.1007/s11010-015-2396-0
218. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med*. 2000;192: 565–570.
219. Zetterström CK, Bergman T, Rynnel-Dagöö B, Erlandsson Harris H, Soder O, Andersson U, et al. High mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB1) is an antibacterial factor produced by the human adenoid. *Pediatr Res*. 2002;52: 148–154. doi:10.1203/00006450-200208000-00004
220. Wang F-C, Pei J-X, Zhu J, Zhou N-J, Liu D-S, Xiong H-F, et al. Overexpression of HMGB1 A-box reduced lipopolysaccharide-induced intestinal inflammation via HMGB1/TLR4 signaling in vitro. *World J Gastroenterol*. 2015;21: 7764–7776. doi:10.3748/wjg.v21.i25.7764
221. Gong Q, Xu J-F, Yin H, Liu S-F, Duan L-H, Bian Z-L. Protective effect of antagonist of high-mobility group box 1 on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Scand J Immunol*. 2009;69: 29–35. doi:10.1111/j.1365-3083.2008.02194.x
222. Gong W, Zheng Y, Chao F, Li Y, Xu Z, Huang G, et al. The anti-inflammatory activity of HMGB1 A box is enhanced when fused with C-terminal acidic tail. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010: 915234. doi:10.1155/2010/915234
223. Hreggvidsdottir HS, Ostberg T, Wähämaa H, Schierbeck H, Aveberger A-C, Klevenvall L, et al. The alarmin HMGB1 acts in synergy with endogenous and exogenous danger signals to promote inflammation. *J Leukoc Biol*. 2009;86: 655–662. doi:10.1189/jlb.0908548
224. Bianchi ME. HMGB1 loves company. *J Leukoc Biol*. 2009;86: 573–576. doi:10.1189/jlb.1008585

225. He Z-W, Qin Y-H, Wang Z-W, Chen Y, Shen Q, Dai S-M. HMGB1 acts in synergy with lipopolysaccharide in activating rheumatoid synovial fibroblasts via p38 MAPK and NF- κ B signaling pathways. *Mediators Inflamm.* 2013;2013: 596716. doi:10.1155/2013/596716
226. Qin Y-H, Dai S-M, Tang G-S, Zhang J, Ren D, Wang Z-W, et al. HMGB1 enhances the proinflammatory activity of lipopolysaccharide by promoting the phosphorylation of MAPK p38 through receptor for advanced glycation end products. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2009;183: 6244–6250. doi:10.4049/jimmunol.0900390
227. Youn JH, Oh YJ, Kim ES, Choi JE, Shin J-S. High Mobility Group Box 1 Protein Binding to Lipopolysaccharide Facilitates Transfer of Lipopolysaccharide to CD14 and Enhances Lipopolysaccharide-Mediated TNF- α Production in Human Monocytes. *J Immunol.* 2008;180: 5067–5074. doi:10.4049/jimmunol.180.7.5067
228. Kwak MS, Lim M, Lee YJ, Lee HS, Kim YH, Youn JH, et al. HMGB1 Binds to Lipoteichoic Acid and Enhances TNF- α and IL-6 Production through HMGB1-Mediated Transfer of Lipoteichoic Acid to CD14 and TLR2. *J Innate Immun.* 2015;7: 405–416. doi:10.1159/000369972
229. Wang H, Yang H, Czura CJ, Sama AE, Tracey KJ. HMGB1 as a Late Mediator of Lethal Systemic Inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164: 1768–1773. doi:10.1164/ajrccm.164.10.2106117
230. Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101: 296–301. doi:10.1073/pnas.2434651100
231. Tian J, Avalos AM, Mao S-Y, Chen B, Senthil K, Wu H, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol.* 2007;8: 487–496. doi:10.1038/ni1457
232. Sha Y, Zmijewski J, Xu Z, Abraham E. HMGB1 Develops Enhanced Proinflammatory Activity by Binding to Cytokines. *J Immunol.* 2008;180: 2531–2537. doi:10.4049/jimmunol.180.4.2531
233. Schiraldi M, Raucci A, Muñoz LM, Livoti E, Celona B, Venereau E, et al. HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J Exp Med.* 2012;209: 551–563. doi:10.1084/jem.20111739
234. Rouhiainen A, Tumova S, Valmu L, Kalkkinen N, Rauvala H. Pivotal advance: analysis of proinflammatory activity of highly purified eukaryotic recombinant HMGB1 (amphoterin). *J Leukoc Biol.* 2007;81: 49–58. doi:10.1189/jlb.0306200
235. Zimmermann K, Völkel D, Pable S, Lindner T, Kramberger F, Bahrami S, et al. Native versus recombinant high-mobility group B1 proteins: functional activity in vitro. *Inflammation.* 2004;28: 221–229.
236. Li J, Wang H, Mason JM, Levine J, Yu M, Ulloa L, et al. Recombinant HMGB1 with cytokine-stimulating activity. *J Immunol Methods.* 2004;289: 211–223. doi:10.1016/j.jim.2004.04.019
237. Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol.* 1974;84: 389–398.
238. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *drosophila*. *Experientia.* 1962;18: 571–573. doi:10.1007/BF02172188

239. Ritossa FM. Experimental activation of specific loci in polytene chromosomes of *Drosophila*. *Exp Cell Res.* 1964;35: 601–607. doi:10.1016/0014-4827(64)90147-8
240. Pfister G, Strohm CM, Perschinka H, Kind M, Knoflach M, Hinterdorfer P, et al. Detection of HSP60 on the membrane surface of stressed human endothelial cells by atomic force and confocal microscopy. *J Cell Sci.* 2005;118: 1587–1594. doi:10.1242/jcs.02292
241. Jäättelä M. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med.* 1999;31: 261–271.
242. Brocchieri L, Karlin S. Conservation among HSP60 sequences in relation to structure, function, and evolution. *Protein Sci Publ Protein Soc.* 2000;9: 476–486. doi:10.1110/ps.9.3.476
243. Bukau B, Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell.* 1998;92: 351–366.
244. Pockley AG, Muthana M, Calderwood SK. The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trends Biochem Sci.* 2008;33: 71–79. doi:10.1016/j.tibs.2007.10.005
245. Pockley AG, Multhoff G. Cell stress proteins in extracellular fluids: friend or foe? *Novartis Found Symp.* 2008;291: 86-95; discussion 96-100, 137–140.
246. Cheng MY, Hartl F-U, Martin J, Pollock RA, Kalousek F, Neuper W, et al. Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature.* 1989;337: 620–625. doi:10.1038/337620a0
247. Ellis RJ, van der Vies SM. Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem.* 1991;60: 321–347. doi:10.1146/annurev.bi.60.070191.001541
248. Viitanen PV, Gatenby AA, Lorimer GH. Purified chaperonin 60 (groEL) interacts with the nonnative states of a multitude of *Escherichia coli* proteins. *Protein Sci Publ Protein Soc.* 1992;1: 363–369. doi:10.1002/pro.5560010308
249. Goloubinoff P, Gatenby AA, Lorimer GH. GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature.* 1989;337: 44–47. doi:10.1038/337044a0
250. Goloubinoff P, Diamant S, Weiss C, Azem A. GroES binding regulates GroEL chaperonin activity under heat shock. *FEBS Lett.* 1997;407: 215–219.
251. Hunt JF, Weaver AJ, Landry SJ, Gierasch L, Deisenhofer J. The crystal structure of the GroES co-chaperonin at 2.8 Å resolution. *Nature.* 1996;379: 37–45. doi:10.1038/379037a0
252. Nielsen KL, McLennan N, Masters M, Cowan NJ. A single-ring mitochondrial chaperonin (Hsp60-Hsp10) can substitute for GroEL-GroES in vivo. *J Bacteriol.* 1999;181: 5871–5875.
253. Nielsen KL, Cowan NJ. A single ring is sufficient for productive chaperonin-mediated folding in vivo. *Mol Cell.* 1998;2: 93–99.
254. Gupta RS. Sequence and structural homology between a mouse T-complex protein TCP-1 and the “chaperonin” family of bacterial (GroEL, 60-65 kDa heat shock antigen) and eukaryotic proteins. *Biochem Int.* 1990;20: 833–841.
255. Ellis RJ. Molecular Chaperones: The Plant Connection. *Science.* 1990;250: 954–959. doi:10.1126/science.250.4983.954

256. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*. 2009;14: 105–111. doi:10.1007/s12192-008-0068-7
257. Yaffe MB, Farr GW, Miklos D, Horwich AL, Sternlicht ML, Sternlicht H. TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. *Nature*. 1992;358: 245–248. doi:10.1038/358245a0
258. Llorca O, Martín-Benito J, Ritco-Vonsovici M, Grantham J, Hynes GM, Willison KR, et al. Eukaryotic chaperonin CCT stabilizes actin and tubulin folding intermediates in open quasi-native conformations. *EMBO J*. 2000;19: 5971–5979. doi:10.1093/emboj/19.22.5971
259. Dunn AY, Melville MW, Frydman J. Review: Cellular Substrates of the Eukaryotic Chaperonin TRiC/CCT. *J Struct Biol*. 2001;135: 176–184. doi:10.1006/jsbi.2001.4380
260. Yam AY, Xia Y, Lin H-TJ, Burlingame A, Gerstein M, Frydman J. Defining the TRiC/CCT interactome links chaperonin function to stabilization of newly made proteins with complex topologies. *Nat Struct Mol Biol*. 2008;15: 1255–1262. doi:10.1038/nsmb.1515
261. Kubota H, Hynes G, Willison K. The chaperonin containing t-complex polypeptide 1 (TCP-1). Multisubunit machinery assisting in protein folding and assembly in the eukaryotic cytosol. *Eur J Biochem*. 1995;230: 3–16.
262. Balczun C, Bunse A, Schwarz C, Piotrowski M, Kück U. Chloroplast heat shock protein Cpn60 from *Chlamydomonas reinhardtii* exhibits a novel function as a group II intron-specific RNA-binding protein. *FEBS Lett*. 2006;580: 4527–4532. doi:10.1016/j.febslet.2006.07.030
263. Apuya NR, Yadegari R, Fischer RL, Harada JJ, Zimmerman JL, Goldberg RB. The Arabidopsis embryo mutant schlepperless has a defect in the chaperonin-60 α gene. *Plant Physiol*. 2001;126: 717–730.
264. Kaufman BA, Kolesar JE, Perlman PS, Butow RA. A function for the mitochondrial chaperonin Hsp60 in the structure and transmission of mitochondrial DNA nucleoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. 2003;163: 457–461. doi:10.1083/jcb.200306132
265. Czarnecka AM, Campanella C, Zummo G, Cappello F. Heat shock protein 10 and signal transduction: a “capsula eburnea” of carcinogenesis? *Cell Stress Chaperones*. 2006;11: 287–294.
266. Deocaris CC, Kaul SC, Wadhwa R. On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60. *Cell Stress Chaperones*. 2006;11: 116–128.
267. Sigal LH, Williams S, Soltys B, Gupta R. H9724, a monoclonal antibody to *Borrelia burgdorferi*'s flagellin, binds to heat shock protein 60 (HSP60) within live neuroblastoma cells: a potential role for HSP60 in peptide hormone signaling and in an autoimmune pathogenesis of the neuropathy of Lyme disease. *Cell Mol Neurobiol*. 2001;21: 477–495.
268. Gupta RS, Ramachandra NB, Bowes T, Singh B. Unusual cellular disposition of the mitochondrial molecular chaperones Hsp60, Hsp70 and Hsp10. *Novartis Found Symp*. 2008;291: 59-68; discussion 69-73, 137–140.
269. Christensen JH, Nielsen MN, Hansen J, Füchtbauer A, Füchtbauer E-M, West M, et al. Inactivation of the hereditary spastic paraplegia-associated Hspd1 gene encoding the Hsp60 chaperone results in early embryonic lethality in mice. *Cell Stress Chaperones*. 2010;15: 851–863. doi:10.1007/s12192-010-0194-x

270. Magnoni R, Palmfeldt J, Christensen JH, Sand M, Maltecca F, Corydon TJ, et al. Late onset motoneuron disorder caused by mitochondrial Hsp60 chaperone deficiency in mice. *Neurobiol Dis.* 2013;54: 12–23. doi:10.1016/j.nbd.2013.02.012
271. Hansen JJ, Bross P, Westergaard M, Nielsen MN, Eiberg H, Børglum AD, et al. Genomic structure of the human mitochondrial chaperonin genes: HSP60 and HSP10 are localised head to head on chromosome 2 separated by a bidirectional promoter. *Hum Genet.* 2003;112: 71–77. doi:10.1007/s00439-002-0837-9
272. Singh B, Patel HV, Ridley RG, Freeman KB, Gupta RS. Mitochondrial import of the human chaperonin (HSP60) protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;169: 391–396.
273. Itoh H, Komatsuda A, Ohtani H, Wakui H, Imai H, Sawada K-I, et al. Mammalian HSP60 is quickly sorted into the mitochondria under conditions of dehydration. *Eur J Biochem.* 2002;269: 5931–5938.
274. Kotlo K, Xing Y, Lather S, Grillon JM, Johnson K, Skidgel RA, et al. PR65A phosphorylation regulates PP2A complex signaling. *PLoS One.* 2014;9: e85000. doi:10.1371/journal.pone.0085000
275. Tang H, Tian E, Liu C, Wang Q, Deng H. Oxidative stress induces monocyte necrosis with enrichment of cell-bound albumin and overexpression of endoplasmic reticulum and mitochondrial chaperones. *PLoS One.* 2013;8: e59610. doi:10.1371/journal.pone.0059610
276. Leach MD, Stead DA, Argo E, Brown AJP. Identification of sumoylation targets, combined with inactivation of SMT3, reveals the impact of sumoylation upon growth, morphology, and stress resistance in the pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell.* 2011;22: 687–702. doi:10.1091/mbc.E10-07-0632
277. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science.* 2009;325: 834–840. doi:10.1126/science.1175371
278. Peng C, Lu Z, Xie Z, Cheng Z, Chen Y, Tan M, et al. The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme. *Mol Cell Proteomics MCP.* 2011;10: M111.012658. doi:10.1074/mcp.M111.012658
279. Hayoun D, Kapp T, Edri-Brami M, Ventura T, Cohen M, Avidan A, et al. HSP60 is transported through the secretory pathway of 3-MCA-induced fibrosarcoma tumour cells and undergoes N-glycosylation. *FEBS J.* 2012;279: 2083–2095. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08594.x
280. Fenton WA, Kashi Y, Furtak K, Horwich AL. Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature.* 1994;371: 614–619. doi:10.1038/371614a0
281. Sigler PB, Xu Z, Rye HS, Burston SG, Fenton WA, Horwich AL. Structure and function in GroEL-mediated protein folding. *Annu Rev Biochem.* 1998;67: 581–608. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.581
282. Roseman AM, Chen S, White H, Braig K, Saibil HR. The chaperonin ATPase cycle: mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL. *Cell.* 1996;87: 241–251.
283. Murai N, Makino Y, Yoshida M. GroEL locked in a closed conformation by an interdomain cross-link can bind ATP and polypeptide but cannot process further reaction steps. *J Biol Chem.* 1996;271: 28229–28234.

284. Llorca O, Carrascosa JL, Valpuesta JM. Biochemical characterization of symmetric GroEL-GroES complexes. Evidence for a role in protein folding. *J Biol Chem.* 1996;271: 68–76.
285. Jindal S, Dudani AK, Singh B, Harley CB, Gupta RS. Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonins and to the 65-kilodalton mycobacterial antigen. *Mol Cell Biol.* 1989;9: 2279–2283.
286. Vilasi S, Carrotta R, Mangione MR, Campanella C, Librizzi F, Randazzo L, et al. Human Hsp60 with Its Mitochondrial Import Signal Occurs in Solution as Heptamers and Tetradecamers Remarkably Stable over a Wide Range of Concentrations. Pastore A, editor. *PLoS ONE.* 2014;9: e97657. doi:10.1371/journal.pone.0097657
287. Viitanen PV, Lorimer G, Bergmeier W, Weiss C, Kessel M, Goloubinoff P. Purification of mammalian mitochondrial chaperonin 60 through in vitro reconstitution of active oligomers. *Methods Enzymol.* 1998;290: 203–217.
288. David S, Bucchieri F, Corrao S, Czarnecka AM, Campanella C, Farina F, et al. Hsp10: anatomic distribution, functions, and involvement in human disease. *Front Biosci Elite Ed.* 2013;5: 768–778.
289. Levy-Rimler G, Viitanen P, Weiss C, Sharkia R, Greenberg A, Niv A, et al. The effect of nucleotides and mitochondrial chaperonin 10 on the structure and chaperone activity of mitochondrial chaperonin 60. *Eur J Biochem.* 2001;268: 3465–3472.
290. Cong Y, Baker ML, Jakana J, Woolford D, Miller EJ, Reissmann S, et al. 4.0-Å resolution cryo-EM structure of the mammalian chaperonin TRiC/CCT reveals its unique subunit arrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107: 4967–4972. doi:10.1073/pnas.0913774107
291. Frydman J, Nimmesgern E, Erdjument-Bromage H, Wall JS, Tempst P, Hartl FU. Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits. *EMBO J.* 1992;11: 4767–4778.
292. Lin Z, Madan D, Rye HS. GroEL stimulates protein folding through forced unfolding. *Nat Struct Mol Biol.* 2008;15: 303–311. doi:10.1038/nsmb.1394
293. Priya S, Sharma SK, Sood V, Mattoo RUH, Finka A, Azem A, et al. GroEL and CCT are catalytic unfoldases mediating out-of-cage polypeptide refolding without ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110: 7199–7204. doi:10.1073/pnas.1219867110
294. Blondin PA, Kirby RJ, Barnum SR. The heat shock response and acquired thermotolerance in three strains of cyanobacteria. *Curr Microbiol.* 26: 79–84. doi:10.1007/BF01577340
295. Mendoza JA, Rogers E, Lorimer GH, Horowitz PM. Chaperonins facilitate the in vitro folding of monomeric mitochondrial rhodanese. *J Biol Chem.* 1991;266: 13044–13049.
296. Chandra D, Choy G, Tang DG. Cytosolic accumulation of HSP60 during apoptosis with or without apparent mitochondrial release: evidence that its pro-apoptotic or pro-survival functions involve differential interactions with caspase-3. *J Biol Chem.* 2007;282: 31289–31301. doi:10.1074/jbc.M702777200
297. Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO J.* 1999;18: 2040–2048. doi:10.1093/emboj/18.8.2040

298. Lin KM, Lin B, Lian IY, Mestril R, Scheffler IE, Dillmann WH. Combined and Individual Mitochondrial HSP60 and HSP10 Expression in Cardiac Myocytes Protects Mitochondrial Function and Prevents Apoptotic Cell Deaths Induced by Simulated Ischemia-Reoxygenation. *Circulation*. 2001;103: 1787–1792. doi:10.1161/01.CIR.103.13.1787
299. Benjamin CL, Ullrich SE, Kripke ML, Ananthaswamy HN. p53 tumor suppressor gene: a critical molecular target for UV induction and prevention of skin cancer. *Photochem Photobiol*. 2008;84: 55–62. doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00213.x
300. Green DR. At the gates of death. *Cancer Cell*. 2006;9: 328–330. doi:10.1016/j.ccr.2006.05.004
301. Ghosh JC, Dohi T, Kang BH, Altieri DC. Hsp60 Regulation of Tumor Cell Apoptosis. *J Biol Chem*. 2008;283: 5188–5194. doi:10.1074/jbc.M705904200
302. Gupta S, Knowlton AA. Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia, and apoptosis. *Circulation*. 2002;106: 2727–2733.
303. Kim HS, Kim EM, Lee J, Yang WH, Park TY, Kim YM, et al. Heat shock protein 60 modified with O-linked N-acetylglucosamine is involved in pancreatic β -cell death under hyperglycemic conditions. *FEBS Lett*. 2006;580: 2311–2316. doi:10.1016/j.febslet.2006.03.043
304. Ghosh JC, Siegelin MD, Dohi T, Altieri DC. Heat Shock Protein 60 Regulation of the Mitochondrial Permeability Transition Pore in Tumor Cells. *Cancer Res*. 2010;70: 8988–8993. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2225
305. Pace A, Barone G, Lauria A, Martorana A, Piccionello AP, Pierro P, et al. Hsp60, a novel target for antitumor therapy: structure-function features and prospective drugs design. *Curr Pharm Des*. 2013;19: 2757–2764.
306. Cappello F, Conway de Macario E, Marasà L, Zummo G, Macario AJL. Hsp60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy. *Cancer Biol Ther*. 2008;7: 801–809.
307. Chaiwatanasirikul K-A, Sala A. The tumour-suppressive function of CLU is explained by its localisation and interaction with HSP60. *Cell Death Dis*. 2011;2: e219. doi:10.1038/cddis.2011.99
308. Di Felice V, David S, Cappello F, Farina F, Zummo G. Is chlamydial heat shock protein 60 a risk factor for oncogenesis? *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2005;62: 4–9. doi:10.1007/s00018-004-4367-6
309. Cappello F, David S, Rappa F, Bucchieri F, Marasà L, Bartolotta TE, et al. The expression of HSP60 and HSP10 in large bowel carcinomas with lymph node metastase. *BMC Cancer*. 2005;5: 139. doi:10.1186/1471-2407-5-139
310. Wick MC, Mayerl C, Backovic A, van der Zee R, Jaschke W, Dietrich H, et al. In vivo imaging of the effect of LPS on arterial endothelial cells: molecular imaging of heat shock protein 60 expression. *Cell Stress Chaperones*. 2008;13: 275–285. doi:10.1007/s12192-008-0044-2
311. Cicconi R, Delpino A, Piselli P, Castelli M, Vismara D. Expression of 60 kDa heat shock protein (Hsp60) on plasma membrane of Daudi cells. *Mol Cell Biochem*. 259: 1–7. doi:10.1023/B:MCBI.0000021335.52162.51

312. Goh YC, Yap CT, Huang BH, Cronshaw AD, Leung BP, Lai PBS, et al. Heat-shock protein 60 translocates to the surface of apoptotic cells and differentiated megakaryocytes and stimulates phagocytosis. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2011;68: 1581–1592. doi:10.1007/s00018-010-0534-0
313. Lin L, Kim SC, Wang Y, Gupta S, Davis B, Simon SI, et al. HSP60 in heart failure: abnormal distribution and role in cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293: H2238-2247. doi:10.1152/ajpheart.00740.2007
314. Arya RK, Singh A, Yadav NK, Cheruvu SH, Hossain Z, Meena S, et al. Anti-breast tumor activity of Eclipta extract in-vitro and in-vivo: novel evidence of endoplasmic reticulum specific localization of Hsp60 during apoptosis. *Sci Rep*. 2015;5: 18457. doi:10.1038/srep18457
315. Gupta S, Knowlton AA. HSP60 trafficking in adult cardiac myocytes: role of the exosomal pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292: H3052-3056. doi:10.1152/ajpheart.01355.2006
316. Chen W, Wang J, Shao C, Liu S, Yu Y, Wang Q, et al. Efficient induction of antitumor T cell immunity by exosomes derived from heat-shocked lymphoma cells. *Eur J Immunol*. 2006;36: 1598–1607. doi:10.1002/eji.200535501
317. Campanella C, Bucchieri F, Merendino AM, Fucarino A, Burgio G, Corona DFV, et al. The Odyssey of Hsp60 from Tumor Cells to Other Destinations Includes Plasma Membrane-Associated Stages and Golgi and Exosomal Protein-Trafficking Modalities. Metzke K, editor. *PLoS ONE*. 2012;7: e42008. doi:10.1371/journal.pone.0042008
318. Lehnardt S, Schott E, Trimbuch T, Laubisch D, Krueger C, Wulczyn G, et al. A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2008;28: 2320–2331. doi:10.1523/JNEUROSCI.4760-07.2008
319. Shamaei-Tousi A, Steptoe A, O'Donnell K, Palmen J, Stephens JW, Hurel SJ, et al. Plasma heat shock protein 60 and cardiovascular disease risk: the role of psychosocial, genetic, and biological factors. *Cell Stress Chaperones*. 2007;12: 384–392.
320. Pockley AG, Bulmer J, Hanks BM, Wright BH. Identification of human heat shock protein 60 (Hsp60) and anti-Hsp60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals. *Cell Stress Chaperones*. 1999;4: 29–35. doi:10.1054/csac.1998.0121
321. Xu Q. Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22: 1547–1559.
322. Lewthwaite J, Owen N, Coates A, Henderson B, Steptoe A. Circulating human heat shock protein 60 in the plasma of British civil servants: relationship to physiological and psychosocial stress. *Circulation*. 2002;106: 196–201.
323. Zhang X, He M, Cheng L, Chen Y, Zhou L, Zeng H, et al. Elevated heat shock protein 60 levels are associated with higher risk of coronary heart disease in Chinese. *Circulation*. 2008;118: 2687–2693. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.781856
324. Xu Q, Schett G, Perschinka H, Mayr M, Egger G, Oberhollenzer F, et al. Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population. *Circulation*. 2000;102: 14–20.

325. Bassan M, Zamostiano R, Giladi E, Davidson A, Wollman Y, Pitman J, et al. The identification of secreted heat shock 60 -like protein from rat glial cells and a human neuroblastoma cell line. *Neurosci Lett*. 1998;250: 37–40.
326. Terry DF, McCormick M, Andersen S, Pennington J, Schoenhofen E, Palaima E, et al. Cardiovascular disease delay in centenarian offspring: role of heat shock proteins. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1019: 502–505. doi:10.1196/annals.1297.092
327. Rea IM, McNerlan S, Pockley AG. Serum heat shock protein and anti-heat shock protein antibody levels in aging. *Exp Gerontol*. 2001;36: 341–352.
328. Schett G, Metzler B, Kleindienst R, Amberger A, Recheis H, Xu Q, et al. Myocardial injury leads to a release of heat shock protein (hsp) 60 and a suppression of the anti-hsp65 immune response. *Cardiovasc Res*. 1999;42: 685–695.
329. Flohé SB, Brüggemann J, Lendemans S, Nikulina M, Meierhoff G, Flohé S, et al. Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003;170: 2340–2348.
330. Habich C, Burkart V. Heat shock protein 60: regulatory role on innate immune cells. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2007;64: 742–751. doi:10.1007/s00018-007-6413-7
331. Kol A, Bourcier T, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest*. 1999;103: 571–577. doi:10.1172/JCI5310
332. Binder RJ, Vatner R, Srivastava P. The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens*. 2004;64: 442–451. doi:10.1111/j.1399-0039.2004.00299.x
333. Ohashi K, Burkart V, Flohé S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000;164: 558–561.
334. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Häcker H, et al. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem*. 2001;276: 31332–31339. doi:10.1074/jbc.M103217200
335. Märker T, Kriebel J, Wohlrab U, Burkart V, Habich C. Adipocytes from New Zealand obese mice exhibit aberrant proinflammatory reactivity to the stress signal heat shock protein 60. *J Diabetes Res*. 2014;2014: 187153. doi:10.1155/2014/187153
336. Rosenberger K, Dembny P, Derkow K, Engel O, Krüger C, Wolf SA, et al. Intrathecal heat shock protein 60 mediates neurodegeneration and demyelination in the CNS through a TLR4- and MyD88-dependent pathway. *Mol Neurodegener*. 2015;10: 5. doi:10.1186/s13024-015-0003-1
337. Bajramović JJ, Bsibsi M, Geutskens SB, Hassankhan R, Verhulst KC, Stege GJ, et al. Differential expression of stress proteins in human adult astrocytes in response to cytokines. *J Neuroimmunol*. 2000;106: 14–22.
338. Wang Y, Chen L, Hagiwara N, Knowlton AA. Regulation of heat shock protein 60 and 72 expression in the failing heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48: 360–366. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.11.009

339. Cappello F, Caramori G, Campanella C, Vicari C, Gnemmi I, Zanini A, et al. Convergent sets of data from in vivo and in vitro methods point to an active role of Hsp60 in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis. *PLoS One*. 2011;6: e28200. doi:10.1371/journal.pone.0028200
340. Pei W, Tanaka K, Huang SC, Xu L, Liu B, Sinclair J, et al. Extracellular HSP60 triggers tissue regeneration and wound healing by regulating inflammation and cell proliferation. *Npj Regen Med*. 2016;1: 16013. doi:10.1038/npjregenmed.2016.13
341. Aalberse JA, Kapitein B, de Rooij S, Klein MR, de Jager W, van der Zee R, et al. Cord blood CD4+ T cells respond to self heat shock protein 60 (HSP60). *PLoS One*. 2011;6: e24119. doi:10.1371/journal.pone.0024119
342. de Kleer I, Vercoulen Y, Klein M, Meerding J, Albani S, van der Zee R, et al. CD30 discriminates heat shock protein 60-induced FOXP3+ CD4+ T cells with a regulatory phenotype. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010;185: 2071–2079. doi:10.4049/jimmunol.0901901
343. Atre N, Thomas L, Mistry R, Pathak K, Chiplunkar S. Role of nitric oxide in heat shock protein induced apoptosis of gamma delta T cells. *Int J Cancer*. 2006;119: 1368–1376. doi:10.1002/ijc.21966
344. Ohue R, Hashimoto K, Nakamoto M, Furukawa Y, Masuda T, Kitabatake N, et al. Bacterial heat shock protein 60, GroEL, can induce the conversion of naïve T cells into a CD4 CD25(+) Foxp3-expressing phenotype. *J Innate Immun*. 2011;3: 605–613. doi:10.1159/000330786
345. Wu C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;11: 441–469. doi:10.1146/annurev.cb.11.110195.002301
346. van Roon JA, van Eden W, van Roy JL, Lafeber FJ, Bijlsma JW. Stimulation of suppressive T cell responses by human but not bacterial 60-kD heat-shock protein in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 1997;100: 459–463. doi:10.1172/JCI119553
347. Cohen-Sfady M, Pevsner-Fischer M, Margalit R, Cohen IR. Heat shock protein 60, via MyD88 innate signaling, protects B cells from apoptosis, spontaneous and induced. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009;183: 890–896. doi:10.4049/jimmunol.0804238
348. Habich C, Kempe K, van der Zee R, Rümenapf R, Akiyama H, Kolb H, et al. Heat shock protein 60: specific binding of lipopolysaccharide. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005;174: 1298–1305.
349. Tsan M-F, Gao B. Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol*. 2009;85: 905–910. doi:10.1189/jlb.0109005
350. Retzlaff C, Yamamoto Y, Okubo S, Hoffman PS, Friedman H, Klein TW. Legionella pneumophila heat-shock protein-induced increase of interleukin-1 beta mRNA involves protein kinase C signalling in macrophages. *Immunology*. 1996;89: 281.
351. Galdiero M, l'Ero GC de, Marcatili A. Cytokine and adhesion molecule expression in human monocytes and endothelial cells stimulated with bacterial heat shock proteins. *Infect Immun*. 1997;65: 699–707.
352. Lund PA, Large AT, Kapatai G. The chaperonins: perspectives from the Archaea. *Biochem Soc Trans*. 2003;31: 681–685. doi:10.1042/

353. Gao B, Tsan M-F. Recombinant Human Heat Shock Protein 60 Does Not Induce the Release of Tumor Necrosis Factor α from Murine Macrophages. *J Biol Chem.* 2003;278: 22523–22529. doi:10.1074/jbc.M303161200
354. Gao B, Tsan M-F. Endotoxin Contamination in Recombinant Human Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Preparation Is Responsible for the Induction of Tumor Necrosis Factor α Release by Murine Macrophages. *J Biol Chem.* 2003;278: 174–179. doi:10.1074/jbc.M208742200
355. Gao B, Tsan M-F. Induction of cytokines by heat shock proteins and endotoxin in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;317: 1149–1154. doi:10.1016/j.bbrc.2004.03.160
356. Bangen JM, Schade FU, Flohé SB. Diverse regulatory activity of human heat shock proteins 60 and 70 on endotoxin-induced inflammation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;359: 709–715. doi:10.1016/j.bbrc.2007.05.167
357. Osterloh A, Meier-Stiegen F, Veit A, Fleischer B, Bonin A von, Breloer M. Lipopolysaccharide-free Heat Shock Protein 60 Activates T Cells. *J Biol Chem.* 2004;279: 47906–47911. doi:10.1074/jbc.M408440200
358. Osterloh A, Veit A, Gessner A, Fleischer B, Breloer M. Hsp60-mediated T cell stimulation is independent of TLR4 and IL-12. *Int Immunol.* 2008;20: 433–443. doi:10.1093/intimm/dxn003
359. Osterloh A, Kalinke U, Weiss S, Fleischer B, Breloer M. Synergistic and differential modulation of immune responses by Hsp60 and lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 2007;282: 4669–4680. doi:10.1074/jbc.M608666200
360. Tsan M-F, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol.* 2004;76: 514–519. doi:10.1189/jlb.0304127
361. Weis WI, Taylor ME, Drickamer K. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev.* 1998;163: 19–34.
362. Drickamer K. C-type lectin-like domains. *Curr Opin Struct Biol.* 1999;9: 585–590.
363. Drickamer K. Evolution of Ca(2+)-dependent animal lectins. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1993;45: 207–232.
364. Drickamer K, Fadden AJ. Genomic analysis of C-type lectins. *Biochem Soc Symp.* 2002; 59–72.
365. Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* 2005;272: 6179–6217. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.05031.x
366. Dean YD, McGreal EP, Gasque P. Endothelial cells, megakaryoblasts, platelets and alveolar epithelial cells express abundant levels of the mouse AA4 antigen, a C-type lectin-like receptor involved in homing activities and innate immune host defense. *Eur J Immunol.* 2001;31: 1370–1381. doi:10.1002/1521-4141(200105)31:5<1370::AID-IMMU1370>3.0.CO;2-B
367. Norsworthy PJ, Taylor PR, Walport MJ, Botto M. Cloning of the mouse homolog of the 126-kDa human C1q/MBL/SP-A receptor, C1qR(p). *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc.* 1999;10: 789–793.

368. Kim TS, Park M, Nepomuceno RR, Palmarini G, Winokur S, Cotman CA, et al. Characterization of the murine homolog of C1qR(P): identical cellular expression pattern, chromosomal location and functional activity of the human and murine C1qR(P). *Mol Immunol*. 2000;37: 377–389.
369. Løvik G, Vaage JT, Dissen E, Szpirer C, Ryan JC, Rolstad B. Characterization and molecular cloning of rat C1qRp, a receptor on NK cells. *Eur J Immunol*. 2000;30: 3355–3362. doi:10.1002/1521-4141(200012)30:12<3355::AID-IMMU3355>3.0.CO;2-1
370. Malhotra R, Willis AC, Jensenius JC, Jackson J, Sim RB. Structure and homology of human C1q receptor (collectin receptor). *Immunology*. 1993;78: 341–348.
371. Nepomuceno RR, Henschen-Edman AH, Burgess WH, Tenner AJ. cDNA cloning and primary structure analysis of C1qR(P), the human C1q/MBL/SPA receptor that mediates enhanced phagocytosis in vitro. *Immunity*. 1997;6: 119–129.
372. Steinberger P, Szekeres A, Wille S, Stöckl J, Selenko N, Prager E, et al. Identification of human CD93 as the phagocytic C1q receptor (C1qRp) by expression cloning. *J Leukoc Biol*. 2002;71: 133–140.
373. McGreal EP, Ikewaki N, Akatsu H, Morgan BP, Gasque P. Human C1qRp is identical with CD93 and the mNI-11 antigen but does not bind C1q. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002;168: 5222–5232.
374. Nepomuceno RR, Tenner AJ. C1qRP, the C1q receptor that enhances phagocytosis, is detected specifically in human cells of myeloid lineage, endothelial cells, and platelets. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1998;160: 1929–1935.
375. Norsworthy PJ, Fossati-Jimack L, Cortes-Hernandez J, Taylor PR, Bygrave AE, Thompson RD, et al. Murine CD93 (C1qRp) contributes to the removal of apoptotic cells in vivo but is not required for C1q-mediated enhancement of phagocytosis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004;172: 3406–3414.
376. Danet GH, Luongo JL, Butler G, Lu MM, Tenner AJ, Simon MC, et al. C1qRp defines a new human stem cell population with hematopoietic and hepatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99: 10441–10445. doi:10.1073/pnas.162104799
377. Fonseca MI, Carpenter PM, Park M, Palmarini G, Nelson EL, Tenner AJ. C1qR(P), a myeloid cell receptor in blood, is predominantly expressed on endothelial cells in human tissue. *J Leukoc Biol*. 2001;70: 793–800.
378. Greenlee MC, Sullivan SA, Bohlson SS. CD93 and related family members: their role in innate immunity. *Curr Drug Targets*. 2008;9: 130–138.
379. McGreal E, Gasque P. Structure-function studies of the receptors for complement C1q. *Biochem Soc Trans*. 2002;30: 1010–1014. doi:10.1042/bst0301010
380. Petrenko O, Beavis A, Klaine M, Kittappa R, Godin I, Lemischka IR. The molecular characterization of the fetal stem cell marker AA4. *Immunity*. 1999;10: 691–700.
381. Bohlson SS, Silva R, Fonseca MI, Tenner AJ. CD93 Is Rapidly Shed from the Surface of Human Myeloid Cells and the Soluble Form Is Detected in Human Plasma. *J Immunol*. 2005;175: 1239–1247. doi:10.4049/jimmunol.175.2.1239
382. Nepomuceno RR, Ruiz S, Park M, Tenner AJ. C1qRP is a heavily O-glycosylated cell surface protein involved in the regulation of phagocytic activity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999;162: 3583–3589.

383. Park M, Tenner AJ. Cell surface expression of C1qRP/CD93 is stabilized by O-glycosylation. *J Cell Physiol.* 2003;196: 512–522. doi:10.1002/jcp.10332
384. Ikewaki N, Kulski JK, Inoko H. Regulation of CD93 cell surface expression by protein kinase C isoenzymes. *Microbiol Immunol.* 2006;50: 93–103.
385. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature.* 1997;385: 729–733. doi:10.1038/385729a0
386. Nagano O, Saya H. Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci.* 2004;95: 930–935.
387. Nagano O, Murakami D, Hartmann D, De Strooper B, Saftig P, Iwatsubo T, et al. Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation. *J Cell Biol.* 2004;165: 893–902. doi:10.1083/jcb.200310024
388. Jutila MA, Rott L, Berg EL, Butcher EC. Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: comparison with LFA-1 and MAC-1. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1989;143: 3318–3324.
389. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science.* 1989;245: 1238–1241.
390. Boehme MW, Werle E, Kommerell B, Raeth U. Serum levels of adhesion molecules and thrombomodulin as indicators of vascular injury in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Investig.* 1994;72: 598–603.
391. Lohi O, Urban S, Freeman M. Diverse substrate recognition mechanisms for rhomboids; thrombomodulin is cleaved by Mammalian rhomboids. *Curr Biol CB.* 2004;14: 236–241. doi:10.1016/j.cub.2004.01.025
392. Kao Y-C, Jiang S-J, Pan W-A, Wang K-C, Chen P-K, Wei H-J, et al. The epidermal growth factor-like domain of CD93 is a potent angiogenic factor. *PloS One.* 2012;7: e51647. doi:10.1371/journal.pone.0051647
393. Ikewaki N, Yamao H, Kulski JK, Inoko H. Flow cytometric identification of CD93 expression on naive T lymphocytes (CD4(+)CD45RA (+) cells) in human neonatal umbilical cord blood. *J Clin Immunol.* 2010;30: 723–733. doi:10.1007/s10875-010-9426-1
394. McKearn JP, Baum C, Davie JM. Cell surface antigens expressed by subsets of pre-B cells and B cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1984;132: 332–339.
395. Chevrier S, Genton C, Kallies A, Karnowski A, Otten LA, Malissen B, et al. CD93 is required for maintenance of antibody secretion and persistence of plasma cells in the bone marrow niche. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106: 3895–3900. doi:10.1073/pnas.0809736106
396. Ikewaki N, Sonoda T, Inoko H. Unique properties of cluster of differentiation 93 in the umbilical cord blood of neonates. *Microbiol Immunol.* 2013;57: 822–832. doi:10.1111/1348-0421.12097
397. Shi C-S, Shi G-Y, Chang Y-S, Han H-S, Kuo C-H, Liu C, et al. Evidence of human thrombomodulin domain as a novel angiogenic factor. *Circulation.* 2005;111: 1627–1636. doi:10.1161/01.CIR.0000160364.05405.B5

398. Langenkamp E, Zhang L, Lugano R, Huang H, Elhassan TEA, Georganaki M, et al. Elevated Expression of the C-Type Lectin CD93 in the Glioblastoma Vasculature Regulates Cytoskeletal Rearrangements That Enhance Vessel Function and Reduce Host Survival. *Cancer Res.* 2015;75: 4504–4516. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3636
399. Olsen RS, Lindh M, Vorkapic E, Andersson RE, Zar N, Löfgren S, et al. CD93 gene polymorphism is associated with disseminated colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2015;30: 883–890. doi:10.1007/s00384-015-2247-1
400. Orlandini M, Galvagni F, Bardelli M, Rocchigiani M, Lentucci C, Anselmi F, et al. The characterization of a novel monoclonal antibody against CD93 unveils a new antiangiogenic target. *Oncotarget.* 2014;5: 2750–2760. doi:10.18632/oncotarget.1887
401. Galvagni F, Nardi F, Maida M, Bernardini G, Vannuccini S, Petraglia F, et al. CD93 and dystroglycan cooperation in human endothelial cell adhesion and migration. *Oncotarget.* 2016;7: 10090–10103. doi:10.18632/oncotarget.7136
402. Moore CJ, Winder SJ. Dystroglycan versatility in cell adhesion: a tale of multiple motifs. *Cell Commun Signal CCS.* 2010;8: 3. doi:10.1186/1478-811X-8-3
403. Shimizu H, Hosokawa H, Ninomiya H, Miner JH, Masaki T. Adhesion of cultured bovine aortic endothelial cells to laminin-1 mediated by dystroglycan. *J Biol Chem.* 1999;274: 11995–12000.
404. Hosokawa H, Ninomiya H, Kitamura Y, Fujiwara K, Masaki T. Vascular endothelial cells that express dystroglycan are involved in angiogenesis. *J Cell Sci.* 2002;115: 1487–1496.
405. Ikewaki N, Inoko H. Development and characterization of a novel monoclonal antibody (mNI-11) that induces cell adhesion of the LPS-stimulated human monocyte-like cell line U937. *J Leukoc Biol.* 1996;59: 697–708.
406. Ikewaki N, Tamauchi H, Yamada A, Mori N, Yamao H, Inoue H, et al. A unique monoclonal antibody mNI-11 rapidly enhances spread formation in human umbilical vein endothelial cells. *J Clin Immunol.* 2000;20: 317–324.
407. Zhang M, Bohlson SS, Dy M, Tenner AJ. Modulated interaction of the ERM protein, moesin, with CD93. *Immunology.* 2005;115: 63–73. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02120.x
408. Tsukita S, Yonemura S. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem.* 1999;274: 34507–34510.
409. Hsu Y-Y, Shi G-Y, Kuo C-H, Liu S-L, Wu C-M, Ma C-Y, et al. Thrombomodulin is an ezrin-interacting protein that controls epithelial morphology and promotes collective cell migration. *FASEB J.* 2012;26: 3440–3452. doi:10.1096/fj.12-204917
410. Galvan MD, Greenlee-Wacker MC, Bohlson SS. C1q and phagocytosis: the perfect complement to a good meal. *J Leukoc Biol.* 2012;92: 489–497. doi:10.1189/jlb.0212099
411. Greenlee-Wacker MC, Briseno C, Galvan M, Moriel G, Velazquez P, Bohlson SS. Membrane-Associated CD93 Regulates Leukocyte Migration and C1q-Hemolytic Activity during Murine Peritonitis. *J Immunol.* 2011;187: 3353–3361. doi:10.4049/jimmunol.1100803
412. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 2000;407: 784–788. doi:10.1038/35037722

413. Fadok VA, Bratton DL, Henson PM. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest*. 2001;108: 957–962. doi:10.1172/JCI14122
414. Wieman HL, Horn SR, Jacobs SR, Altman BJ, Kornbluth S, Rathmell JC. An essential role for the Glut1 PDZ-binding motif in growth factor regulation of Glut1 degradation and trafficking. *Biochem J*. 2009;418: 345–367. doi:10.1042/BJ20081422
415. Wang LH, Kalb RG, Strittmatter SM. A PDZ protein regulates the distribution of the transmembrane semaphorin, M-SemF. *J Biol Chem*. 1999;274: 14137–14146.
416. De Vries L, Lou X, Zhao G, Zheng B, Farquhar MG. GIPC, a PDZ domain containing protein, interacts specifically with the C terminus of RGS-GAIP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95: 12340–12345.
417. Jeanneteau F, Diaz J, Sokoloff P, Griffon N. Interactions of GIPC with dopamine D2, D3 but not D4 receptors define a novel mode of regulation of G protein-coupled receptors. *Mol Biol Cell*. 2004;15: 696–705. doi:10.1091/mbc.E03-05-0293
418. Bohlson SS, Zhang M, Ortiz CE, Tenner AJ. CD93 interacts with the PDZ domain-containing adaptor protein GIPC: implications in the modulation of phagocytosis. *J Leukoc Biol*. 2005;77: 80–89. doi:10.1189/jlb.0504305
419. Webster SD, Park M, Fonseca MI, Tenner AJ. Structural and functional evidence for microglial expression of C1qR(P), the C1q receptor that enhances phagocytosis. *J Leukoc Biol*. 2000;67: 109–116.
420. Botto M, Dell’Agnola C, Bygrave AE, Thompson EM, Cook HT, Petry F, et al. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat Genet*. 1998;19: 56–59. doi:10.1038/ng0598-56
421. Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA, et al. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med*. 2001;194: 781–795.
422. Greenlee MC, Sullivan SA, Bohlson SS. Detection and characterization of soluble CD93 released during inflammation. *Inflamm Res*. 2009;58: 909. doi:10.1007/s00011-009-0064-0
423. Shi C-S, Shi G-Y, Hsiao H-M, Hsiao S-M, Kao Y-C, Kuo K-L, et al. Lectin-like domain of thrombomodulin binds to its specific ligand Lewis Y antigen and neutralizes lipopolysaccharide-induced inflammatory response. *Blood*. 2008;112: 3661–3670. doi:10.1182/blood-2008-03-142760
424. Conway EM, Van de Wouwer M, Pollefeyt S, Jurk K, Van Aken H, De Vriese A, et al. The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Exp Med*. 2002;196: 565–577.
425. Abeyama K, Stern DM, Ito Y, Kawahara K, Yoshimoto Y, Tanaka M, et al. The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism. *J Clin Invest*. 2005;115: 1267–1274. doi:10.1172/JCI22782
426. Van de Wouwer M, Plaisance S, De Vriese A, Waelkens E, Collen D, Persson J, et al. The lectin-like domain of thrombomodulin interferes with complement activation and protects against arthritis. *J Thromb Haemost JTH*. 2006;4: 1813–1824. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.02033.x

427. Harhausen D, Prinz V, Ziegler G, Gertz K, Endres M, Lehrach H, et al. CD93/AA4.1: A Novel Regulator of Inflammation in Murine Focal Cerebral Ischemia. *J Immunol.* 2010;184: 6407–6417. doi:10.4049/jimmunol.0902342
428. Jeon J-W, Jung J-G, Shin E-C, Choi HI, Kim HY, Cho M-L, et al. Soluble CD93 induces differentiation of monocytes and enhances TLR responses. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2010;185: 4921–4927. doi:10.4049/jimmunol.0904011
429. Kokkola R, Li J, Sundberg E, Aveberger A-C, Palmblad K, Yang H, et al. Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity. *Arthritis Rheum.* 2003;48: 2052–2058. doi:10.1002/art.11161
430. Östberg T, Kawane K, Nagata S, Yang H, Chavan S, Klevenvall L, et al. Protective targeting of high mobility group box chromosomal protein 1 in a spontaneous arthritis model. *Arthritis Rheum.* 2010;62: 2963–2972. doi:10.1002/art.27590
431. Lundbäck P, Lea JD, Sowinska A, Ottosson L, Fürst CM, Steen J, et al. A novel high mobility group box 1 neutralizing chimeric antibody attenuates drug-induced liver injury and postinjury inflammation in mice. *Hepatology Baltim Md.* 2016; doi:10.1002/hep.28736
432. Schierbeck H, Lundbäck P, Palmblad K, Klevenvall L, Erlandsson-Harris H, Andersson U, et al. Monoclonal anti-HMGB1 (high mobility group box chromosomal protein 1) antibody protection in two experimental arthritis models. *Mol Med Camb Mass.* 2011;17: 1039–1044. doi:10.2119/molmed.2010.00264
433. Ge W-S, Fan J-G, Chen Y-W, Xu L-M. Expression and purification of functional HMGB1 A box by fusion with SUMO. *Mol Med Rep.* 2015;12: 6527–6532. doi:10.3892/mmr.2015.4308
434. Zhang C-L, Shu M-G, Qi H-W, Li L-W. Inhibition of tumor angiogenesis by HMGB1 A box peptide. *Med Hypotheses.* 2008;70: 343–345. doi:10.1016/j.mehy.2007.05.024
435. Wu X, Gu W, Lu H, Liu C, Yu B, Xu H, et al. Soluble Receptor for Advanced Glycation End Product Ameliorates Chronic Intermittent Hypoxia Induced Renal Injury, Inflammation, and Apoptosis via P38/JNK Signaling Pathways. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016: 1015390. doi:10.1155/2016/1015390
436. Izushi Y, Teshigawara K, Liu K, Wang D, Wake H, Takata K, et al. Soluble form of the receptor for advanced glycation end-products attenuates inflammatory pathogenesis in a rat model of lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Pharmacol Sci.* 2016;130: 226–234. doi:10.1016/j.jphs.2016.02.005
437. Bongoni AK, Klymiuk N, Wolf E, Ayares D, Rieben R, Cowan PJ. Transgenic Expression of Human Thrombomodulin Inhibits HMGB1-Induced Porcine Aortic Endothelial Cell Activation. *Transplantation.* 2016;100: 1871–1879. doi:10.1097/TP.0000000000001188
438. Nakamura Y, Nakano T, Irie K, Sano K, Tanaka J, Yamashita Y, et al. Recombinant human soluble thrombomodulin ameliorates cerebral ischemic injury through a high-mobility group box 1 inhibitory mechanism without hemorrhagic complications in mice. *J Neurol Sci.* 2016;362: 278–282. doi:10.1016/j.jns.2016.01.047
439. Takahashi Y, Matsutani N, Dejima H, Nakayama T, Okamura R, Uehara H, et al. Therapeutic potential of recombinant thrombomodulin for lung injury following pneumonectomy via inhibition of HMGB1 in mice. *J Trauma Acute Care Surg.* 2016; doi:10.1097/TA.0000000000001208

440. Kashiwadate T, Miyagi S, Hara Y, Akamatsu Y, Sekiguchi S, Kawagishi N, et al. Soluble Thrombomodulin Ameliorates Ischemia-Reperfusion Injury of Liver Grafts by Modulating the Proinflammatory Role of High-Mobility Group Box 1. *Tohoku J Exp Med.* 2016;239: 315–323. doi:10.1620/tjem.239.315
441. Mollica L, De Marchis F, Spitaleri A, Dallacosta C, Pennacchini D, Zamai M, et al. Glycyrrhizin binds to high-mobility group box 1 protein and inhibits its cytokine activities. *Chem Biol.* 2007;14: 431–441. doi:10.1016/j.chembiol.2007.03.007
442. Yang P-S, Kim D-H, Lee Y, Lee S-E, Kang W, Chang H-J, et al. Glycyrrhizin, inhibitor of high mobility group box-1, attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling in rats. *Respir Res.* 2014;15: 148. doi:10.1186/s12931-014-0148-4
443. Pang H, Huang T, Song J, Li D, Zhao Y, Ma X. Inhibiting HMGB1 with Glycyrrhizic Acid Protects Brain Injury after DAI via Its Anti-Inflammatory Effect. *Mediators Inflamm.* 2016;2016: 4569521. doi:10.1155/2016/4569521
444. Sitia G, Iannaccone M, Müller S, Bianchi ME, Guidotti LG. Treatment with HMGB1 inhibitors diminishes CTL-induced liver disease in HBV transgenic mice. *J Leukoc Biol.* 2007;81: 100–107. doi:10.1189/jlb.0306173
445. Ostberg T, Wähämaa H, Palmblad K, Ito N, Stridh P, Shoshan M, et al. Oxaliplatin retains HMGB1 intranuclearly and ameliorates collagen type II-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008;10: R1. doi:10.1186/ar2347
446. Zetterström CK, Jiang W, Wähämaa H, Ostberg T, Aveberger A-C, Schierbeck H, et al. Pivotal advance: inhibition of HMGB1 nuclear translocation as a mechanism for the anti-rheumatic effects of gold sodium thiomalate. *J Leukoc Biol.* 2008;83: 31–38. doi:10.1189/jlb.0507323
447. Li Y-B, Xu P, Xu K, Cai Y-S, Sun M-Y, Yang L, et al. Methotrexate affects HMGB1 expression in rheumatoid arthritis, and the downregulation of HMGB1 prevents rheumatoid arthritis progression. *Mol Cell Biochem.* 2016;420: 161–170. doi:10.1007/s11010-016-2783-1
448. Lei H, Wen Q, Li H, Du S, Wu J-J, Chen J, et al. Paeonol Inhibits Lipopolysaccharide-Induced HMGB1 Translocation from the Nucleus to the Cytoplasm in RAW264.7 Cells. *Inflammation.* 2016;39: 1177–1187. doi:10.1007/s10753-016-0353-z
449. Inoue K, Kawahara K, Biswas KK, Ando K, Mitsudo K, Nobuyoshi M, et al. HMGB1 expression by activated vascular smooth muscle cells in advanced human atherosclerosis plaques. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol.* 2007;16: 136–143. doi:10.1016/j.carpath.2006.11.006
450. Kalinina N, Agrotis A, Antropova Y, DiVitto G, Kanellakis P, Kostolias G, et al. Increased expression of the DNA-binding cytokine HMGB1 in human atherosclerotic lesions: role of activated macrophages and cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24: 2320–2325. doi:10.1161/01.ATV.0000145573.36113.8a
451. Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhamer JH, et al. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood.* 2003;101: 2652–2660. doi:10.1182/blood-2002-05-1300
452. Treutiger CJ, Mullins GE, Johansson A-SM, Rouhiainen A, Rauvala HME, Erlandsson-Harris H, et al. High mobility group 1 B-box mediates activation of human endothelium. *J Intern Med.* 2003;254: 375–385.

453. Porto A, Palumbo R, Pieroni M, Aprigliano G, Chiesa R, Sanvito F, et al. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques secrete and proliferate in response to high mobility group box 1 protein. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2006;20: 2565–2566. doi:10.1096/fj.06-5867fje
454. Kanellakis P, Agrotis A, Kyaw TS, Koulis C, Ahrens I, Mori S, et al. High-mobility group box protein 1 neutralization reduces development of diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31: 313–319. doi:10.1161/ATVBAHA.110.218669
455. Basta G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis.* 2008;196: 9–21. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.07.025
456. Harja E, Bu D, Hudson BI, Chang JS, Shen X, Hallam K, et al. Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE^{-/-} mice. *J Clin Invest.* 2008;118: 183–194. doi:10.1172/JCI32703
457. Hu X, Jiang H, Bai Q, Zhou X, Xu C, Lu Z, et al. Increased serum HMGB1 is related to the severity of coronary artery stenosis. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2009;406: 139–142. doi:10.1016/j.cca.2009.06.016
458. Kohno T, Anzai T, Naito K, Miyasho T, Okamoto M, Yokota H, et al. Role of high-mobility group box 1 protein in post-infarction healing process and left ventricular remodelling. *Cardiovasc Res.* 2009;81: 565–573. doi:10.1093/cvr/cvn291
459. Andrassy M, Volz HC, Igwe JC, Funke B, Eichberger SN, Kaya Z, et al. High-mobility group box-1 in ischemia-reperfusion injury of the heart. *Circulation.* 2008;117: 3216–3226. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.769331
460. Tzeng H-P, Fan J, Vallejo JG, Dong JW, Chen X, Houser SR, et al. Negative inotropic effects of high-mobility group box 1 protein in isolated contracting cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294: H1490-1496. doi:10.1152/ajpheart.00910.2007
461. Oozawa S, Mori S, Kanke T, Takahashi H, Liu K, Tomono Y, et al. Effects of HMGB1 on ischemia-reperfusion injury in the rat heart. *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* 2008;72: 1178–1184.
462. Kitahara T, Takeishi Y, Harada M, Niizeki T, Suzuki S, Sasaki T, et al. High-mobility group box 1 restores cardiac function after myocardial infarction in transgenic mice. *Cardiovasc Res.* 2008;80: 40–46. doi:10.1093/cvr/cvn163
463. Hu X, Jiang H, Cui B, Xu C, Lu Z, He B. Preconditioning with high mobility group box 1 protein protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Int J Cardiol.* 2010;145: 111–112. doi:10.1016/j.ijcard.2009.05.057
464. Giallauria F, Cirillo P, Lucci R, Pacileo M, D'Agostino M, Maietta P, et al. Autonomic dysfunction is associated with high mobility group box-1 levels in patients after acute myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2010;208: 280–284. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.07.025
465. Wang H, Qu H, Deng H. Plasma HMGB-1 Levels in Subjects with Obesity and Type 2 Diabetes: A Cross-Sectional Study in China. *PLoS ONE.* 2015;10. doi:10.1371/journal.pone.0136564
466. Arrigo T, Chirico V, Salpietro V, Munafò C, Ferrau V, Gitto E, et al. High-mobility group protein B1: a new biomarker of metabolic syndrome in obese children. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc.* 2013;168: 631–638. doi:10.1530/EJE-13-0037

467. Gunasekaran MK, Viranaicken W, Girard A-C, Festy F, Cesari M, Roche R, et al. Inflammation triggers high mobility group box 1 (HMGB1) secretion in adipose tissue, a potential link to obesity. *Cytokine*. 2013;64: 103–111. doi:10.1016/j.cyto.2013.07.017
468. Wagner M. A Dangerous Duo in Adipose Tissue: High-Mobility Group Box 1 Protein and Macrophages. *Yale J Biol Med*. 2014;87: 127–133.
469. Chen Y, Qiao F, Zhao Y, Wang Y, Liu G. HMGB1 is activated in type 2 diabetes mellitus patients and in mesangial cells in response to high glucose. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8: 6683–6691.
470. Li M, Song L, Gao X, Chang W, Qin X. Toll-like receptor 4 on islet β cells senses expression changes in high-mobility group box 1 and contributes to the initiation of type 1 diabetes. *Exp Mol Med*. 2012;44: 260–267. doi:10.3858/emm.2012.44.4.021
471. Kim J, Kim C-S, Sohn E, Kim JS. Cytoplasmic translocation of high-mobility group box-1 protein is induced by diabetes and high glucose in retinal pericytes. *Mol Med Rep*. 2016;14: 3655–3661. doi:10.3892/mmr.2016.5702
472. Guzmán-Ruiz R, Ortega F, Rodríguez A, Vázquez-Martínez R, Díaz-Ruiz A, Garcia-Navarro S, et al. Alarmin high-mobility group B1 (HMGB1) is regulated in human adipocytes in insulin resistance and influences insulin secretion in β -cells. *Int J Obes* 2005. 2014;38: 1545–1554. doi:10.1038/ijo.2014.36
473. Dandona P, Ghanim H, Green K, Sia CL, Abuaysheh S, Kuhadiya N, et al. Insulin infusion suppresses while glucose infusion induces Toll-like receptors and high-mobility group-B1 protein expression in mononuclear cells of type 1 diabetes patients. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2013;304: E810–E818. doi:10.1152/ajpendo.00566.2012
474. Hamada T, Torikai M, Kuwazuru A, Tanaka M, Horai N, Fukuda T, et al. Extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 is a coupling factor for hypoxia and inflammation in arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58: 2675–2685. doi:10.1002/art.23729
475. Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, Hashiguchi T, Yamakuchi M, Goto M, et al. High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum*. 2003;48: 971–981. doi:10.1002/art.10859
476. Kokkola R, Sundberg E, Ulfgrén A-K, Palmblad K, Li J, Wang H, et al. High mobility group box chromosomal protein 1: a novel proinflammatory mediator in synovitis. *Arthritis Rheum*. 2002;46: 2598–2603. doi:10.1002/art.10540
477. Lundbäck P, Stridh P, Klevenvall L, Jenkins RE, Fischer M, Sundberg E, et al. Characterization of the Inflammatory Properties of Actively Released HMGB1 in Juvenile Idiopathic Arthritis. *Antioxid Redox Signal*. 2016;24: 605–619. doi:10.1089/ars.2014.6039
478. Pullerits R, Jonsson I-M, Verdrengh M, Bokarewa M, Andersson U, Erlandsson-Harris H, et al. High mobility group box chromosomal protein 1, a DNA binding cytokine, induces arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48: 1693–1700. doi:10.1002/art.11028
479. Huang Q, Ma Y, Adebayo A, Pope RM. Increased macrophage activation mediated through toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56: 2192–2201. doi:10.1002/art.22707
480. Parkkinen J, Rauvala H. Interactions of plasminogen and tissue plasminogen activator (t-PA) with amphotericin. Enhancement of t-PA-catalyzed plasminogen activation by amphotericin. *J Biol Chem*. 1991;266: 16730–16735.

481. Wähämaa H, Schierbeck H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, Aveberger A-C, Andersson U, et al. High mobility group box protein 1 in complex with lipopolysaccharide or IL-1 promotes an increased inflammatory phenotype in synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther.* 2011;13: R136. doi:10.1186/ar3450
482. Grundtman C, Wick G. The autoimmune concept of atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2011;22: 327–334. doi:10.1097/MOL.0b013e32834aa0c2
483. Gotsman I, Sharpe AH, Lichtman AH. T-cell costimulation and coinhibition in atherosclerosis. *Circ Res.* 2008;103: 1220–1231. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.182428
484. Tse K, Tse H, Sidney J, Sette A, Ley K. T cells in atherosclerosis. *Int Immunol.* 2013;25: 615–622. doi:10.1093/intimm/dxt043
485. Harats D, Yacov N, Gilburd B, Shoenfeld Y, George J. Oral tolerance with heat shock protein 65 attenuates Mycobacterium tuberculosis-induced and high-fat-diet-driven atherosclerotic lesions. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40: 1333–1338.
486. Maron R, Sukhova G, Faria A-M, Hoffmann E, Mach F, Libby P, et al. Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation.* 2002;106: 1708–1715.
487. van Puijvelde GHM, van Es T, van Wanrooij EJA, Habets KLL, de Vos P, van der Zee R, et al. Induction of oral tolerance to HSP60 or an HSP60-peptide activates T cell regulation and reduces atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27: 2677–2683. doi:10.1161/ATVBAHA.107.151274
488. Wick G, Kleindienst R, Dietrich H, Xu Q. Is atherosclerosis an autoimmune disease? *Trends Food Sci Technol.* 1992;3: 114–119. doi:10.1016/0924-2244(92)90154-O
489. Ranford JC, Coates ARM, Henderson B. Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. *Expert Rev Mol Med.* 2000;2: 1–17. doi:10.1017/S1462399400002015
490. Shamaei-Tousi A, D’Aiuto F, Nibali L, Steptoe A, Coates ARM, Parkar M, et al. Differential regulation of circulating levels of molecular chaperones in patients undergoing treatment for periodontal disease. *PloS One.* 2007;2: e1198. doi:10.1371/journal.pone.0001198
491. Märker T, Kriebel J, Wohlrab U, Habich C. Heat shock protein 60 and adipocytes: characterization of a ligand-receptor interaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;391: 1634–1640. doi:10.1016/j.bbrc.2009.12.104
492. Gülden E, Märker T, Kriebel J, Kolb-Bachofen V, Burkart V, Habich C. Heat shock protein 60: evidence for receptor-mediated induction of proinflammatory mediators during adipocyte differentiation. *FEBS Lett.* 2009;583: 2877–2881. doi:10.1016/j.febslet.2009.07.049
493. Gülden E, Mollérus S, Brüggemann J, Burkart V, Habich C. Heat shock protein 60 induces inflammatory mediators in mouse adipocytes. *FEBS Lett.* 2008;582: 2731–2736. doi:10.1016/j.febslet.2008.07.002
494. Vachharajani V, Granger DN. Adipose tissue: a motor for the inflammation associated with obesity. *IUBMB Life.* 2009;61: 424–430. doi:10.1002/iub.169

495. Trayhurn P, Wood IS. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem Soc Trans.* 2005;33: 1078–1081. doi:10.1042/BST20051078
496. Märker T, Sell H, Zillessen P, Glöde A, Kriebel J, Ouwens DM, et al. Heat shock protein 60 as a mediator of adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Diabetes.* 2012;61: 615–625. doi:10.2337/db10-1574
497. Devaraj S, Dasu MR, Park SH, Jialal I. Increased levels of ligands of Toll-like receptors 2 and 4 in type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2009;52: 1665–1668. doi:10.1007/s00125-009-1394-8
498. Shamaei-Tousi A, Stephens JW, Bin R, Cooper JA, Steptoe A, Coates ARM, et al. Association between plasma levels of heat shock protein 60 and cardiovascular disease in patients with diabetes mellitus. *Eur Heart J.* 2006;27: 1565–1570. doi:10.1093/eurheartj/ehl081
499. Juwono J, Martinus RD. Does Hsp60 Provide a Link between Mitochondrial Stress and Inflammation in Diabetes Mellitus? *J Diabetes Res.* 2016;2016: e8017571. doi:10.1155/2016/8017571
500. Dasu MR, Devaraj S, Park S, Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care.* 2010;33: 861–868. doi:10.2337/dc09-1799
501. Birk OS, Douek DC, Elias D, Takacs K, Dewchand H, Gur SL, et al. A role of Hsp60 in autoimmune diabetes: analysis in a transgenic model. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93: 1032–1037.
502. Elias D, Meilin A, Ablamunits V, Birk OS, Carmi P, Könen-Waisman S, et al. Hsp60 Peptide Therapy of NOD Mouse Diabetes Induces a Th2 Cytokine Burst and Downregulates Autoimmunity to Various β -Cell Antigens. *Diabetes.* 1997;46: 758–765. doi:10.2337/diab.46.5.758
503. Bockova J, Elias D, Cohen IR. Treatment of NOD Diabetes with a Novel Peptide of the hsp60 Molecule Induces Th2-type Antibodies. *J Autoimmun.* 1997;10: 323–329. doi:10.1006/jaut.1997.0150
504. Pearson CM. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N.* 1956;91: 95–101.
505. Cromartie WJ, Craddock JG, Schwab JH, Anderle SK, Yang CH. Arthritis in rats after systemic injection of streptococcal cells or cell walls. *J Exp Med.* 1977;146: 1585–1602.
506. Chang YH, Pearson CM, Abe C. Adjuvant polyarthritis. IV. Induction by a synthetic adjuvant: immunologic, histopathologic, and other studies. *Arthritis Rheum.* 1980;23: 62–71.
507. Eden W van, Tholet JER, Zee R van der, Noordzij A, van Embden JDA, Hensen EJ, et al. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature.* 1988;331: 171–173. doi:10.1038/331171a0
508. Hogervorst EJM, Boog CJP, Wagenaar JPA, Wauben MHM, van der Zee R, van Eden W. T cell reactivity to an epitope of the mycobacterial 65-kDa heat-shock protein (hsp 65) corresponds with arthritis susceptibility in rats and is regulated by hsp 65-specific cellular responses. *Eur J Immunol.* 1991;21: 1289–1296. doi:10.1002/eji.1830210529
509. de Kleer IM, Kamphuis SM, Rijkers GT, Scholtens L, Gordon G, De Jager W, et al. The spontaneous remission of juvenile idiopathic arthritis is characterized by CD30+ T cells directed to human heat-

- shock protein 60 capable of producing the regulatory cytokine interleukin-10. *Arthritis Rheum.* 2003;48: 2001–2010. doi:10.1002/art.11174
510. Leavenworth JW, Tang X, Kim H-J, Wang X, Cantor H. Amelioration of arthritis through mobilization of peptide-specific CD8+ regulatory T cells. *J Clin Invest.* 2013;123: 1382–1389. doi:10.1172/JCI66938
511. Dominguez MDC, Lorenzo N, Barbera A, Darrasse-Jeze G, Hernández MV, Torres A, et al. An altered peptide ligand corresponding to a novel epitope from heat-shock protein 60 induces regulatory T cells and suppresses pathogenic response in an animal model of adjuvant-induced arthritis. *Autoimmunity.* 2011;44: 471–482. doi:10.3109/08916934.2010.550590
512. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36: 959–969.
513. Libby P, Ridker PM, Hansson GK, Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54: 2129–2138. doi:10.1016/j.jacc.2009.09.009
514. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352: 1685–1695. doi:10.1056/NEJMra043430
515. Shiffman D, Kane JP, Louie JZ, Arellano AR, Ross DA, Catanese JJ, et al. Analysis of 17,576 potentially functional SNPs in three case-control studies of myocardial infarction. *PloS One.* 2008;3: e2895. doi:10.1371/journal.pone.0002895
516. van der Net JB, Oosterveer DM, Versmissen J, Defesche JC, Yazdanpanah M, Aouizerat BE, et al. Replication study of 10 genetic polymorphisms associated with coronary heart disease in a specific high-risk population with familial hypercholesterolemia. *Eur Heart J.* 2008;29: 2195–2201. doi:10.1093/eurheartj/ehn303
517. Mälarstig A, Silveira A, Wågsäter D, Öhrvik J, Bäcklund A, Samnegård A, et al. Plasma CD93 concentration is a potential novel biomarker for coronary artery disease. *J Intern Med.* 2011;270: 229–236. doi:10.1111/j.1365-2796.2011.02364.x
518. Youn J-C, Yu HT, Jeon J-W, Lee HS, Jang Y, Park YW, et al. Soluble CD93 Levels in Patients with Acute Myocardial Infarction and Its Implication on Clinical Outcome. Guo Y, editor. *PLoS ONE.* 2014;9: e96538. doi:10.1371/journal.pone.0096538
519. Antohe F. Endothelial cells and macrophages, partners in atherosclerotic plaque progression. *Arch Physiol Biochem.* 2006;112: 245–253. doi:10.1080/13813450601094706
520. Mestas J, Ley K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2008;18: 228–232. doi:10.1016/j.tcm.2008.11.004
521. Cui D, Thorp E, Li Y, Wang N, Yvan-Charvet L, Tall AR, et al. Pivotal advance: macrophages become resistant to cholesterol-induced death after phagocytosis of apoptotic cells. *J Leukoc Biol.* 2007;82: 1040–1050. doi:10.1189/jlb.0307192
522. Schrijvers DM, De Meyer GRY, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovasc Res.* 2007;73: 470–480. doi:10.1016/j.cardiores.2006.09.005

523. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407: 233–241. doi:10.1038/35025203
524. Chan KHK, Huang Y-T, Meng Q, Wu C, Reiner A, Sobel EM, et al. Shared Molecular Pathways and Gene Networks for Cardiovascular Disease and Type 2 Diabetes Mellitus in Women Across Diverse Ethnicities. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014;7: 911–919. doi:10.1161/CIRCGENETICS.114.000676
525. Strawbridge RJ, Hilding A, Silveira A, Österholm C, Sennblad B, McLeod O, et al. Soluble CD93 Is Involved in Metabolic Dysregulation but Does Not Influence Carotid Intima-Media Thickness. *Diabetes*. 2016;65: 2888–2899. doi:10.2337/db15-1333
526. Bhattacharjee M, Balakrishnan L, Renuse S, Advani J, Goel R, Sathe G, et al. Synovial fluid proteome in rheumatoid arthritis. *Clin Proteomics*. 2016;13: 12. doi:10.1186/s12014-016-9113-1
527. Koch AE. The role of angiogenesis in rheumatoid arthritis: recent developments. *Ann Rheum Dis*. 2000;59 Suppl 1: i65-71.
528. Lipford GB, Heeg K, Wagner H. Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends Microbiol*. 1998;6: 496–500.
529. Chuang T-H, Lee J, Kline L, Mathison JC, Ulevitch RJ. Toll-like receptor 9 mediates CpG-DNA signaling. *J Leukoc Biol*. 2002;71: 538–544.
530. Vollmer J, Weeratna R, Payette P, Jurk M, Schetter C, Laucht M, et al. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol*. 2004;34: 251–262. doi:10.1002/eji.200324032
531. Cassell GH. Infectious Causes of Chronic Inflammatory Diseases and Cancer - Volume 4, Number 3—September 1998 - Emerging Infectious Disease journal - CDC. doi:10.3201/eid0403.980339
532. Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate Immunity Gone Awry: Linking Microbial Infections to Chronic Inflammation and Cancer. *Cell*. 2006;124: 823–835. doi:10.1016/j.cell.2006.02.016
533. Hawman DW, Stoermer KA, Montgomery SA, Pal P, Oko L, Diamond MS, et al. Chronic Joint Disease Caused by Persistent Chikungunya Virus Infection Is Controlled by the Adaptive Immune Response. *J Virol*. 2013;87: 13878–13888. doi:10.1128/JVI.02666-13
534. Hayashi C, Gudino CV, Gibson FC, III, Genco CA. Pathogen-induced inflammation at sites distant from oral infection: bacterial persistence and induction of cell-specific innate immune inflammatory pathways. *Mol Oral Microbiol*. 2010;25: 305. doi:10.1111/j.2041-1014.2010.00582.x
535. Ercolini AM, Miller SD. The role of infections in autoimmune disease. *Clin Exp Immunol*. 2009;155: 1–15. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03834.x
536. See DM, Tilles JG. The pathogenesis of viral-induced diabetes. *Clin Diagn Virol*. 1998;9: 85–88.
537. Szopa TM, Titchener PA, Portwood ND, Taylor KW. Diabetes mellitus due to viruses--some recent developments. *Diabetologia*. 1993;36: 687–695.
538. Rezania S, Amirmozaffari N, Tabarraei B, Jeddi-Tehrani M, Zarei O, Alizadeh R, et al. Extraction, Purification and Characterization of Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2011;3: 3–9.

539. Cheng Y-S, Zheng Y, VanderGheynst JS. Rapid quantitative analysis of lipids using a colorimetric method in a microplate format. *Lipids*. 2011;46: 95–103. doi:10.1007/s11745-010-3494-0
540. Nativel B, Figueres A, Andries J, Planesse C, Couprie J, Gasque P, et al. Soluble expression of disulfide-bonded C-type lectin like domain of human CD93 in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Immunol Methods*. 2016; doi:10.1016/j.jim.2016.10.003
541. Lee B-C, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842: 446–462. doi:10.1016/j.bbadis.2013.05.017
542. Rubartelli A, Lotze MT. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol*. 2007;28: 429–436. doi:10.1016/j.it.2007.08.004
543. Lim SY, Raftery MJ, Goyette J, Hsu K, Geczy CL. Oxidative modifications of S100 proteins: functional regulation by redox. *J Leukoc Biol*. 2009;86: 577–587. doi:10.1189/jlb.1008608
544. Volpe CMO, Nogueira-Machado JA. The dual role of free fatty acid signaling in inflammation and therapeutics. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 2013;7: 189–197.
545. Yin J, Peng Y, Wu J, Wang Y, Yao L. Toll-like receptor 2/4 links to free fatty acid-induced inflammation and β -cell dysfunction. *J Leukoc Biol*. 2014;95: 47–52. doi:10.1189/jlb.0313143
546. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*. 2005;46: 2347–2355. doi:10.1194/jlr.M500294-JLR200
547. Tsan M-F. Heat shock proteins and high mobility group box 1 protein lack cytokine function. *J Leukoc Biol*. 2011;89: 847–853. doi:10.1189/jlb.0810471
548. LeBouder E, Rey-Nores JE, Rushmere NK, Grigorov M, Lawn SD, Affolter M, et al. Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003;171: 6680–6689.

Pathologie inflammatoire : Etude de la contribution des PAMP et DAMP

Résumé

L'inflammation est le mécanisme de base du système immunitaire. Dans le cas de pathologie inflammatoire cette inflammation persiste et devient délétère pour l'organisme. Les causes de cette persistance peuvent être variées. L'une de ces causes est la présence de molécules induisant l'inflammation. Elles peuvent être d'origine exogène comme les PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern). Ce sont des molécules issues des pathogènes (LPS, peptidoglycanes, ADN CpG ...) capables d'activer le système immunitaire. Ces molécules peuvent également être d'origine endogène comme les DAMP (Damage Associated Molecular Pattern). Ce sont des molécules libérées par les cellules en état de danger (HMGB1, HSP60, S100...) pour prévenir et activer le système immunitaire. La présence de récepteurs (TLR2, TLR4, RAGE...) capable de reconnaître ces PAMP et DAMP est également nécessaire pour pouvoir induire une inflammation.

Mes travaux explorent les mécanismes moléculaires et cellulaires des PAMP et des DAMP, dans l'installation et le maintien de l'inflammation dans le cadre des maladies inflammatoires. Pour cela mon étude se focalise sur les mécanismes de reconnaissance et d'induction de l'inflammation par les PAMP et DAMP.

Le LPS est le plus connu des PAMP et sa capacité inflammatoire n'est plus à démontrer. Mes résultats ont montré que l'espèce de la bactérie et le degré de purification influencent grandement l'activité inflammatoire du LPS et modulent les récepteurs impliqués dans cette réponse. De plus en fonction de l'espèce animale stimulée avec le LPS cette réponse inflammatoire peut également varier.

Les DAMP interviennent également dans l'installation et le maintien de l'inflammation, comme nous l'avons montré pour HMGB1. Il est impliqué dans l'inflammation de bas grade observée au niveau du tissu adipeux des personnes obèses, et contrôle l'inflammation via le récepteur RAGE. De plus l'association des DAMP à certains PAMP s'accompagne d'une amplification de leurs effets pro-inflammatoires. Ainsi nous avons montré que HSP60 peut se lier à du LPS et amplifier sa capacité inflammatoire alors que seul HSP60 n'a pas d'effet inflammatoire.

Les récepteurs des PAMP et DAMP jouent également un rôle très important dans la réponse inflammatoire. Nous avons découvert un potentiel nouveau récepteur de DAMP et PAMP appelé CD93. Nous avons montré que CD93 était capable d'interagir avec des PAMP (LPS, ADN bactérien et ADN CpG), mais aussi des DAMP (HMGB1 et HSP60).

Nous avons ainsi mis en évidence certains mécanismes cellulaires et moléculaires dans la réponse inflammatoire liés aux DAMP et PAMP. Nous nous sommes également intéressé aux récepteurs impliqués dans ces différents mécanismes et avons même mis en évidence un potentiel nouveau récepteur CD93. Nous émettons l'hypothèse que CD93 pourrait avoir un rôle dans les pathologies inflammatoires par cette capacité à lier les DAMP et PAMP. Ainsi CD93, HMGB1, HSP60 et le LPS pourrait être des cibles thérapeutiques potentielles dans les cas de maladies inflammatoires.

Mots clés : DAMP, PAMP, immunité, inflammation, HMGB1, HSP60, LPS, CD93

Inflammatory pathology: Study of the contribution of PAMPs and DAMPs

Abstract

Inflammation is the basic mechanism of the immune system. In the case of inflammatory pathologies this inflammation persists and becomes deleterious to the organism. Many reasons can explain this persistence. One of these causes is the presence of inflammatory-inducing molecules. They may have exogenous origin such as PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern). They are derived from pathogens (LPS, peptidoglycans, CpG DNA ...), and are able to activate the immune system. These molecules can also have endogenous origin such as the DAMP (Damage Associated Molecular Pattern). They are released by stress cells (HMGB1, HSP60, S100 ...) to prevent and activate the immune system. The presence of receptors (TLR2, TLR4, RAGE ...) capable of recognizing these PAMPs and DAMPs is also necessary in order to elicit inflammation.

My work explores the contribution of PAMPs and DAMPs to inflammatory diseases at molecular and cellular levels. To this end, my study focuses on recognition and induction of inflammation by PAMPs and DAMPs.

LPS is the best known of PAMP and its inflammatory capacity is no longer to be demonstrated. My results showed that the species of the bacteria and the degree of purification greatly influenced the inflammatory activity of LPS and modulated the receptors involved in this response. Moreover, depending on the animal species stimulated with LPS, this inflammatory response may also vary.

DAMPs are also involved in the installation and sustainability of inflammation, as we have shown for HMGB1. It can be involved in the low-grade inflammation observed in the adipose tissue of obese people, and controlled inflammation via the receptor RAGE. Moreover, the association of DAMPs with certain PAMPs induced an amplification of their pro-inflammatory effects. Thus we have shown that HSP60 can bind to LPS and amplify its inflammatory capacity whereas HSP60 alone has no inflammatory effect.

PAMP and DAMP receptors also play a very important role in the inflammatory response. We have discovered a new potential DAMP and PAMP receptor called CD93. We showed that CD93 was able to interact with PAMP (LPS, bacterial DNA and CpG DNA) but also DAMP (HMGB1 and HSP60).

We have thus demonstrated cellular and molecular mechanisms in the inflammatory response related to DAMP and PAMP. We were also interested in the receptors involved in these mechanisms and even showed a new potential receptor. We hypothesize that CD93 may have a role in inflammatory pathologies by his ability to bind DAMPs and PAMPs. Thus CD93, HMGB1, HSP60 and LPS could be potential therapeutic targets concerning inflammatory diseases.


Key words: DAMP, PAMP, immunity, inflammation, HMGB1, HSP60, LPS, CD93

LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné(e) NATIVEL Brice en ma qualité de doctorant(e) de l'Université de La Réunion, déclare être conscient(e) que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Saint-Denis le : 07/02/2020

Signature :



Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de ces droits.

En conséquence, chaque utilisateur doit :

- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

La contrefaçon et le faux

Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.

L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».

L'article L335_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (...) ».

Le plagiat est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.

Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage...) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur...) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.

Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.