

**ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE**

**UNIVERSITE DE LILLE**

**Habilitation à Diriger des Recherches**

**Présentée par**

**Monsieur Franck RODET**

**Et soutenue**

**Le 7 Juillet 2022**

*La Proprotéine convertase 1/3, enzyme clé du système  
neuroendocrinien, est un régulateur majeur de la réponse immunitaire :  
Un modèle de plasticité fonctionnelle.*

**Membres du Jury:**

<b>Mme. H. CASTEL,</b>	D.R. Inserm,	Inserm U1245 – Université de Rouen,	<b>Rapporteur</b>
<b>Mr. A-M. KHATIB,</b>	D.R. Inserm,	Inserm U1312 – Université de Bordeaux,	<b>Rapporteur</b>
<b>Mr. D. LAUNAY,</b>	Professeur,	Inserm U1286 – Université de Lille,	<b>Rapporteur</b>
<b>Mr. P-L. THARAUX,</b>	D.R. Inserm,	Inserm U970 – PARCC Paris,	<b>Examineur</b>
			<b>Président</b>
<b>Mr. M. SALZET,</b>	Professeur,	Inserm U1192 – Université de Lille,	<b>Garant</b>



*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Mr. le Professeur Michel Salzet, Directeur du Laboratoire PRISM - Inserm U1192 – Université de Lille, pour m’avoir accordé sa confiance tout au long de ces années et de m’avoir emmené avec lui dans cette merveilleuse aventure scientifique. Puisse toute ma gratitude lui être adressée pour le soutien indéfectible dont il m’a toujours gratifié. Que de moments exaltants passés ensemble à discuter, à réfléchir, à analyser ou encore à conceptualiser. Chacun d’entre eux est un moment d’émerveillement, d’apprentissage, de croissance pour moi mais surtout un beau moment d’amitié partagé.*

*J’adresse mes remerciements à Mme. le Professeur Isabelle Fournier, Co-Directrice du Laboratoire PRISM - Inserm U1192 – Université de Lille, pour son amitié, son soutien, sa confiance et sa bienveillance depuis mon arrivée dans l’Unité. Merci notamment d’avoir élargi ma vision scientifique et ainsi d’avoir contribué à ma croissance en tant que chercheur en m’ayant fait découvrir les challenges de l’innovation technologique.*

*Je remercie vivement Mme. la Directrice de Recherche Hélène Castel, Mr. le Directeur de Recherche Abdel-Majid Khatib, Mr. le Professeur David Launay et Mr. le Directeur de Recherche Pierre-Louis Tharaux de me faire l’honneur d’être rapporteurs et examinateur de cette HDR et de me permettre ainsi de bénéficier de leur expertise liée aux travaux dont traite celle-ci.*

*Bien que je présente cette HDR en mon nom, il ne faut pas oublier qu’elle est avant tout le reflet d’un travail collectif réalisé au sein du Laboratoire. J’adresse donc ma gratitude à tous mes collègues du Laboratoire pour avoir partagé mes pas durant ces années et en particulier, les Dr. Marie Duhamel, Pr. Christophe Lefebvre, Dr. Julien Franck, Dr. Maxence Wisztorski, Dr. Mélanie Rose, Dr. Antonella Raffo Romero, Dr. Tristan Cardon, Dr. Nina Ogrinc, Christelle Van Camp et Soulaymane Aboulouard.*

*J’adresse également ma reconnaissance aux étudiants que je co-encadre tels qu’Alice Capuz ou Sylvain Osien ou que j’ai encadrés et qui, de par leur investissement, ont pleinement contribué à l’avancée de mes travaux de recherche.*

*Je remercie fortement nos gestionnaires, Mesdames Lucie Mylondo-Tso et Irène Gadotti, pour leur accompagnement dans nos démarches administratives indispensables au bon fonctionnement de notre activité de recherche.*

*Que Mesdames Nathalie Vasseur et Véronique BARBE soient également remerciées pour assurer notre qualité de vie au sein de notre infrastructure.*

*Toutes mes pensées sont pour ma grande famille. Merci pour votre présence à mes côtés, le soutien et l’Amour indéfectible dont vous me gratifiez en chaque jour. Merci de faire de ma Vie une fête quotidienne en l’illuminant de votre délicieuse présence.*

*Tu n'as de contrôle que sur l'action, jamais sur ses fruits, Ne vis pas pour les fruits de l'action, ne t'attache pas non plus à l'inaction.*

*B.G - II.47*

## Résumé

Alors que des cellules comme les cellules immunitaires étaient auparavant considérées comme différenciées de façon irrévocable, celles-ci peuvent en réalité présenter une plasticité phénotypique. En effet, elles peuvent présenter un phénotype neuroendocrinien partiel ou complet caractérisé par l'expression de marqueurs spécifiques tels que la proprotéine convertase 1/3 (PC1/3). Ainsi, cette enzyme clé du système neuroendocrinien s'avère également être un régulateur majeur de la réponse immunitaire. Au sein du système immunitaire, PC1/3 est exprimée dans les macrophages et elle inhibe la réponse immunitaire afin d'éviter un choc septique. Nous avons donc décidé de décrypter les mécanismes moléculaires qu'elle régule au sein des macrophages. Nous avons pu montrer que les macrophages pour lesquels l'inactivation génique de PC1/3 (PC1/3 KD) a été réalisée présentent des réarrangements du cytosquelette. Ceux-ci sont corrélés à une dérégulation de l'homéostasie calcique. En absence de PC1/3, ces cellules présentent également un remodelage du compartiment endosomal. Il en résulte une sécrétion spontanée plus importante de cytokines pro-inflammatoires. Ceci indique que l'inhibition de PC1/3 dans les macrophages les oriente vers un phénotype pro-inflammatoire. Notons qu'un traitement par du LPS, le ligand du TLR4, intensifie ces changements moléculaires. Suite à cette stimulation, les macrophages PC1/3 KD libèrent des chimiokines capables d'attirer les lymphocytes T CD4+ naïfs humains. Ils sécrètent également des facteurs anti-tumoraux actifs contre des lignées de cellules cancéreuses humaines du sein (SKBR3) et de l'ovaire (SKOV3). Compte tenu de cet effet du LPS, nous avons ensuite cherché à déterminer comment l'absence de PC1/3 impacte la biologie du TLR4. Nous avons pu montrer que dans les macrophages PC1/3 KD, le trafic du TLR4 est altéré. De ce fait, suite à son internalisation, le TLR4 est plus rapidement réexprimé à la surface cellulaire de ces cellules. Il en résulte une activation prolongée de la voie dépendante de MYD88 et ainsi de la voie pro-inflammatoire NF $\kappa$ B. En revanche, les macrophages PC1/3 KD résistent à l'effet inhibiteur de l'IL-10 et présentent une inhibition de la voie anti-inflammatoire associée STAT3. En outre, l'impact de l'inhibition de PC1/3 dans les macrophages ne se limite pas au TLR4 puisque la biologie du récepteur endosomal TLR9 est également altérée dans ces macrophages. En effet, dans les macrophages PC1/3 KD, le trafic du TLR9 est accru et celui-ci s'agrège dans les corps multi-vésiculaires. Il en résulte une activation plus précoce de la voie pro-inflammatoire NF $\kappa$ B et ainsi une libération plus importante de cytokines pro-inflammatoires. Cette altération du trafic du TLR9 pourrait être liée à une diminution des taux protéiques de GRAMD4, protéine connue pour inhiber le cheminement intracellulaire de ce récepteur. Ainsi, PC1/3 inhibe la réponse immunitaire en régulant le trafic intracellulaire du TLR4 et du TLR9. Son activation pourrait donc être favorable dans le cas des maladies autoimmunes dans lesquelles le TLR9 est impliqué. Au contraire, son inhibition combinée à l'activation de TLRs pourrait être une stratégie anti-tumorale efficace en permettant l'orientation des macrophages ayant infiltré la tumeur vers un phénotype pro-inflammatoire et anti-tumoral.

## Abstract

Cells such as immune cells were previously considered to be irrevocably differentiated. However, their phenotypic plasticity has already been observed. Indeed, when appropriately stimulated, they can display a partial or full neuroendocrine phenotype characterized by the expression of specific markers such as proprotein convertase 1/3 (PC1/3). This key enzyme of the neuroendocrine system has also been found to be a major regulator of the immune response. Within the immune system, PC1/3 is expressed in macrophages and inhibits the immune response to prevent septic shock. Therefore, we decided to decipher the molecular mechanisms regulated by PC1/3 in macrophages. Down-regulation of PC1/3 (PC1/3 KD) in these cells impacted cytoskeleton organization. This perturbation was correlated with a deregulation of calcium homeostasis. In the absence of PC1/3, these cells also displayed a remodelling of the endosomal compartment. As a result, PC1/3 KD macrophages spontaneously released pro-inflammatory cytokines. This indicated that inhibition of PC1/3 in macrophages oriented them towards a pro-inflammatory phenotype. It is noteworthy that a treatment with LPS, the TLR4 ligand, intensified these molecular changes. Following this stimulation, PC1/3 KD macrophages released chemokines recruiting naïve T helper lymphocytes (CD4+). They also secreted anti-tumor factors active against human breast (SKBR3) and ovarian (SKOV3) cancer cell lines. Since stronger effects were registered in PC1/3-KD cells after LPS challenge, we suspected that PC1/3 may regulate the biology of TLR4. We demonstrated that intracellular trafficking of TLR4 was altered in PC1/3 KD cells. As a result, these macrophages treated with LPS showed a quicker re-expression of TLR4 at the cell surface. This led to prolonged activation of the MYD88-dependent pathway and thus the NF $\kappa$ B pro-inflammatory pathway. In contrast, PC1/3 KD macrophages exhibited resistance to inhibitory effect of IL-10 and the anti-inflammatory STAT3 pathway was downregulated. Furthermore, we found that the regulation exerted by PC1/3 on TLR biology was not restricted to TLR4. In PC1/3 KD macrophages, intracellular trafficking of endosomal TLR9 was also altered and TLR9 aggregated in multivesicular bodies. Consequently, the pro-inflammatory NF $\kappa$ B pathway was more rapidly activated and PC1/3 KD cells secreted more pro-inflammatory cytokines than normal macrophages. This alteration may be related to a decrease of GRAMD4 level, a protein known to inhibit intracellular trafficking of TLR9. Altogether, our results demonstrate that PC1/3 regulates the intracellular trafficking of TLR4 and TLR9 to inhibit the immune response. In the case of autoimmune diseases, PC1/3 activation could be therefore a relevant therapeutic strategy since TLR9 is involved. On the contrary, PC1/3 inhibition combined with TLR activation could be a promising strategy to reorient tumour-associated macrophages towards a pro-inflammatory and anti-tumor phenotype.

# *Sommaire*

<b>Curriculum vitæ.</b>	<b>15</b>
<b><u>Partie I : Introduction générale.</u></b>	<b>25</b>
<b>I.1- Critères retenus pour établir la nature neuroendocrine d'une cellule.</b>	<b>27</b>
<b>I.2- L'évolution du concept de cellules neuroendocrines.</b>	<b>28</b>
<b>I.3- Une fonction peut en cacher une autre.</b>	<b>29</b>
<b><u>Partie II : Présentation et analyse critique de l'activité de recherche.</u></b>	<b>30</b>
<b>II.1- Généralités sur la proprotéine convertase 1/3 (PC1/3).</b>	<b>31</b>
II.1.1- Structure de PC1/3.	31
II.1.2- Maturation du zymogène en enzyme active.	32
II.1.3- Régulation de l'activité enzymatique de PC1/3.	33
II.1.4- Pathologies associées à PC1/3.	34
II.1.5- PC1/3 et la réponse immunitaire.	34
<b>II.2- Conséquences moléculaires de l'inhibition de PC1/3 au sein des macrophages.</b>	<b>37</b>
II.2.1- Les macrophages PC1/3 KD présentent des réarrangements du cytosquelette qui sont corrélés à une dérégulation de l'homéostasie calcique.	37
II.2.2- En absence de PC1/3, les macrophages présentent un remodelage du compartiment endosomal.	40
II.2.3- Les macrophages PC1/3 KD sécrètent une quantité plus importante d'alarmines et de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires.	41
II.2.4- Suite à une stimulation par du LPS, les macrophages PC1/3 KD continuent d'exprimer à leur surface cellulaire le marqueur pro-inflammatoire CD86.	42
II.2.5- Le sécrétome de macrophages PC1/3 KD traités au LPS exerce un effet chimiotactique très fort sur des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> naïfs humains.	44
II.2.6- Les macrophages PC1/3 KD traités au LPS sécrètent des facteurs anti-tumoraux actifs contre des lignées de cellules cancéreuses humaines du sein (SKBR3) et de l'ovaire (SKOV3).	45

## **II.3- PC1/3 régule le trafic intracellulaire du TLR4 et ainsi l'activation de la voie dépendante de MYD88.**

**48**

II.3.1- Rappels sur les voies de signalisation associées au TLR4. **48**

II.3.2- En absence de PC1/3, la voie NF $\kappa$ B est plus longuement activée ce qui indique un recrutement plus important de la voie dépendante de MYD88. **51**

II.3.3- Suite à son internalisation, le TLR4 est plus rapidement réexprimé à la surface cellulaire des macrophages PC1/3 KD. **53**

II.3.4- PC1/3 est impliquée dans le contrôle du trafic intracellulaire du TLR4. **55**

II.3.5- Les taux de transcrits codant le TLR4 diminuent dans les macrophages NT et PC1/3 KD traités au LPS. **56**

II.3.6- Etude de la localisation intracellulaire de MYD88 dans les macrophages NT et PC1/3 KD traités au LPS. **57**

II.3.7- Après 6 h de stimulation au LPS, le taux protéique de MYD88 est plus élevé dans les macrophages PC1/3 KD. **58**

II.3.8- Quantification des taux de transcrits Myd88 dans les macrophages NT et PC1/3 KD traités au LPS. **60**

II.3.9- En absence de PC1/3, les macrophages résistent à l'effet inhibiteur de l'IL-10 et présentent une inhibition de la voie anti-inflammatoire associée STAT3. **61**

II.3.10- Discussion. **66**

## **II.4- PC1/3 régule le trafic intracellulaire du TLR9 et ainsi l'activation de la voie pro-inflammatoire NF $\kappa$ B.**

**71**

II.4.1- Rappels sur le trafic intracellulaire du TLR9 et la voie de signalisation qui lui est associée. **71**

II.4.2- Les macrophages péritonéaux isolés de souris PC1/3 KO synthétisent et sécrètent des quantités plus importantes de TNF- $\alpha$  et d'IL-6. **74**

II.4.3- Suite à un traitement au CpG-ODN, les macrophages PC1/3 KD seraient orientés vers un phénotype pro-inflammatoire plus marqué. **75**

II.4.4- Suite à un traitement au CpG-ODN, l'activation de la voie NF $\kappa$ B survient plus rapidement dans les macrophages PC1/3 KD. **76**

II.4.5- La voie anti-inflammatoire STAT3 est réprimée dans les macrophages PC1/3 KD. **78**



II.4.6- Le traitement des macrophages NR8383 WT avec du CpG-ODN induit le clivage et l'activation de PC1/3.	79
II.4.7- Le traitement des macrophages NR8383 WT avec du CpG-ODN induit la translocation de PC1/3 vers les endosomes.	81
II.4.8- Suite à un traitement au CpG-ODN, PC1/3 et le TLR9 cheminent vers les mêmes endosomes à pH acide.	82
II.4.9- PC1/3 ne contrôle pas l'activation du TLR9 par son clivage protéolytique.	85
II.4.10- PC1/3 régule le trafic intracellulaire du TLR9.	86
II.4.11- PC1/3 ne clive pas UNC93B1.	88
II.4.12- PC1/3 régule les taux protéiques de GRAMD4 et d'une forme tronquée de GRAMD4 (S-GRAMD4).	90
II.4.13- Estimation des niveaux protéiques de NOGO-B2 dans les macrophages NT et PC1/3 KD traités au CpG-ODN.	92
II.4.14- Discussion.	93
<b>II.5- Conclusion générale.</b>	<b>99</b>
<b>II.6- Perspectives.</b>	<b>102</b>
<b>II.7- Références bibliographiques.</b>	<b>108</b>
<b><u>Partie III : Activité d'encadrement développée.</u></b>	<b>120</b>
<b><u>Partie IV : Liste et tirés à part des publications significatives.</u></b>	<b>130</b>

## Répertoire des figures

- Figure 1** : Localisations principales des cellules neuroendocrines. **26**
- Figure 2** : Structure du zymogène PC1/3. **31**
- Figure 3** : Maturation du zymogène PC1/3 en enzyme active. Les sites de clivages protéolytiques sont indiqués par les triangles noirs. **33**
- Figure 4** : Les macrophages PC1/3 KD présentent des réarrangements du cytosquelette. **38**
- Figure 5** : Les macrophages PC1/3 KD présentent une dérégulation de l'homéostasie calcique. **39**
- Figure 6** : Profils de sécrétion cytokinique et chimiokinique des macrophages NT et PC1/3 KD stimulés ou non pendant 24 h avec 200 ng/mL de LPS. **42**
- Figure 7** : Après un traitement au LPS, les macrophages PC1/3 KD continuent d'exprimer le marqueur pro-inflammatoire CD86 à leur surface cellulaire alors qu'il disparaît dans les cellules NT. **43**
- Figure 8** : Le sécrétome de macrophages PC1/3 KD traités au LPS exerce un effet chimiotactique très fort sur des lymphocytes T CD4+ naïfs humains. **44**
- Figure 9** : Le sécrétome des cellules NR8383 PC1/3-KD présente des activités anti-tumorales contre les cellules SKBR3 et SKOV3. **46**
- Figure 10** : (A) Structure du TLR4. (B) Voies de signalisation associées au TLR4. **48**
- Figure 11** : Représentation schématique de la protéine MYD88 avec le site potentiel de clivage pour les proprotéines convertases dans le domaine TIR. **49**
- Figure 12** : Analyse par Western blot des voies de signalisation associées au TLR4. **51**
- Figure 13** : PC1/3 pourrait contrôler l'activation de la voie de signalisation associée au TLR4 par le clivage de MYD88. **53**
- Figure 14** : Suite à son internalisation, le TLR4 est plus rapidement réexprimé à la surface cellulaire des macrophages PC1/3 KD stimulés au LPS. **54**
- Figure 15** : PC1/3 est impliquée dans le contrôle du trafic intracellulaire du TLR4. **55**
- Figure 16** : Les taux de transcrits codant le TLR4 diminuent dans les macrophages NT et PC1/3 KD traités au LPS. **57**
- Figure 17** : PC1/3 ne contrôle pas la localisation de MYD88. **58**
- Figure 18** : Après 6 h de stimulation au LPS, le taux protéique de MYD88 est plus élevé dans les macrophages PC1/3 KD. **59**
- Figure 19** : Profils de sécrétion cytokinique et chimiokinique des macrophages NT et PC1/3 KD sous condition inhibitrice. **62**

<b>Figure 20</b> : La voie anti-inflammatoire STAT3 est réprimée dans les macrophages PC1/3 KD traités ou non avec de l'IL-10.	<b>63</b>
<b>Figure 21</b> : Etude de la dégradation d'IKBA après un traitement à l'IL-10.	<b>64</b>
<b>Figure 22</b> : Après un traitement à l'IL-10, les macrophages PC1/3 KD présentent des taux plus faibles d'Arginase.	<b>65</b>
<b>Figure 23</b> : Représentation schématique décrivant comment l'inactivation de PC1/3 dans les macrophages impacte la biologie du TLR4.	<b>70</b>
<b>Figure 24</b> : Trafic intracellulaire du TLR9.	<b>72</b>
<b>Figure 25</b> : Après un traitement au CpG-ODN, les macrophages péritonéaux isolés de souris PC1/3 KO synthétisent et sécrètent des quantités plus importantes de TNF- $\alpha$ (a et b) et d'IL-6 (c et d).	<b>74</b>
<b>Figure 26</b> : Profils de sécrétion cytokinique et chimiokinique des macrophages NT et PC1/3 KD après un traitement au CpG-ODN.	<b>76</b>
<b>Figure 27</b> : Etude de la dégradation d'IKBA au cours du temps après un traitement au CpG-ODN.	<b>77</b>
<b>Figure 28</b> : La voie anti-inflammatoire STAT3 est réprimée dans les macrophages PC1/3 KD.	<b>78</b>
<b>Figure 29</b> : Etude de l'activation de PC1/3 et du TLR9 lors d'un traitement au CpG-ODN.	<b>80</b>
<b>Figure 30</b> : Une stimulation avec du CpG-ODN déclenche le trafic intracellulaire de PC1/3.	<b>82</b>
<b>Figure 31</b> : PC1/3 et le TLR9 transloquent dans les mêmes structures vésiculaires dès le début d'un traitement avec du CpG-ODN.	<b>83</b>
<b>Figure 32</b> : La bafilomycine A1 abolit la co-localisation entre PC1/3 et le TLR9 qui était observée suite à un traitement avec du CpG-ODN.	<b>84</b>
<b>Figure 33</b> : PC1/3 ne contrôle pas l'activation du TLR9 par son clivage protéolytique.	<b>85</b>
<b>Figure 34</b> : PC1/3 régule la localisation intracellulaire du TLR9.	<b>86</b>
<b>Figure 35</b> : En absence de PC1/3, le TLR9 s'agrège au niveau des corps multi-vésiculaires (MVB) suite à un traitement avec du CpG-ODN.	<b>87</b>
<b>Figure 36</b> : UNC93B1 et GRAMD4 présentent des sites potentiels de clivage pour les proprotéines convertases au niveau de leurs extrémités N-terminales.	<b>88</b>
<b>Figure 37</b> : Dans les macrophages NR8383 NT, UNC93B1 et le TLR9 transitent ensemble suite à un traitement avec du CpG-ODN.	<b>89</b>
<b>Figure 38</b> : Aucune variation significative des taux protéiques d'UNC93B1 n'a été observée dans les cellules NT et PC1/3 KD suite à un traitement avec du CpG-ODN.	<b>90</b>

- Figure 39** : Après 1 h de traitement avec du CpG-ODN, les cellules PC1/3 KD présentent des taux protéiques de GRAMD4 et S-GRAMD4 plus faibles. **91**
- Figure 40** : Aucune variation significative des taux protéiques de NOGO-B2 n'a été observée dans les cellules NT et PC1/3 KD suite à un traitement avec du CpG-ODN. **93**
- Figure 41** : La forme courte de GRAMD4 (S-GRAMD4) pourrait réguler le trafic intracellulaire du TLR9 vers les endosomes de signalisation. **96**
- Figure 42** : Représentation schématique décrivant comment l'inactivation de PC1/3 dans les macrophages impacte la biologie du TLR9. **98**
- Figure 43** : Maturation du zymogène PC1/3 en enzyme active dans le système (neuro)endocrinien et dans le système immunitaire. **99**
- Figure 44** : Recherche des partenaires de PC1/3 par purification par affinité. **103**
- Figure 45** : Recherche des cibles potentielles de PC1/3 par une approche de N-terminome. **104**
- Figure 46** : Etude par BioID de l'impact de l'inhibition de PC1/3 sur les interactomes du TLR4 et du TLR9. **106**

## Abréviations utilisées

**AP-3** : Protéine adaptatrice 3

**ARP2/3** : Actin Related Protein 2/3

**CD4** : Cluster de différenciation 4

**CD8** : Cluster de différenciation 8

**CD14** : Cluster de différenciation 14

**CD86** : Cluster de différenciation 86

**DD** : Domaine de mort N-terminal de MYD88

**ERC** : Endosome de recyclage

**FSH** : Follicle Stimulating Hormone

**GHRH** : Growth Hormone-Releasing Hormone

**GnRH** : Gonadotropin-Releasing Hormone

**GRAMD4** : Glucosyltransferases, Rab-like GTPase activators and myotubularins (GRAM) domain containing 4

**ID** : Domaine intermédiaire de MYD88

**IL-1 $\beta$**  : Interleukine 1 beta

**IL-6** : Interleukine 6

**IL-10** : Interleukine 10

**IL-12p70** : Interleukine 12p70

**IL1RAP** : Interleukin-1 receptor accessory protein

**IFN- $\gamma$**  : Interféron gamma

**iNOS** : Oxyde nitrique synthase inductible

**JAK** : Janus Kinase

**kDa** : Kilodalton

**LBP** : LPS binding protein

**LH** : Luteinizing Hormone

**LPS** : Lipopolysaccharides

**LRR** : Leucine Rich Repeat

**LT** : Lymphocytes T

**MYD88** : Myeloid differentiation primary response gene 88

**NK** : Lymphocytes Natural Killer

**NO** : Oxyde nitrique

**NOGO-B2** : Isoforme B2 de la protéine réticulon-4

**NT** : NR8383 Non-target

**PACE4** : Paired basic amino acid cleaving enzyme 4

**PC1/3** : Proprotéine convertase 1/3

**PC1/3 KD** : NR8383 PC1/3 Knockdown

**PC2** : Proprotéine convertase 2

**PC4** : Proprotéine convertase 4

**PC5/6** : Proprotéine convertase 5/6

**PC7** : Proprotéine convertase 7

**PCSK9** : Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9

**RE** : Réticulum endoplasmique

**SKI-1/S1P** : Subtilisin kexin isozyme-1/site-1 protease

**SNE** : Système neuroendocrinien

**SNED** : Système neuroendocrinien diffus

**STAT** : Signal transducer and activator of transcription

**STAT1** : Signal transducer and activator of transcription 1

**STAT3** : Signal transducer and activator of transcription 3

**TGN** : Réseau trans-golgien

**TIR** : Toll Interleukin 1 Receptor

**TLR4** : Toll-like receptor 4

**TM** : Domaine transmembranaire

**TNF- $\alpha$**  : Facteur de nécrose tumorale alpha

**TRAM** : TRIF-related adaptator molecule

**TRIF** : TIR-domain-containing protein adaptator inducing IFN- $\beta$

**WASP** : Protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich

**WT** : Type sauvage

# *Curriculum vitæ*



## RODET Franck

Né le 07/07/78 à Ploemeur

[orcid.org/0000-0002-7612-0282](https://orcid.org/0000-0002-7612-0282)

ResearcherID :M-9220-2018

[franck.rodet@univ-lille.fr](mailto:franck.rodet@univ-lille.fr)

### I-Synthèse de carrière

#### Titres scientifiques

**Docteur en Biologie cellulaire et moléculaire.**

#### Cursus

04/2006–06/2008 : **Post-doctorat**, INSERM U690, Hôpital R.Debré Paris, supervisé par Dr. N. de Roux.

01/2006-03/2006 : **Post-doctorat**, Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines – UMR IFREMER 100 « Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins » - Université de Caen, supervisé par Pr. P. Favrel.

12/2005 : **Docteur en Biologie cellulaire et moléculaire**, Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines – UMR IFREMER 100 « Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins » - Université de Caen, supervisé par Pr. P. Favrel.

2001 : **DEA en Biologie Intégrée des Invertébrés**. Université Paris VI - *Classement: 3/19 Mention Bien*

2000 : **Maîtrise de Biologie cellulaire et Physiologie**. Université de Caen - *Classement: 1/37 Mention Bien*

1997 – 1999 : **Licence générale de Biologie et Géologie**. Université de Caen - *Classement: 9/127 – Mention Assez-Bien*

1996 : **Baccalauréat Scientifique**. Lycée Beaussier, La Seyne/Mer (83)

#### Situation actuelle

Depuis 2008 : **Maître de conférences** au Laboratoire PRISM « Protéomique, Réponse Inflammatoire, Spectrométrie de Masse », INSERM U1192 - Université de Lille.

#### Fonctions

##### Maître de conférences

**Recherches sur :** (i) La production d'anticorps par les cellules neurales (Projet Regenesis – Nobody) et (ii) Le développement d'une thérapie anti-tumorale combinant l'inhibition de PC1/3 et la stimulation de TLRs afin de réactiver les macrophages présents sur le site tumoral (Projet MacBeth).

**Enseignant** en Biologie animale, Biologie cellulaire, Immunologie, Ingénierie des acides nucléiques.

## Notes sur la carrière :

- 1- Obtention d'un **CRCT** en 2012.
- 2- Depuis 2012 : **Expérimentation animale de Niveau 1.**

## II-Production scientifique

### Publications

#### Articles dans des revues internationales à comité de lecture

- 1- Rose M, Duhamel M, Aboulouard S, Kobeissy F, Tierny D, Fournier I, **Rodet F**, Salzet M. (2022) Therapeutic anti-glioma effect of the combined action of PCSK inhibitor with the anti-tumoral factors secreted by Poly (I:C)-stimulated macrophages. *Cancer Gene Ther.* 2021 Jan 5. doi: 10.1038/s41417-020-00286-1.
- 2- Cardon T, Ozcan B, Aboulouard S, Kobeissy F, Duhamel M, **Rodet F**, Fournier I, Salzet M. (2020) Epigenetic Studies Revealed a Ghost Proteome in PC1/3 KD Macrophages under Antitumoral Resistance Induced by IL-10. *ACS Omega.* 2020, 5, 43, 27774-27782.
- 3- Rose M, Duhamel M, Aboulouard S, Kobeissy F, Le Rhun E, Desmons A, Tierny D, Fournier I, **Rodet F**, Salzet M. (2020) The Role of a Proprotein Convertase Inhibitor in Reactivation of Tumor-Associated Macrophages and Inhibition of Glioma Growth. *Mol Ther Oncolytics.* 2020 Mar 31;17:31-46.

#### Auteur Co-correspondant

- 4- **Rodet F**, Capuz A, Ozcan BA, Le Beillan R, Raffo-Romero A, Kobeissy F, Duhamel M, Salzet M. (2019) PC1/3 KD Macrophages Exhibit Resistance to the Inhibitory Effect of IL-10 and a Higher TLR4 Activation Rate, Leading to an Anti-Tumoral Phenotype. *Cells.* 2019 Nov 22;8(12):1490.

#### Auteur Co-correspondant

- 5- Quanico J, Hauberg-Lotte L, Devaux S, Laouby Z, Meriaux C, Raffo-Romero A, Rose M, Westerheide L, Vehmeyer J, **Rodet F**, Maass P, Cizkova D, Zilka N, Cubinkova V, Fournier I, Salzet M. (2018) 3D MALDI mass spectrometry imaging reveals specific localization of long-chain acylcarnitines within a 10-day time window of spinal cord injury. *Sci Rep.* 2018 Oct 31;8(1):16083.
- 6- Duhamel M, Rose M, **Rodet F**, Murgoci AN, Zografidou L, Régnier-Vigouroux A, Vanden Abeele F, Kobeissy F, Nataf S, Pays L, Wisztorski M, Cizkova D, Fournier I, Salzet M. (2018) Paclitaxel treatment and PC1/3 knockdown in macrophages is a promising anti-glioma strategy as revealed by proteomics and cytotoxicity studies. *Mol Cell Proteomics.* 2018 Jun;17(6):1126-1143.
- 7- **Rodet F**<sup>\*</sup>, Duhamel M<sup>\*</sup>, Murgoci AN, Desjardins R, Gagnon H, Wisztorski M, Fournier I, Day R, Salzet M. (2016) The proprotein convertase PC1/3 regulates TLR9 trafficking and the associated signaling pathways. *Sci Rep.* 2016 Jan 18;6:19360. (\* co-premier)
- 8- Duhamel M, **Rodet F**, Delhem N, Vanden Abeele F, Kobeissy F, Nataf S, Pays L, Desjardins R, Gagnon H, Wisztorski M, Fournier I, Day R, Salzet M. (2015) Molecular Consequences of Proprotein Convertase 1/3 (PC1/3) Inhibition in Macrophages for Application to Cancer Immunotherapy: A Proteomic Study. *Mol Cell Proteomics.* 2015 Nov;14(11):2857-77.

**9- Rodet F**, Tasiemski A, Boidin-Wichlacz C, Van Camp C, Vuillaume C, Slomianny C, Salzet M. (2015) Hm-MyD88 and Hm-SARM: two key regulators of the neuroimmune system and neural repair in the medicinal leech. *Sci Rep.* 2015 Apr 16;5:9624.

#### **Auteur Correspondant**

**10-** Tasiemski A, Massol F, Cuvillier-Hot V, Boidin-Wichlacz C, Roger E, **Rodet F**, Fournier I, Thomas F, Salzet M. (2015) Reciprocal immune benefit based on complementary production of antibiotics by the leech *Hirudo verbana* and its gut symbiont *Aeromonas veronii*. *Sci Rep.* 2015 Dec 4;5:17498.

#### **Publications liées au travail de Thèse**

**11-** Bigot L, Zatylny-Gaudin C, **Rodet F**, Bernay B, Boudry P, Favrel P. (2012) Characterization of GnRH-related peptides from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Peptides* 34(2):303-10.

**12- Rodet F.**, Lelong C., Dubos M.P., Favrel P. (2008) Alternative splicing of a single precursor mRNA generates two subtypes of gonadotropin-releasing hormone receptor orthologues and their variants in the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Gene* 414 : 1-9.

**13-** Lelong C., Badariotti F., Le Quere H., **Rodet F.**, Dubos M.P., Favrel P. (2007) Cg-TGF-beta, a TGFbeta/activin homologue in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*, is involved in immunity against Gram-negative microbial infection. *Dev. Comp. Immunol.* 31(1): 30-38

**14- Rodet F.**, Lelong C., Dubos M.P., Costil K., Favrel P. (2005) Molecular cloning of a molluscan orthologous GnRH receptor specifically expressed in the gonad. *Biochim. Biophys. Acta.* 1730(3): 187-195.

**15-** Herpin A., Badariotti F., **Rodet F.**, Favrel P. (2004) Molecular Characterization of a New Leucine-Rich Repeat-Containing G Protein-coupled receptor (LGR) from a Lophotrochozoan Invertebrate: Evolutionary Implications. *Biochim. Biophys. Acta.* 1680(3): 137-144.

**16-** Dubos M.P., Badariotti F. **Rodet F.**, Lelong C., Favrel P. (2003) Molecular and physiological characterisation of an invertebrate homologue of a calcitonin-related receptor. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 310 : 972-978.

**17-** Minier C., Lelong C., Djemel N., **Rodet F.**, Tutundjian R., Favrel P., Mathieu M., Leboulanger F. (2002) Expression and activity of a multixenobiotic resistance system in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Environ Res.* 54(3-5):455-9.

#### **Revue dans des revues internationales à comité de lecture**

**1-** Rose M, Duhamel M, **Rodet F**, Salzet M (2021) The Role of Proprotein Convertases in the Regulation of the Function of Immune Cells in the Oncoimmune Response. *frontiers in Immunology* Volume 12 – Article 667850.

**2- Rodet F**, Capuz A, Hara T, van Meel R, Duhamel M, Rose M, Raffo Romero A, Fournier I, Salzet M (2018) Deciphering Molecular Consequences of the Proprotein Convertase 1/3 Inhibition in Macrophages for Application in Anti-tumour Immunotherapy. *Journal of Biotechnology* 282 :80-85.

#### **Auteur Correspondant**

**3-** Cizkova D, Quanico J, Kanoub MA, Zahiri F, **Rodet F**, Murgoci AN, Cubinkova V, Fournier I, Salzet M (2018) **Shedding New Light on Spinal Cord Injury via a Spatio- Temporal Proteomic and Physiological Approaches.** *Annals of Trauma & Acute Care*, 2018 | Volume 2 | Issue 1 | Article 1007.

4- Duhamel M, **Rodet F**, Murgoci AN, Wisztorski M, Day R, Fournier I, Salzet M (2016) Proprotein convertase 1/3 inhibited macrophages: A novel therapeutic based on drone macrophages. *EuPA Open Proteomics* 11 (2016) 20–22.

#### **Revue liée au Post-Doctorat**

5- **Rodet F.**, Huijbregts L., Villanueva C., Villoing L., Jacquier S., de Roux N. (2008) Le couple Kisspeptine/GPR54, un acteur majeur de la régulation neuroendocrine de la reproduction. *Mt Médecine de la reproduction, Gynécologie Endocrinologie* 10(2) : 1-8.

#### **Proceedings avec actes de congrès dans des journaux à comité de lecture**

1- Salzet M, Quanico J, Cizkova D, Karnoub MA, Laouby Z, Mériaux C, Murgoci AN, **Rodet F**, Fournier I (2018) Shedding new light on spinal cord injury *Journal of Biotechnology* Volume 280, Supplement, 30 August 2018, Page S4.

2- Salzet M, Duhamel M, **Rodet F**, Wisztorski M, Fournier I (2016) Proprotein convertase 1/3 inhibited macrophages: A novel therapeutic based on drone macrophages. *Abstracts / Journal of Biotechnology* 231S (2016) S4–S109.

#### **Proceeding lié au Post-Doctorat**

3- **Rodet F**, Lemardeley G, Zizzari P, Aumas C, Bluet-Pajot MT, de Roux N (2006) Le peptide kiss-1 module la sécrétion de la LH lors d'une stimulation de l'hypophyse par la GnRH. *Annales d'Endocrinologie* Volume 67, Issue 5, October 2006, Page 394.

#### **Couvertures de journaux dans des revues internationales à comité de lecture**

**PRISM made the cover of ACS Omega (ACS Publications, IF 2.87) in November 2020** for its publication on Epigenetic Studies Revealed a Ghost Proteome in PC1/3 KD Macrophages under Antitumoral Resistance Induced by IL-10 : Cardon T, Ozcan B, Aboulouard S, Kobeissy F, Duhamel M, **Rodet F**, Fournier I, Salzet M. (2020) *Epigenetic Studies Revealed a Ghost Proteome in PC1/3 KD Macrophages under Antitumoral Resistance Induced by IL-10*. *ACS Omega*. 2020, 5, 43, 27774-27782.

**PRISM made the cover of Molecular Therapy Oncolytics (Cell Press, IF 4.115) in June 2020** for its publication on The Role of a Proprotein Convertase Inhibitor in Reactivation of Tumor-Associated Macrophages and Inhibition of Glioma Growth : Rose M, Duhamel M, Aboulouard S, Kobeissy F, Le Rhun E, Desmons A, Tierny D, Fournier I, **Rodet F**, Salzet M. (2020) *The Role of a Proprotein Convertase Inhibitor in Reactivation of Tumor-Associated Macrophages and Inhibition of Glioma Growth*. *Mol Ther Oncolytics*. 2020 Mar 31;17:31-46.

**PRISM made the cover of Molecular and Cellular Proteomics (IF 6.56) in November 2015** for its publication on the Molecular Consequences of Proprotein Convertase 1/3 (PC1/3) Inhibition in Macrophages for Application to Cancer Immunotherapy : A Proteomic Study : Duhamel M, **Rodet F**, Delhem N, Vanden Abeele F, Kobeissy F, Nataf S, Pays L, Desjardins R, Gagnon H, Wisztorski M, Fournier I, Day R, Salzet M. (2015) *Molecular Consequences of Proprotein Convertase 1/3 (PC1/3)*

Inhibition in Macrophages for Application to Cancer Immunotherapy: A Proteomic Study. Mol Cell Proteomics. 2015 Nov;14(11):2857-77.

## Conférences

### Conférences sur invitation lors de congrès internationaux

MACBETH: Macrophage Boost Environment Therapy. **Rodet F**, Duhamel M, Murgoci AN, Rose M, Wisztorski M, Fournier I and Salzet M. JRC-EC-CEI- ICGEB European Workshop on "Smart Specialization Strategy in the Field of Biotechnologies in Europe: A Challenge for CEE Region". Bratislava - 4<sup>th</sup>-6<sup>th</sup> September 2017.

### Communications orales lors de congrès internationaux

**1-** The proprotein convertase PC1/3 regulates TLR9 trafficking and the associated signaling pathways. **Rodet F**, Duhamel M, Murgoci AN, Desjardins R, Gagnon H, Wisztorski M, Fournier I, Day R and Salzet M. 13<sup>th</sup> International Conference on Innate Immunity - Rhodes – 23/06/16 – 28/06/16.

**2-** *Hm-MyD88* and *Hm-SARM*: Two key regulators of the neuroimmune system and neural repair in the medicinal leech. **Rodet F**, Tasiemski A, Boidin-Wichlacz C, Van Camp C, Vuillaume C, Slomianny C, Salzet M. Immuninv, Lille, 9-11/12/15.

### Communications orales par les Doctorants co-encadrés

#### Congrès internationaux

**1-** Euron 21/01/21 : « Do Neural cells produce real antibodies ? » Capuz A, Osien S, Laurent E, Fournier I, Rodet F, Salzet M

**2-** Euron 21/01/21 : « Heimdall, une protéine impliquée dans le changement phénotypique des astrocytes. » Osien S, Rodet F, Salzet M

**3-** - Euron, Université du Luxembourg, Luxembourg, 23-25.09.2019 : « Macrophages Reactivation in Glioma through Proprotein Convertases inhibition associated with TLR3 activation. » Rose M, Duhamel M, Fournier I, Rodet F, Salzet M.

**4-** - EuPA, Saint Jacques de Compostelle, Espagne, 16-20.04.2018 : «Macrophages reactivation inside glioma microenvironments through PC1/3 inhibition associated with TLR3 activation.» Rose M, Duhamel M, Fournier I, Rodet F, Salzet M.

#### Congrès nationaux et régionaux

**1-** SFR-TSM, Lille 14.12.2020 : « Do Neural Cells Produce True Antibodies? » Capuz A, Osien S, Laurent E, Fournier I, Rodet F, Salzet M

**2-** SFR-TSM, Lille 14.12.2020 : « Heimdall, une protéine impliquée dans le changement phénotypique des astrocytes. » Osien S, Rodet F, Salzet M

**3-** 14ème journées du Club Jeunes de la SFEAP, Rennes 18-20.04.2018 : «Macrophages reactivation inside glioma microenvironments through PC1/3 inhibition associated with TLR3 activation.» Rose M, Duhamel M, Fournier I, Rodet F, Salzet M.

#### **Communications affichées par les Doctorants co-encadrés dans des congrès nationaux et régionaux**

**1-** SFR-TSM, Lille 09.12.2019 : « Antibody production by non-immune cells » Capuz A, Osien S, Fournier I, **Rodet F**, Salzet M

**2-** SFR-TSM, Lille 09.12.2019 : «Heimdall, an alternative protein implied in the phenotypic change of astrocytes» Osien S, Capuz A, Cardon T, Laouby Z, Trerotola M, Damato M, **Rodet F**, Salzet M

**3-** SFR-TSM, Lille 09.12.2019 : «Mixed Spheroid for the Study of Macrophages Reactivation inside Glioma through Proprotein Convertase 1/3 Inhibition Associated with TLR3 Activation.» Rose M, Duhamel M, Fournier I, **Rodet F**, Salzet M

**4-** SFR-TSM, Lille 10.12.2018 : «Mixed Spheroid for the Study of Macrophages Reactivation inside Glioma through Proprotein Convertase 1/3 Inhibition Associated with TLR3 Activation.» Rose M, Duhamel M, Fournier I, **Rodet F**, Salzet M

**5-** ITMO, Paris 8-9 10.2018. : «Mixed Spheroid for the Study of Macrophages Reactivation inside Glioma through Proprotein Convertase 1/3 Inhibition Associated with TLR3 Activation.» Rose M, Duhamel M, Fournier I, **Rodet F**, Salzet M

#### **Distinctions**

##### **Obtenue au cours du Doctorat**

**Prix de poster : XXXI<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Neuroendocrinologie et 7<sup>ème</sup> congrès du réseau LARC–Neurosciences 2003.** Paris 15 - 17 Septembre 2003. Molecular cloning of receptors structurally and evolutionary related to vertebrate GnRH receptors from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*.

#### **Interventions pour des Expertises Scientifiques**

##### **Président de COS et membre de COS**

**A- Président du COS** pour le poste 65-MCF-0242 de la Faculté de Médecine de l'Université de Lille. Campagne d'emplois des enseignants-chercheurs - Rentrée 2021.

**B- Membre du COS** pour le poste 68-MCF-1029 de la Faculté des Sciences et Technologies de l'Université de Lille. Campagne d'emplois des enseignants-chercheurs - Rentrée 2018.

**C- Membre du COS** pour le poste 66-MCF-1704 de l'Université de Lille 1. Campagne d'emplois des enseignants-chercheurs - Rentrée 2014.

#### Evaluateur externe du Conseil Académique restreint (CAC-r) de l'Université de Lille

Evaluateur du CAC-r de l'Université de Lille pour la campagne d'avancement des enseignants-chercheurs de 2020.

#### Reviewer pour des revues internationales à comité de lecture

Reviewer pour *frontiers in Immunology*, *cells* (MDPI), *IJMS* (MDPI), *BMC Immunology* (Springer Nature) et *Agri Gene* (Elsevier).

#### Jury de thèse

Examineur pour la Thèse de Hanquet Anne-Caroline, le 6 mai 2009.

#### Contrats de Recherche

2019 : **Start-AIRR Région Hauts-De-France, Projet Heimdall** : Responsable de la partie Biologie moléculaire du projet. Porteur de projet : Pr. Michel Salzet

2019 : **I-SITE Sustain Université Lille Nord Europe, Projet NOBODY** : Responsable de la partie Biologie moléculaire du projet. Porteur de projet : Pr. Michel Salzet

2018 : **Start-AIRR Région Hauts-De-France, Projet BatMass** : Responsable de la partie Biologie moléculaire du projet. Porteur de projet : Pr. Isabelle Fournier

2012-2015 : **ANR "MIMIC" AAP 2011 - Décision n° 11 JSV4 005 01** : Responsable de la tâche Identification of the natural ligand for chemoattractant factors. Porteur de projet : Pr. Christophe Lefebvre

2008 : Obtention d'un **Bonus Qualité Recherche** Université de Lille 1.

#### Membre de réseaux scientifiques internationaux

**Depuis 2011** : Membre du **réseau EURON** qui est un réseau européen de Formation et de Recherche en neurosciences.

## Encadrement d'étudiants

**1- Co-encadrant avec le Pr. Michel Salzet de 3 Thèses :** Mélanie Rose (**Thèse soutenue à Lille le 25/09/20**) ; Alice Capuz (**actuellement en 3<sup>ème</sup> année de Thèse**) ; Sylvain Osien (**actuellement en 3<sup>ème</sup> année de Thèse**).

**2- Encadrement de 5 étudiants de Master 2 :** 2011 ; 2014 ; 2016 (2 étudiants) ; 2018

**3- Co-encadrement de 6 étudiants de Master 2 :** 2017 (2 étudiants) ; 2019 (2 étudiants) ; 2021 ; 2022

**4- Encadrement d'1 étudiant de Master 1** en 2017

**5- Co-encadrement d'1 étudiant de Master 1** en 2017

**6- Encadrement d'1 étudiante de DUT** en 2014

**7- Encadrement d'1 étudiante en ostéopathie** en 2013

## Responsabilités pédagogiques

### Nouvelle maquette 2020-2021.

#### A- Elaboration de maquette.

Participation à l'élaboration de la maquette du Master Bioinformatique Parcours OMICS and Systems Biology – Université de Lille.

#### B- Responsabilité d'UE.

1- Mémoires bibliographiques du Master 1 Bioinformatique Parcours OMICS and Systems Biology – Université de Lille.

2- Ateliers biotechnologiques du Master 1 Bioinformatique Parcours OMICS and Systems Biology – Université de Lille.

3- Approches pratiques en Immunologie de la L3 Science de la Vie parcours Biologie Cellulaire et Physiologie – Université de Lille.

#### C- Responsabilité EC.

Responsable de l'EC1 "Introduction à l'ingénierie des acides nucléiques" dans l'UE OMICS2 du Master 1 Bioinformatique Parcours OMICS and Systems Biology – Université de Lille.

### Ancienne maquette 2016-2020.

Responsable des TP de l'UE d'Immunologie générale et fonctionnelle. L3 de Biologie Cellulaire et Physiologie ; L3 de Biochimie - Université de Lille.



## **Création d'enseignements.**

**1-** Mise en place de l'UE "Mémoires bibliographiques" du Master 1 Bioinformatique Parcours OMICS and Systems Biology – Université de Lille.

**2-** Création de nouveaux travaux pratiques portant sur les tests d'hémolyse, de chimiotactisme et de phagocytose pour l'UE "Approches pratiques en Immunologie" de la L3 Science de la Vie parcours Biologie Cellulaire et Physiologie – Université de Lille.

**3-** Co-création avec le Professeur C. Lefebvre :

**(i)** D'ateliers biotechnologiques pour les Masters "Bioinformatique Parcours OMICS and Systems Biology" (M1 et M2) et "Biologie Santé" (M1) – Université de Lille.

**(ii)** De travaux pratiques portant sur l'ingénierie des acides nucléiques pour le Master 1 "Bioinformatique Parcours OMICS and Systems Biology" et pour l'option "OMICS" des L3 Science de la Vie parcours Biologie Cellulaire et Physiologie et parcours Biochimie – Université de Lille.

**4-** Ancienne maquette 2020-2021.

Co-création avec le Professeur C. Lefebvre, d'ateliers biotechnologiques pour les Masters "Biotechnologie Parcours Protéomique" (M2) et "Biologie Santé" (M1) – Université de Lille.

## **Responsabilités administratives**

### **Pour la FST de l'Université de Lille**

**1-** Membre élu du Conseil de Département de Biologie de la Faculté des Sciences et Technologies (FST) de l'Université de Lille depuis 31/01/2022.

**2-** Nommé en Novembre 2020 : **Référent Formation Continue et Alternance (FCA)** du Département de Biologie de la Faculté des Sciences et Technologies (FST) de l'Université de Lille.

**3-** Depuis 2016 : **Animateur du vivier de sélection de l'Université de Lille pour les sections CNU 67 et 68.**

### **Pour le Laboratoire.**

**1-** Membre élu du Conseil de Laboratoire.

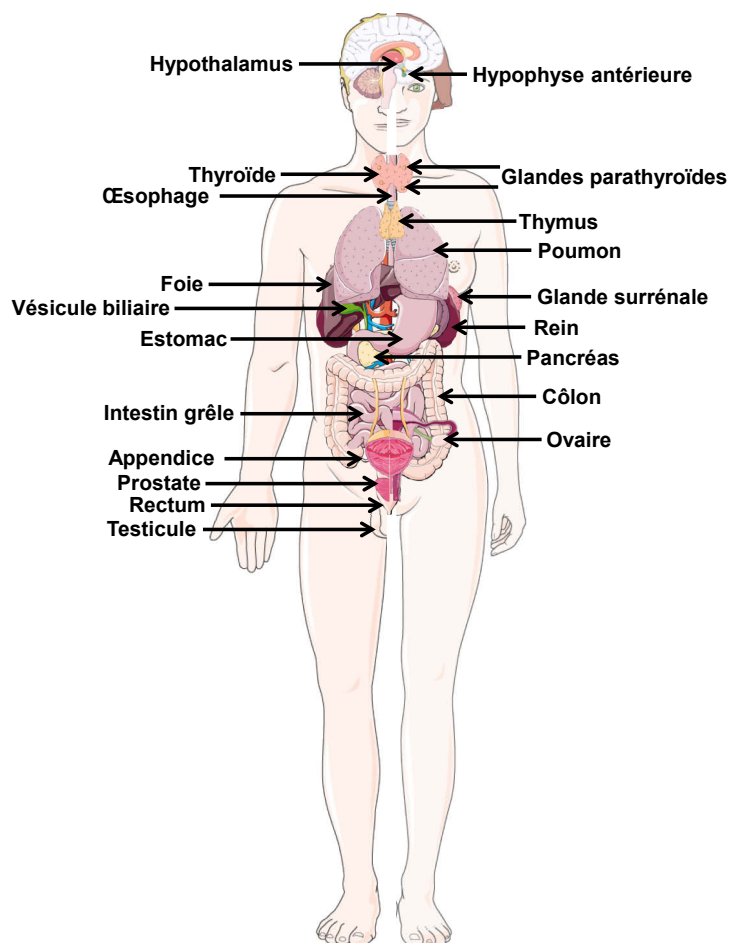
**2-** Depuis 2019 : Responsable L2-L3 du laboratoire auprès de l'Inserm.

**3-** Responsable de la rédaction des dossiers OGM.

**4-** Gestion de l'enlèvement des déchets chimiques du Laboratoire.

*Partie I*  
*Introduction générale*

Afin de permettre au système nerveux de réguler finement la production et la libération d'hormones au sein de l'organisme, une interaction forte entre le système nerveux et le système endocrinien s'est mise en place. Ceci a conduit à l'émergence du système neuroendocrinien (SNE). Ce système comprend un réseau de neurones spécialisés et de cellules endocrines regroupés sous l'appellation de cellules neuroendocrines. Ces cellules sont observées dans quasiment tous les organes du corps (**Figure 1**). En effet, les cellules neuroendocrines peuvent former des organes ou parties d'organes comme c'est le cas pour l'hypothalamus, l'hypophyse antérieure, la médullosurrénale et les glandes parathyroïdes. Elles peuvent aussi être retrouvées sous forme d'amas cellulaires bien individualisés dans le pancréas endocrine ou être dispersées dans le tube digestif, l'appareil urinaire, l'appareil génital et à l'intérieur d'organes tels que la thyroïde, les poumons ou encore le thymus. Ces cellules neuroendocrines dispersées forment le système neuroendocrinien diffus (SNED).



**Figure 1 : Localisations principales des cellules neuroendocrines.**

Du fait de cette répartition anatomique large, les cellules neuroendocrines contrôlent la plupart des processus physiologiques. Ainsi, elles sont impliquées dans la régulation de la croissance et de la différenciation des tissus, de la fonction reproductrice et du développement sexuel, de l'homéostasie, de la pression sanguine, du métabolisme énergétique ou encore des situations de contraintes (stress, soif, faim...).

Cette localisation tissulaire large reflète également une origine embryologique très variée des cellules neuroendocrines. En effet, celles-ci peuvent être d'origine neuroectodermique, ectodermique, mésodermique ou encore endodermique. Ainsi, l'origine embryologique d'une cellule ne peut donc pas être considérée comme l'un des critères à prendre en compte pour la définir comme neuroendocrine. Quels sont donc les critères qui ont été retenus pour établir qu'une cellule est de nature neuroendocrine ?

### **I.1- Critères retenus pour établir la nature neuroendocrine d'une cellule.**

Tout d'abord, le terme neuroendocrine a été utilisé pour désigner les cellules qui sécrètent leurs produits de manière régulée, en réponse à un stimulus spécifique [1]. Ensuite, son utilisation implique que les neurones et les cellules endocrines qui constituent le système neuroendocrinien partagent des caractéristiques phénotypiques communes [1]. Parmi ces caractéristiques, nous avons la présence de vésicules de sécrétion contenant un neurotransmetteur et/ou un neuromodulateur ou un neuropeptide. Par ailleurs, contrairement aux neurones "traditionnels", les cellules neuroendocrines n'établissent pas de contacts synaptiques afin de transmettre leurs informations. Ainsi, leur mode de transmission est endocrine ou paracrine. Enfin, ces cellules expriment des marqueurs communs tels que les chromogranines ou encore les enzymes de transformation des neuropeptides PC2 (proprotéine convertase 2) et PC1/3 (proprotéine convertase 1/3).

## **I.2- L'évolution du concept de cellules neuroendocrines.**

Les critères mentionnés ci-dessus ont permis de rassembler dans un groupe cohésif des cellules présentant une distribution tissulaire et une origine embryologique très variées. Cependant, il est maintenant clairement établi que des cellules qui ne sont pas neuroendocrines telles que les cellules immunitaires peuvent également exprimer certains de ces marqueurs [1–4]. Par exemple, la présence de chromogranines et de différents neuropeptides tels que l' -MSH, l'urocortine, l'adrénomédulline, la cortistatine ou encore la ghréline a pu être mise en évidence dans les monocytes. Cette expression est généralement induite par une stimulation du système immunitaire bien qu'elle soit parfois observée dans les conditions basales. Comme l'indiquent les Professeurs Salzet et Day, ces données montrent que des cellules qui étaient auparavant considérées comme différenciées de façon irrévocable peuvent en réalité présenter une plasticité phénotypique [1]. Celle-ci serait permise par la présence des commutateurs génotypiques nécessaires dans ces cellules [1]. Dans un tel cas, la question qui se pose alors est la suivante: Faut-il toujours considérer ces cellules comme étant immunitaires ou faut-il désormais les définir comme neuroendocrines? Ainsi, plutôt que de reconsidérer le type cellulaire auquel appartiennent ces cellules, ils ont proposé d'inclure une nouvelle notion. Celle-ci stipule que l'activation de changements génétiques spécifiques peut conduire à l'expression d'un phénotype neuroendocrinien partiel ou complet. De façon réciproque, il a été démontré que des neurones peuvent présenter un phénotype immunitaire partiel. Celui-ci est caractérisé par la production de molécules immunitaires telles que des cytokines ou des substances antimicrobiennes [1]. L'avantage certain qui est évoqué pour expliquer que des cellules d'un système produisent des molécules de l'autre système est d'assurer une communication bidirectionnelle efficace entre ces 2 systèmes. Néanmoins, plusieurs exemples de la littérature montrent qu'une cellule immunitaire qui présente un phénotype neuroendocrinien partiel n'exerce pas nécessairement une fonction neuroendocrine. Bien au contraire, elle continue de fonctionner comme une cellule immunitaire et utilise une molécule tout d'abord décrite comme neuroendocrine à des fins immunitaires [3–7].

### **I.3- Une fonction peut en cacher une autre.**

L'exemple le plus marquant pour moi et que j'ai rencontré lors de mon Doctorat est celui de la GnRH et de son récepteur. En effet, leur expression dans des cellules immunitaires telles que les lymphocytes T (LT) est maintenant clairement établie [6,7]. Alors que dans le système neuroendocrinien, la GnRH stimule la libération de LH et de FSH par l'hypophyse, elle régule l'adhésion à la laminine, le chimiotactisme ainsi que la pénétration dans la rate et la moelle osseuse des LT. Ces résultats illustrent que des effecteurs tout d'abord considérés comme exclusivement neuroendocriniens peuvent également avoir un rôle immunitaire. Ainsi, selon le type cellulaire dans lequel elle est exprimée, une molécule neuroendocrine peut présenter une fonction différente. "Une fonction peut donc en cacher une autre" selon les microenvironnements intracellulaires et cellulaires dans lesquels l'effecteur se trouve. Puisque l'expression d'un phénotype partiellement neuroendocrinien ne se traduit pas forcément par une fonction neuroendocrine de la cellule immunitaire, il est de mon point de vue nécessaire d'introduire une notion supplémentaire. Il s'agit de **la plasticité fonctionnelle des effecteurs neuroendocriniens**. A cette notion est associée la question suivante: Est-ce que dans cette plasticité, ces effecteurs utilisent ou non les mêmes mécanismes de régulation ? Si oui, la fonction différente observée serait alors conférée par le microenvironnement intracellulaire c'est-à-dire par la présence de partenaires protéiques différents. Dans le cas contraire, quels seraient les nouveaux modes d'action exercés par l'effecteur neuroendocrinien ?

Les travaux initiés dans les années 2000 par le Professeur Salzet sur la proprotéine convertase 1/3 (PC1/3) vont parfaitement dans le sens de cette réflexion. En effet, ils ont montré que cette enzyme clé du système neuroendocrinien est également un régulateur majeur de la réponse immunitaire. Elle constitue donc pour moi un modèle de plasticité fonctionnelle. **Les recherches que nous avons menées ces dernières années et qui font l'objet de cette HDR ont donc visé à déterminer comment au niveau moléculaire PC1/3 régule cette réponse immunitaire.**

*Partie II*

*Présentation et analyse critique de*

*l'activité de recherche*

## II.1- Généralités sur la proprotéine convertase 1/3 (PC1/3).

PC1/3 appartient à la famille de gènes subtilisin/kexin (PCSK1 à PCSK9) qui codent pour PC1/3, PC2, la furine, PC4, PC5/6, PACE4, PC7, SKI-1/S1P et PCSK9 [8–11]. Découverte dans les années 90, PC1/3 est considérée comme étant majoritairement exprimée dans les cellules et tissus neuroendocriniens. Ainsi, son expression a notamment pu être mise en évidence dans des neurones des noyaux supra-optique, suprachiasmatique et paraventriculaire de l'hypothalamus [8,9,12]; dans les cellules mélanotropes et corticotropes de l'hypophyse [8–10,13] ou encore dans les cellules des îlots de Langerhans [10]. Au sein de ces cellules, PC1/3 intervient dans la voie de sécrétion régulée dans laquelle elle clive les précurseurs de neuropeptides et/ou de pro-hormones afin de générer les peptides bioactifs [14]. Ce clivage s'effectue après une paire d'acides aminés basiques K-R ou R-R et notamment lorsque le site de clivage consensus R-X-R/K-R est présent [14]. Parmi les précurseurs protéiques maturés par PC1/3, nous avons par exemple la proGHRH [15], la prosomatostatine [16], la proenképhaline [17], la proopiomélanocortine [18], la prorénine [19], la proghréline [20], la progastatine [21], la proinsuline [22] et le proglucagon [23].

### II.1.1- Structure de PC1/3.

PC1/3 est synthétisée en zymogène, c'est-à-dire en proenzyme dépourvue d'activité enzymatique (**Figure 2**).

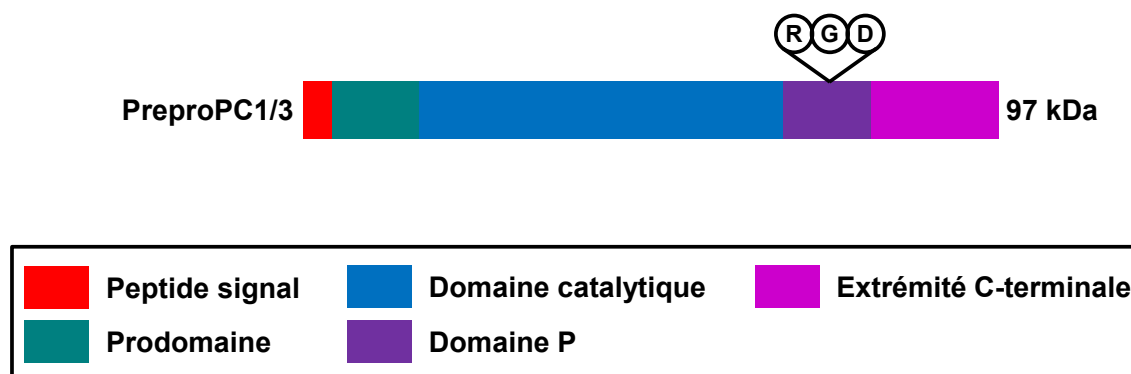


Figure 2 : Structure du zymogène PC1/3.



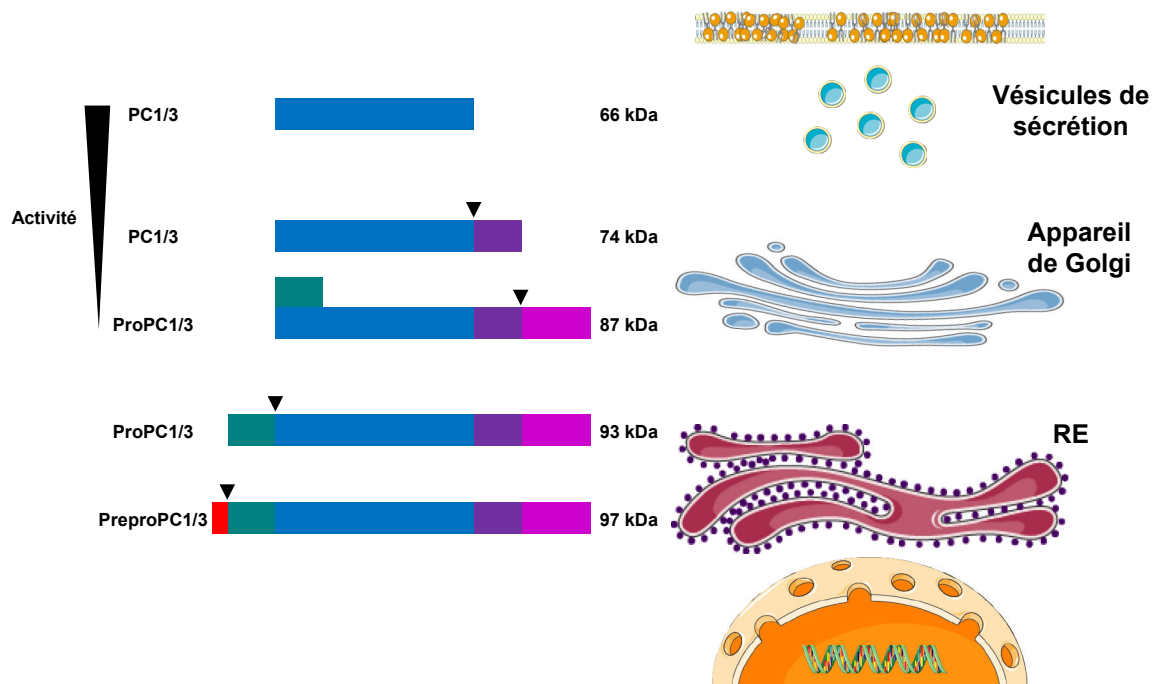
Ce précurseur enzymatique de 97 kDa présente un peptide signal permettant son adressage vers le réticulum endoplasmique (RE) et ainsi la voie de sécrétion. Il est suivi d'un prodomaine qui assure le bon repliement et la stabilité de la protéine [24,25]. A sa suite, nous avons le domaine catalytique lui-même suivi du domaine P. Ce dernier régule l'activité enzymatique de PC1/3 en liant le calcium mais aussi de par sa sensibilité aux variations de pH [26]. Par ailleurs, ce domaine P présente un motif arginine-glycine-acide aspartique (RGD) qui est crucial pour la stabilité du domaine catalytique et l'adressage de l'enzyme vers les vésicules de sécrétion [27,28]. L'extrémité C-terminale, quant à elle, se termine par un domaine amphipatique [9]. Celui-ci permettrait l'interaction de PC1/3 avec les endomembranes [29]. Il s'avère également crucial pour l'adressage de l'enzyme vers les vésicules de sécrétion [30,31].

La maturation du zymogène en enzyme active nécessite donc plusieurs clivages protéolytiques spécifiques. Ceux-ci se font lors du cheminement de PC1/3 depuis le réticulum endoplasmique vers les vésicules de sécrétion.

### II.1.2- Maturation du zymogène en enzyme active.

Ainsi, dans le RE, PC1/3 autocatalyse tout d'abord le clivage de son peptide signal afin de conduire à la formation de la proprotéine de 93 kDa (**Figure 3**). Dans ce même organite, PC1/3 autocatalyse ensuite le clivage de son prodomaine afin de générer une proenzyme partiellement active de 87 kDa [29,32–35]. Celle-ci migre alors vers l'appareil de Golgi. Notons que suite à son clivage, le prodomaine se lie au domaine catalytique de PC1/3 [36]. Ceci permet de réguler son activité enzymatique et d'assurer son activation dans les compartiments cellulaires appropriés, à savoir le réseau trans-golgien (TGN) et les vésicules de sécrétion [34,35,37]. Dans le TGN, PC1/3 autocatalyse le clivage de son extrémité C-terminale [38]. Ceci permet de générer une protéine de 74 kDa et qui présente une activité enzymatique accrue. Par ailleurs, le pH acide du TGN conduit à la protonation des résidus basiques du prodomaine qui sont impliqués dans l'interface avec le domaine catalytique [39]. De ce fait, le prodomaine se dissocie du domaine catalytique. La forme de PC1/3 de 74 kDa est alors transportée vers les vésicules de sécrétion. Dans celles-ci, le domaine

P est clivé, ce qui permet l'obtention de la forme pleinement active de PC1/3 de 66 kDa [29,35,38,40,41].



**Figure 3 : Maturation du zymogène PC1/3 en enzyme active.** Les sites de clivages protéolytiques sont indiqués par les triangles noirs.

Compte-tenu des nombreux substrats que PC1/3 mature, il est nécessaire que son activation soit finement régulée afin d'éviter des dysfonctionnements métaboliques et endocriniens.

### II.1.3- Régulation de l'activité enzymatique de PC1/3.

Comme mentionné précédemment, le prodomaine et l'extrémité C-terminale de PC1/3 auto-inhibent son activité. Par ailleurs, la concentration en calcium et le pH acide compris entre 5,0 et 6,5 du TGN conditionnent la pleine activité de PC1/3. Outre ces conditions et le contrôle qu'exerce PC1/3 sur elle-même, son activité est également régulée par la protéine proSAAS [42–45]. Celle-ci se fixe à PC1/3 par son domaine C-terminal et empêche ainsi le clivage de l'extrémité C-terminale de la proprotéine convertase. L'interaction entre proSAAS et PC1/3 serait maintenue jusqu'au TGN, compartiment dans lequel la maturation de neuropeptides tels que la

proopiomélanocortine débiterait [46]. Ainsi, proSAAS contrôlerait la fenêtre d'activation de PC1/3 afin d'éviter le clivage prématuré de ses substrats [46].

Tant il est nécessaire d'éviter cette activation excessive de PC1/3, tant son absence d'activité conduit aussi à des dysfonctionnements métaboliques et endocriniens. En effet, de tels dysfonctionnements physiologiques sont observés chez des souris et des patientes présentant une déficience de cette proprotéine convertase.

#### II.1.4- Pathologies associées à PC1/3.

Ainsi, les souris pour lesquelles le gène codant PC1/3 a été invalidé sont naines et ont un taux de reproduction très faible. Par ailleurs, elles présentent un défaut de maturation de la proopiomélanocortine, de la proinsuline et du proglucagon intestinal [47]. Chez l'humain, plusieurs cas de patientes ayant des mutations dans le gène codant PC1/3 ont été décrits [48,49]. Celles-ci présentent des dysfonctionnements métaboliques et endocriniens proches de ceux observés chez la souris PC1/3 KO. En effet, ces patientes souffrent d'hypogonadisme hypogonadotrope, d'obésité et d'une entéropathie. Elles présentent également une hypocortisolémie, une hypoglycémie postprandiale ainsi que de forts taux de proopiomélanocortine et de proinsuline circulants.

Par ailleurs, PC1/3 serait également impliquée dans le développement de différents cancers. En effet, une expression forte de son gène a été observée dans les adénomes hypophysaires [50,51], le cancer bronchique à petites cellules [52], les cancers gastro-intestinaux [53] et les cancers du sein [54].

En outre, alors que PC1/3 était tout d'abord considérée comme exclusivement exprimée dans les cellules et tissus neuroendocriniens, son expression dans les cellules immunitaires a également pu être démontrée. En 2012, les travaux du laboratoire confirmaient le rôle clé de PC1/3 dans la réponse immunitaire.

#### II.1.5- PC1/3 et la réponse immunitaire.

Chez l'Homme, PC1/3 est exprimée par des macrophages différenciés à partir de monocytes sanguins [55]. Chez le rat, son expression est observée dans les

macrophages localisés dans les ganglions lymphatiques [56] ainsi que dans les macrophages alvéolaires et spléniques [56,57]. Plusieurs travaux chez ce rongeur ont alors suggéré l'implication de PC1/3 dans la réponse inflammatoire. Ainsi, sa présence a été démontrée dans les leucocytes ayant infiltré les pattes de rats pour lesquelles un œdème inflammatoire a été induit [58]. Par ailleurs, une augmentation de l'expression de PC1/3 dans les macrophages alvéolaires [57] et les lymphocytes B spléniques [56] a été mise en évidence chez cet animal suite à l'injection de lipopolysaccharides (LPS). Dans ces tissus enflammés et ces cellules immunitaires, l'expression de précurseurs protéiques de neurohormones tels que la proenképhaline et la proopiomélanocortine a également été observée [56–58]. Par similitude avec le système neuroendocrinien, il a donc tout d'abord été proposé que PC1/3 y serait exprimée afin d'assurer leur maturation. Néanmoins, le fait que l'expression de PC1/3 soit induite suite à un traitement avec un composé mimant une infection tel que le LPS a également amené à considérer l'implication de PC1/3 dans la réponse immunitaire innée. Son rôle majeur dans le contrôle de celle-ci a ainsi pu être définitivement démontré par des travaux du laboratoire réalisés sur les souris PC1/3 KO [59]. Ceux-ci révèlent que ces souris présentent une splénomégalie et une désorganisation structurale de la rate. Par ailleurs, lorsqu'une dose létale de LPS est injectée dans le péritoine, ces animaux meurent beaucoup plus rapidement des suites d'un choc septique. En effet, ils présentent une diminution de la pression artérielle causée par une libération massive et anormale de cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ), l'interleukine 6 (IL-6) et l'interleukine 1 beta (IL-1 $\beta$ ). Suite à l'injection de cette endotoxine, les souris PC1/3 KO présentent aussi des taux plasmatiques d'interleukine 12p70 (IL-12p70) et d'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) plus élevés. Ce profil cytokinique particulier indique que l'absence de PC1/3 favorise l'orientation de la réponse immunitaire vers la voie Th1 et donc l'immunité à médiation cellulaire. De façon surprenante, lors de ce traitement au LPS, les souris PC1/3 KO libèrent également une quantité plus importante d'une cytokine anti-inflammatoire, l'interleukine 10 (IL-10). Le fait qu'une sécrétion plus importante d'IL-12p70 et d'IFN- $\gamma$  soit observée chez ces animaux malgré des taux plus élevés d'IL-10 indique l'échec du rétrocontrôle négatif exercé par cette cytokine sur la réponse pro-inflammatoire. Par ailleurs, il a été démontré que les macrophages jouent un rôle majeur dans la libération massive de cytokines pro-inflammatoires observée lors du choc septique. En effet, les macrophages de

souris PC1/3 KO isolés à partir du péritoine sécrètent spontanément une quantité plus importante d'IL-1 $\beta$ . Ils libèrent également des taux plus importants de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 lorsqu'ils sont stimulés par du LPS. Afin de comprendre au niveau moléculaire comment PC1/3 régule cette réponse immunitaire, la lignée de macrophages alvéolaires de rat NR8383 a ensuite été utilisée [60]. Les travaux réalisés sur cette lignée révèlent que PC1/3 est principalement localisée dans le TGN. Néanmoins, sa présence dans le RE, les endosomes tardifs et les phagolysosomes a également été observée. De façon intéressante, une stimulation par du LPS induit sa translocation depuis le TGN vers les lysosomes, les phagolysosomes et les corps multi-vésiculaires. Dans ceux-ci, PC1/3 co-localise avec le récepteur pour cette endotoxine, à savoir le Toll-like receptor 4 (TLR4). Pour déterminer le rôle de PC1/3 dans ces macrophages, son invalidation génique a été réalisée par shRNA. Ces cellules sont appelées « PC1/3 KD pour PC1/3 Knockdown ». Les cellules contrôles qui ont été transfectées avec un shRNA ne ciblant aucune protéine connue dans ces macrophages sont quant à elles appelées « NT pour non-target ». Les premières études réalisées sur ces cellules montrent que les macrophages PC1/3 KD ont une désorganisation forte du système endolysosomal. Par ailleurs, tout comme les macrophages péritonéaux isolés de souris PC1/3 KO [59], les cellules PC1/3 KD présentent une altération de leur sécrétion cytokinique [60]. En effet, en absence de stimulation, elles sécrètent spontanément plus de TNF- $\alpha$  que les macrophages NR8383 NT. De plus, elles libèrent également des quantités plus importantes d'IL-1 $\beta$  et ce, aussi bien en condition basale que suite à une stimulation par du LPS. En revanche, les macrophages PC1/3 KD traités au LPS relarguent moins d'IL-6 que les cellules NT.

Etant donné le rôle protecteur crucial que PC1/3 joue durant la septicémie, nous avons décidé de décrypter les mécanismes moléculaires qu'elle régule au sein des macrophages. Pour ce faire, nous avons utilisé la protéomique à haut débit, des expériences d'immunofluorescence ainsi que des approches de biologie cellulaire, de biochimie et de biologie moléculaire. Les travaux ainsi réalisés font l'objet de cette HDR.

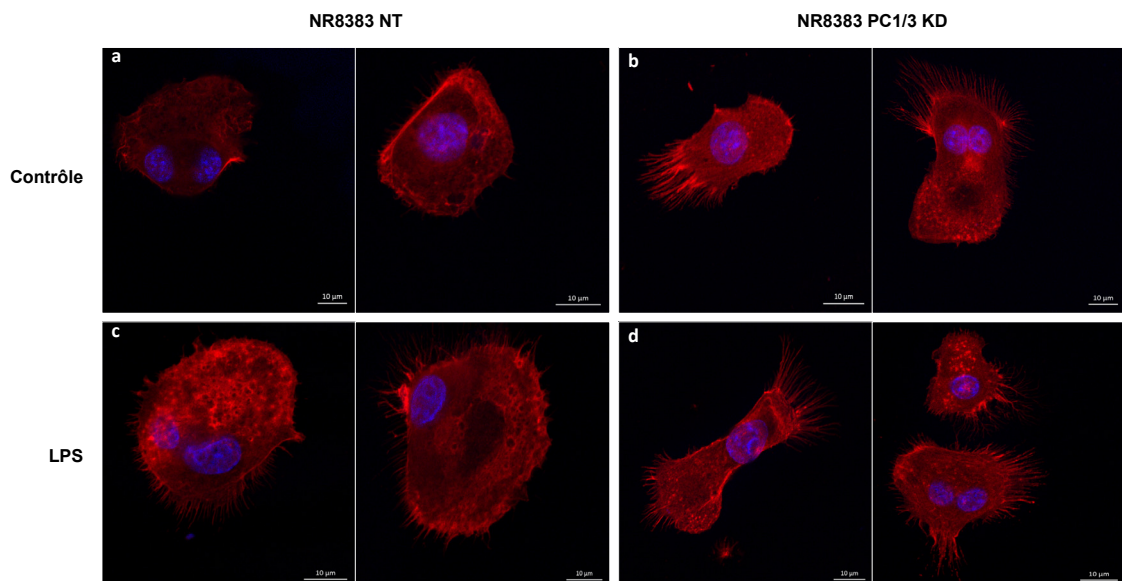
## **II.2- Conséquences moléculaires de l'inhibition de PC1/3 au sein des macrophages.**

Afin d'identifier les mécanismes moléculaires régulés par PC1/3 au sein des macrophages, nous avons poursuivi l'étude initiée sur les cellules NR8383 PC1/3 KD et NT [60]. Dans un premier temps, par une approche de protéomique à haut débit, nous avons évalué l'impact de l'inactivation génique de PC1/3 sur le protéome de ces macrophages.

### II.2.1- Les macrophages PC1/3 KD présentent des réarrangements du cytosquelette qui sont corrélés à une dérégulation de l'homéostasie calcique.

Cette étude protéomique de type shotgun a été réalisée sur des extraits protéiques de macrophages NR8383 NT et PC1/3 KD stimulés ou non pendant 24 h par 200 ng/mL de LPS [61]. Ces expériences de LC-MS/MS couplées à des analyses bio-informatiques révèlent que les macrophages PC1/3 KD présentent un taux plus élevé de protéines régulant l'organisation du cytosquelette. La majorité d'entre elles est impliquée dans les complexes ARP2/3 (Actin Related Protein 2/3) et WAVE (WASF2, ACTR3, ARPC1B). Ainsi, la protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) est connue pour activer le complexe ARP2/3 et induire une polymérisation importante de l'actine. Celle-ci est indispensable au trafic des vésicules intracellulaires. Par ailleurs, cette polymérisation de l'actine médiée par le complexe ARP2/3 est cruciale pour la réorganisation du cytosquelette qui survient au niveau du cortex cellulaire afin de permettre les mouvements de la cellule [62]. Elle permet notamment la formation de structures lamellipodiales dans les cellules. Notons que lors de l'activation des macrophages, de telles structures sont visibles suite à des réarrangements du cytosquelette [63]. En effet, les macrophages activés présentent un phénotype allongé alors que ceux à l'état de repos présentent un phénotype arrondi. Un taux plus élevé de protéines telles que WASP suggère donc qu'une réorganisation du cytosquelette puisse survenir dans les cellules PC1/3KD. Pour valider cette hypothèse, des macrophages NR8383 NT et PC1/3 KD ont été stimulés ou non pendant 24 h par 200 ng/mL de LPS [61]. Afin de marquer les filaments

d'actine, ils ont ensuite été incubés avec de la phalloïdine couplée à de la rhodamine (**Figure 4**).

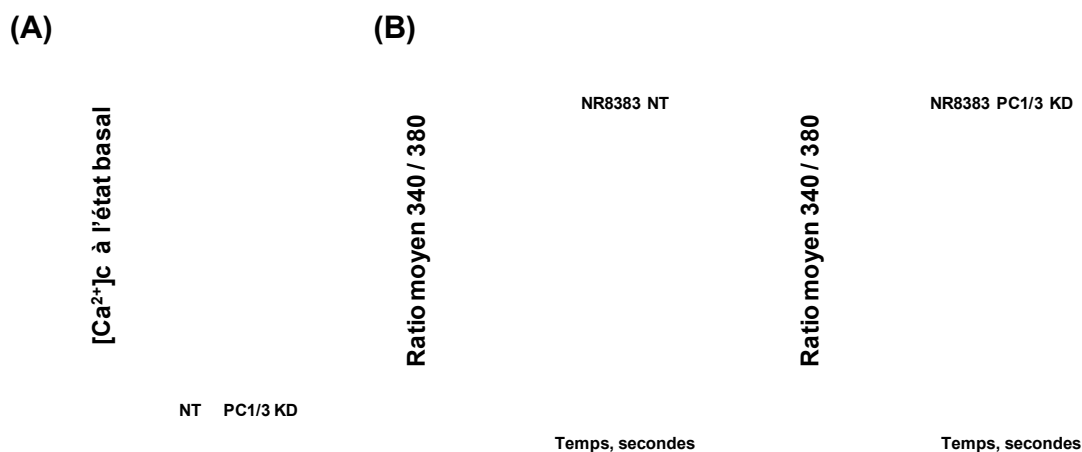


**Figure 4 : Les macrophages PC1/3 KD présentent des réarrangements du cytosquelette.** Les cellules NR8383 NT et PC1/3 KD ont été stimulées (c et d) ou non (a et b) avec 200 ng/mL de LPS pendant 24 h. Elles ont ensuite été marquées avec de la phalloïdine couplée à de la rhodamine (1/100<sup>ème</sup>). Les noyaux ont été marqués avec du Hoechst 33342 (bleu). Une analyse par microscopie confocale a ensuite été réalisée. Barre d'échelle : 10 µm.

Ceci révèle qu'à l'état de repos, les cellules PC1/3 KD sont plus allongées que les cellules NT (**Figures 4a et b**). Elles présentent également un nombre plus important de protrusions membranaires qui sont liées à la présence de filaments d'actine repoussant la membrane plasmique (**Figure 4b**). De façon intéressante, ces protrusions ne sont pas observées sur tout le pourtour des cellules PC1/3 KD. Elles sont regroupées au niveau de portions restreintes de la membrane plasmique et confèrent ainsi une polarité morphologique à ces macrophages. En effet, sur l'un des côtés, les cellules présentent de longs filopodes alors que sur l'autre côté elles présentent des ondulations (ruffling) membranaires. Ces caractéristiques phénotypiques indiquent que les cellules PC1/3 KD sont déjà dans un état d'activation et ce, même en absence de stimulation. Un traitement par du LPS accroît cet état d'activation comme le montre l'augmentation du nombre de filopodes (**Figure 4d**). Cet accroissement du nombre de filopodes est également observé pour les macrophages NT stimulés par du LPS indiquant ainsi leur activation (**Figure 4c**).

Néanmoins, la taille de ces filopodes reste plus petite que celle observée pour ceux des cellules PC1/3 KD (**Figures 4c et d**). L'ensemble de ces résultats confirme donc qu'en absence de PC1/3, les macrophages présentent des réarrangements du cytosquelette et un état d'activation plus marqué.

Par ailleurs, les analyses protéomiques réalisées montrent que les macrophages PC1/3 KD présentent aussi un taux plus élevé de gelsoline. Cette protéine possède des sites de liaison pour le calcium et régule sous la dépendance de celui-ci l'assemblage des filaments d'actine [64]. En effet, la gelsoline ne peut exposer ses sites de liaison à l'actine qu'en présence d'une forte concentration intracellulaire de calcium. Ceci suggère que la désorganisation du cytosquelette observée implique également une dérégulation de l'homéostasie calcique. Cette dérégulation a pu être confirmée par des expériences d'imagerie calcique réalisées à l'aide de la sonde calcique Fura-2AM [61]. Ainsi, même à l'état basal, les cellules PC1/3 KD présentent une concentration intracellulaire de calcium plus élevée que les cellules NT (**Figure 5A**). En outre, un traitement des cellules PC1/3 KD et NT avec 200 ng/mL de LPS induit rapidement une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (**Figure 5B**). Néanmoins, celle-ci est à nouveau beaucoup plus prononcée dans les macrophages PC1/3 KD.



**Figure 5 : Les macrophages PC1/3 KD présentent une dérégulation de l'homéostasie calcique. (A)** Quantification des concentrations de calcium cytosolique ( $[Ca^{2+}]_c$ ) dans les cellules NR8383 NT et PC1/3 KD à l'état basal. **(B)** La  $[Ca^{2+}]_c$  augmente lorsque les cellules NR8383 NT et PC1/3 KD sont stimulées avec 200 ng/mL de LPS.



Il est clairement établi que le cytosquelette joue un rôle crucial dans le transport de vésicules d'un organite à un autre. Sa désorganisation suggère donc que le trafic vésiculaire puisse être aussi perturbé au sein des macrophages invalidés pour PC1/3. Ceci a été confirmé par notre étude protéomique [61].

#### II.2.2- En absence de PC1/3, les macrophages présentent un remodelage du compartiment endosomal.

En effet, celle-ci révèle que les cellules PC1/3 KD présentent une diminution du taux de protéines impliquées dans le trafic de vésicules entre le RE et les saccules golgiens [65]. En revanche, ces macrophages ont un taux plus élevé de protéines spécifiques des endosomes précoces, tardifs et de recyclage. Ces protéines interviennent dans la régulation du trafic protéique entre le TGN et les endosomes. Elles sont également impliquées dans la biogenèse des corps multi-vésiculaires. Ceux-ci contiennent des vésicules intraluminales formées suite à l'invagination et la scission de la membrane limitant les endosomes. Le plus souvent, ces corps multi-vésiculaires fusionnent avec des lysosomes afin de permettre la dégradation de protéines membranaires qui ont été internalisées. Néanmoins, un autre devenir possible de ces corps multi-vésiculaires est leur fusion avec la membrane plasmique afin de libérer dans le milieu extérieur les vésicules intraluminales qu'ils contiennent. Ces vésicules sont alors appelées exosomes. Il a été décrit que la libération de ces exosomes est stimulée par une augmentation de calcium intracellulaire [66]. Rappelons que les macrophages PC1/3 KD ont une concentration intracellulaire de calcium plus élevée que les cellules NT et ce, aussi bien à l'état basal que suite à une stimulation par du LPS (**Figures 5A et B**). Ces résultats suggèrent donc que les cellules PC1/3 KD produisent plus de corps multi-vésiculaires et libèrent une quantité plus importante d'exosomes. De façon intéressante, nous avons obtenu des résultats similaires avec des macrophages péritonéaux isolés de souris PC1/3 KO [61]. En effet, à l'état basal, ceux-ci présentent une abondance accrue de plusieurs protéines Rab telles que Rab8, Rab11, Rab14 et Rab27 qui jouent un rôle clé dans la régulation des processus d'exocytose et de sécrétion [67]. Ainsi, ces données indiquent que les macrophages invalidés pour PC1/3 présentent un remodelage du compartiment endosomal. De plus, elles suggèrent également

qu'ils puissent avoir une activité sécrétoire accrue. C'est pourquoi, nous avons donc ensuite décidé d'étudier celle-ci.

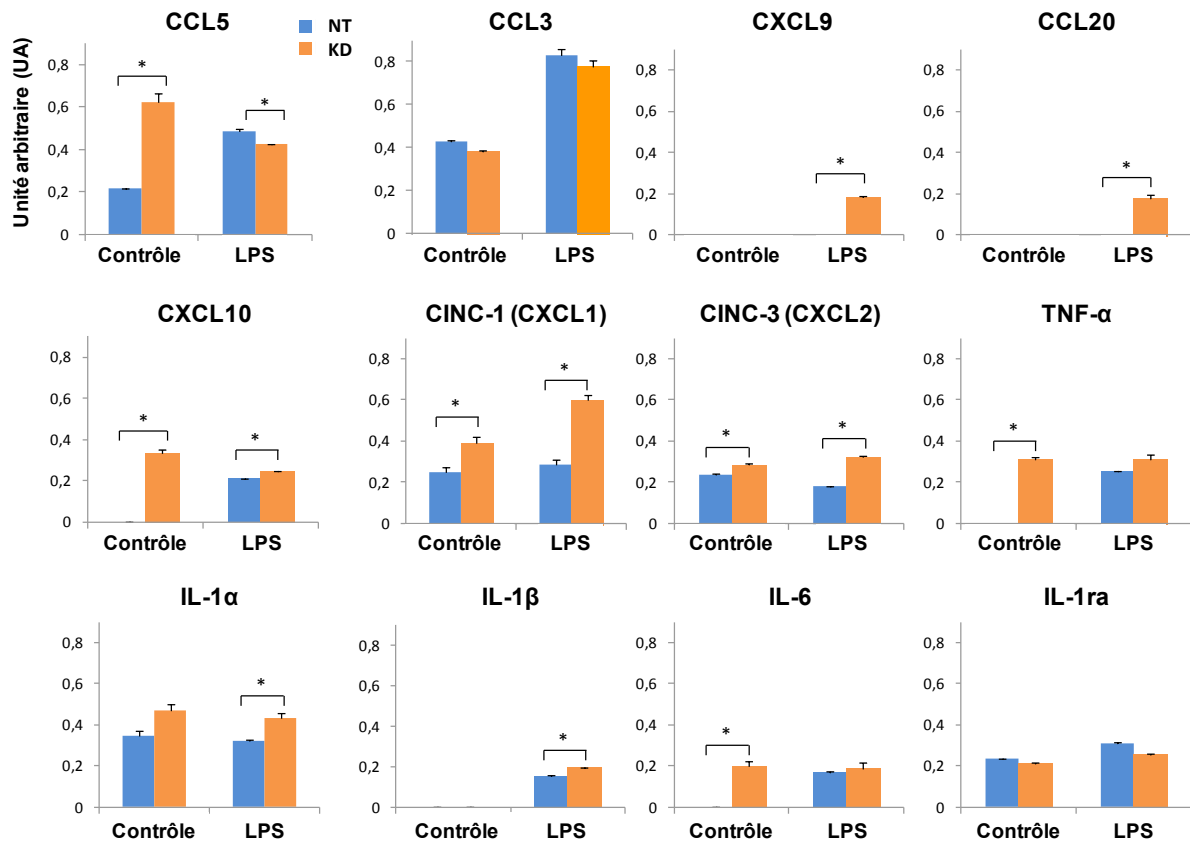
### II.2.3- Les macrophages PC1/3 KD sécrètent une quantité plus importante d'alarmines et de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires.

Dans un premier temps, une analyse protéomique de type shotgun a été réalisée sur les sécrétomes de macrophages NR8383 NT et PC1/3 KD stimulés ou non pendant 24 h par 200 ng/mL de LPS [61]. Celle-ci révèle que les cellules PC1/3 KD sécrètent spontanément des alarmines telles que GRP78, HSP84, HSP86, HSP73, la calréticuline, la cathepsine B, la nucléoline et des granules. De façon intéressante, il a été décrit que certaines alarmines induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires en activant le TLR4 de façon autocrine et paracrine [68]. Cette sécrétion spontanée d'alarmines pourrait donc expliquer pourquoi les macrophages PC1/3 KD présentent déjà un état d'activation à l'état basal (**Figure 4b**). En outre, la libération de cytokines dépend de l'augmentation de calcium intracellulaire [69]. Le relargage spontané d'alarmines et la concentration intracellulaire de calcium plus élevée dans les cellules PC1/3 KD (**Figure 5A**) pourraient donc aussi expliquer pourquoi ils libèrent plus de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  à l'état basal [60]. Ces résultats nous ont donc aussi amenés à étudier plus précisément les profils de sécrétion cytokinique et chimiokinique des macrophages NT et PC1/3 KD.

Pour ce faire, les cellules NT et PC1/3 KD ont été stimulées ou non pendant 24 h par 200 ng/mL de LPS et les sécrétomes ont été collectés [61]. Ceux-ci ont alors été analysés à l'aide d'une puce à cytokines (**Figure 6**). Cette expérience révèle que les macrophages PC1/3 KD sécrètent spontanément plus de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires telles qu'IL6, TNF- $\alpha$ , CCL5, CXCL1, CXCL2 et CXCL10. Suite à la stimulation par du LPS, le profil de sécrétion de CXCL1, CXCL2 et CXCL10 reste inchangé. En revanche, suite à ce traitement, les cellules PC1/3 KD libèrent des quantités plus importantes d'IL-1 $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  ainsi que de façon exclusive de la CXCL9 et CCL20.

L'ensemble de ces résultats montre qu'en absence de PC1/3, les macrophages présentent bien une activité sécrétoire accrue mais aussi un profil pro-inflammatoire plus marqué. Ceci a été conforté par une expérience de cytométrie en flux durant

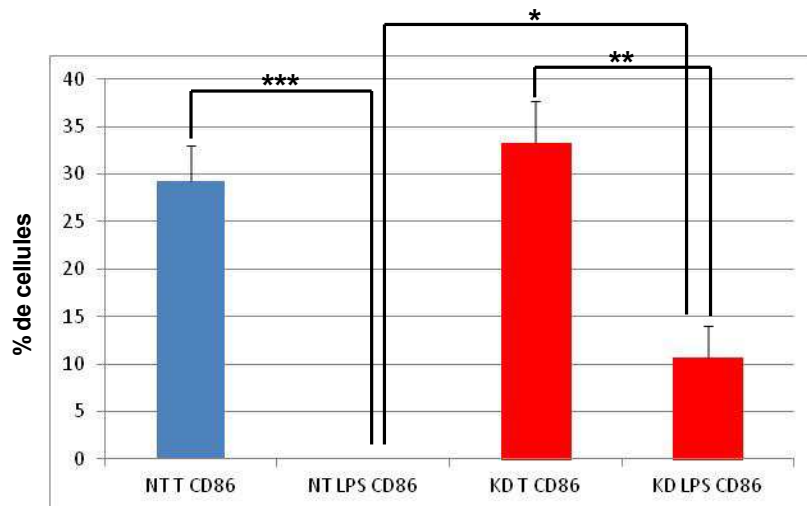
laquelle l'expression du marqueur pro-inflammatoire CD86 à la surface des macrophages PC1/3 KD et NT a été étudiée.



**Figure 6 : Profils de sécrétion cytokinique et chimiokinique des macrophages NT et PC1/3 KD stimulés ou non pendant 24 h avec 200 ng/mL de LPS.** Les résultats obtenus avec les sécrétomes des cellules NT sont présentés en bleu et ceux obtenus avec les sécrétomes des cellules PC1/3 KD sont présentés en orange. Les diagrammes ont été obtenus en réalisant le ratio entre la densité moyenne de pixels des spots expérimentaux et celle des spots de référence. Pour estimer la significativité des résultats, un test de Student a été réalisé (\*p < 0.05).

#### II.2.4- Suite à une stimulation par du LPS, les macrophages PC1/3 KD continuent d'exprimer à leur surface cellulaire le marqueur pro-inflammatoire CD86.

Afin d'étudier l'expression du marqueur pro-inflammatoire CD86 à la surface des macrophages NR8383 NT et PC1/3 KD, une expérience de cytométrie en flux a été réalisée [70]. Pour ce faire, ces macrophages ont été stimulés ou non pendant 16 h par 200 ng/mL de LPS. Ils ont ensuite été incubés en présence d'un anticorps dirigé contre le CD86 et couplé à l'Alexa Fluor® 647 (**Figure 7**).



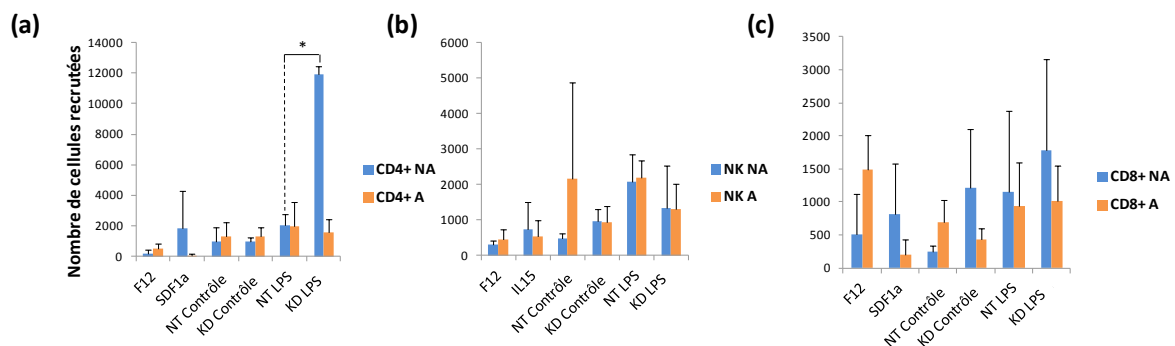
**Figure 7 : Après un traitement au LPS, les macrophages PC1/3 KD continuent d'exprimer le marqueur pro-inflammatoire CD86 à leur surface cellulaire alors qu'il disparaît dans les cellules NT.** Les cellules NR8383 NT et PC1/3 KD ont été stimulées ou non avec 200 ng/mL de LPS pendant 16 h. Afin de réaliser une analyse par cytométrie en flux, elles ont ensuite été marquées avec un anticorps de souris couplé à l'Alexa Fluor® 647 et dirigé contre le CD86 de rat. Les expériences ont été réalisées en triplicat et les données ont été analysées par un test de Student (\*p <0.05, \*\*p <0.01, \*\*\*p < 0.001).

Cette étude révèle qu'à l'état basal, quasiment autant de cellules NT (29,3%) que PC1/3 KD (33,3%) expriment le CD86 à leur surface cellulaire. En revanche, suite au traitement par le LPS, le nombre de cellules l'exprimant au niveau de leur membrane plasmique varie significativement entre les macrophages NT et PC1/3 KD. En effet, suite à cette stimulation, plus aucune cellule NT n'exprime de façon détectable le CD86 à sa surface. Quant aux macrophages PC1/3 KD, bien que le LPS induise une diminution du nombre de cellules qui l'expriment d'un facteur 3, sa présence reste observable à la surface de 10,7% d'entre eux. Ces résultats renforcent donc l'idée que les macrophages PC1/3 KD traités au LPS présentent un caractère pro-inflammatoire plus marqué.

Rappelons que les macrophages PC1/3 KD sécrètent plus d'alarmines, de CXCL10, de CXCL9 et de CCL20 que les cellules NT. Alors que les alarmines sont des inducteurs de la réponse immunitaire adaptative, CXCL10, CXCL9 et CCL20 exercent un effet chimiotactique sur les lymphocytes T [71] Nous avons donc émis l'hypothèse que le sécrétome des cellules PC1/3 KD pourrait avoir un effet chimiotactique sur les lymphocytes T plus important que celui des cellules NT.

## II.2.5- Le sécrétome de macrophages PC1/3 KD traités au LPS exerce un effet chimiotactique très fort sur des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs humains.

Ce test de chimiotactisme a été réalisé sur des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> et des lymphocytes Natural Killer (NK) isolés à partir de sang périphérique humain puis activés ou non *in vitro* [61]. Ces cellules ont alors été déposées dans l'insert d'une chambre de Boyden. Le puits en dessous de l'insert contient quant à lui, le sécrétome de macrophages NR8383 NT ou PC1/3 KD stimulés ou non pendant 24 h par 200 ng/mL de LPS. Deux tests de chimiotactisme additionnels ont également été effectués en parallèle en guise de contrôles. Le premier a été réalisé avec du milieu HAMF12 qui est le milieu de culture des cellules NR8383. Le deuxième, quant à lui, a été mené en présence de facteurs connus pour exercer un effet chimiotactique sur les différents lymphocytes utilisés. Ainsi, le stromal cell-derived factor 1  $\alpha$  (SDF1 $\alpha$ ) a été choisi pour les lymphocytes T et l'interleukine 15 (IL-15) pour les cellules NK. Après 2h30 d'incubation, le nombre de lymphocytes ayant migré à travers la membrane de l'insert pour gagner le puits en dessous de celui-ci a alors été compté (Figure 8).



**Figure 8 : Le sécrétome de macrophages PC1/3 KD traités au LPS exerce un effet chimiotactique très fort sur des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs humains.** (a) Des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, (b) Natural Killer (NK) et (c) lymphocytes T CD8<sup>+</sup> activés (A) ou non (NA) *in vitro* ont été placés dans l'insert d'une chambre de Boyden et mis en présence du sécrétome de macrophages NR8383 NT et PC1/3 KD stimulés ou non pendant 24 h par 200 ng/mL de LPS. Ce sécrétome a été remplacé par du milieu HAMF12 (F12) pour le contrôle négatif et par du milieu contenant du SDF1 $\alpha$  (LT) ou de l'IL-15 (NK) pour le contrôle positif. Le test de migration a été réalisé pendant 150 minutes et le nombre de cellules ayant été recrutées a ensuite été évalué. Les expériences ont été réalisées en triplicat et les données ont été analysées par un test de Student (\*p <0.05).

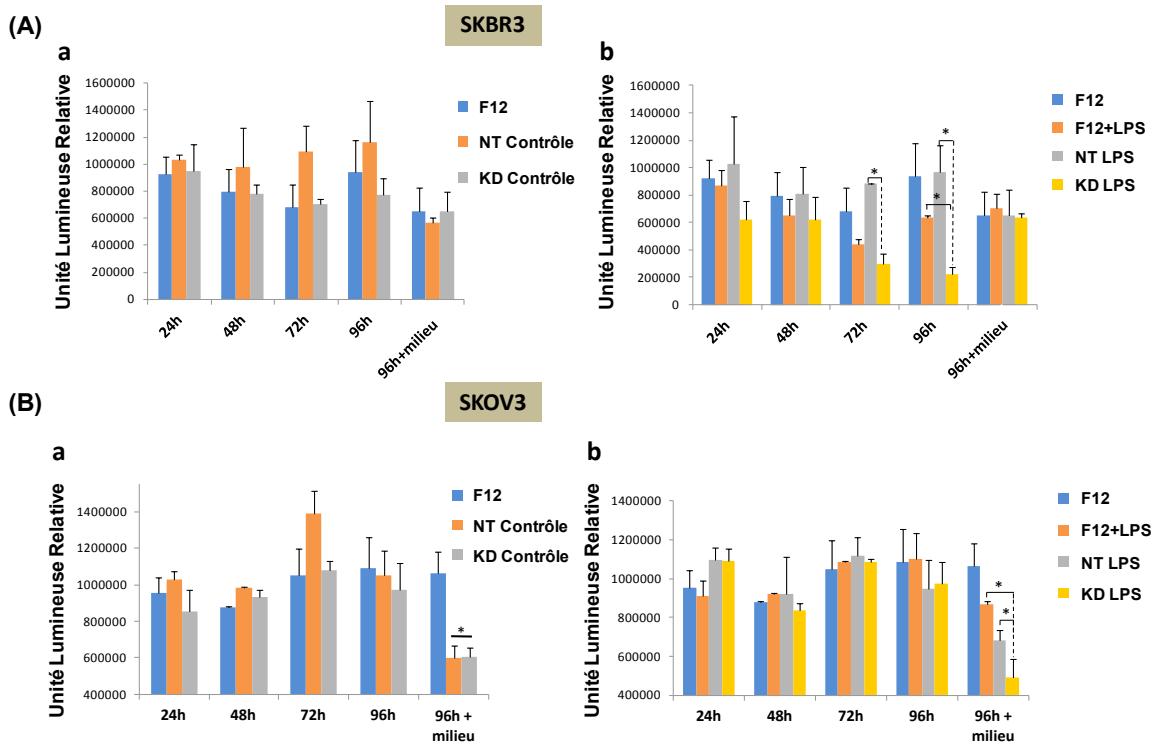
Cette expérience montre que les secrétomes des cellules NT et PC1/3 KD traitées ou non par du LPS n'exercent pas d'effet chimiotactique significatif sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et NK (**Figures 8b et c**). En revanche, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs sont significativement attirés par le secrétome des macrophages PC1/3 KD stimulés par du LPS (**Figure 8a**). En effet, ce secrétome attire six fois plus de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> que celui des cellules NT traitées au LPS. Par ailleurs, rappelons que sous LPS, les cellules PC1/3 KD sécrètent du TNF- $\alpha$ , de l'IL-1 $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$ . Ce profil cytokinique particulier suggère que les lymphocytes T auxiliaires naïfs (Th0) ainsi attirés puissent être polarisés vers un phénotype Th1. Le secrétome des macrophages PC1/3 KD traités au LPS pourrait donc orienter la réponse immunitaire adaptative vers la réponse cytotoxique.

Nous avons ensuite testé si les secrétomes des macrophages NT et PC1/3 KD pourraient avoir un effet cytotoxique sur des cellules cancéreuses.

#### II.2.6- Les macrophages PC1/3 KD traités au LPS sécrètent des facteurs anti-tumoraux actifs contre des lignées de cellules cancéreuses humaines du sein (SKBR3) et de l'ovaire (SKOV3).

La cytotoxicité des secrétomes des macrophages NT et PC1/3 KD sur des cellules cancéreuses a été évaluée par un test de viabilité [61]. Il repose sur une mesure de luminescence représentative de la quantité d'ATP présente. Ceci permet ainsi d'estimer le nombre de cellules cancéreuses viables dans la culture (**Figures 9A et B**). Ce test a été réalisé sur des lignées de cellules cancéreuses humaines du sein SKBR3 et de l'ovaire SKOV3. Pour ce faire, celles-ci ont été incubées pendant 24 h, 48 h, 72 h et 96 h en présence du secrétome de macrophages NR8383 NT et PC1/3 KD stimulés ou non pendant 24 h par 200 ng/mL de LPS. Dans la condition « 96h + milieu », le milieu a été complètement remplacé à 72 h par du secrétome frais et la viabilité des cellules a été estimée 24 h après. Deux tests de viabilité additionnels ont également été effectués en parallèle en guise de contrôles. Le premier a été réalisé avec du milieu HAMF12 qui est le milieu de culture des cellules NR8383. Le deuxième, quant à lui, a été mené avec du milieu HAMF12 supplémenté avec du LPS. Ce dernier contrôle permet de déterminer si le LPS encore présent dans le

milieu de culture pourrait avoir un effet cytotoxique direct sur les cellules cancéreuses.



**Figure 9 : Le sécrétome des cellules NR8383 PC1/3-KD présente des activités anti-tumorales contre les cellules SKBR3 et SKOV3.** La viabilité des cellules SKBR3 (A) et SKOV3 (B) a été évaluée par une mesure de luminescence réalisée à l'aide du kit CellTiter-Glo assay. Ces cellules ont été incubées en présence du sécrétome de cellules NR8383 stimulées (a) ou non (b) pendant 24 h par 200 ng/mL de LPS. Les tests ont été réalisés après 24 h, 48 h, 72 h et 96 h d'incubation. Dans le cas de la condition "96 h + milieu", le milieu a été remplacé par du sécrétome frais après 72 h d'incubation et la culture a été poursuivie pendant 24 h. Un contrôle négatif a été effectué en incubant les cellules avec du milieu HAMF12 (F12). La condition dans laquelle le milieu HAMF12 a été supplémenté avec du LPS (F12 + LPS) permet d'estimer si le LPS encore présent dans le milieu de culture pourrait avoir un effet cytotoxique direct sur les cellules cancéreuses. Les expériences ont été réalisées en triplicat et les données ont été analysées par un test de Student (\*p < 0.05).

Dans le cas des cellules SKBR3, aucun effet cytotoxique n'est exercé par les sécrétomes des macrophages NT et PC1/3 KD non stimulés (Figure 9Aa). En revanche, une diminution significative de la viabilité des cellules SKBR3 est observée après 72h et 96h de culture avec du sécrétome de macrophages PC1/3 KD traités au LPS (Figure 9Ab). Ainsi, en comparaison du sécrétome des cellules NT activées par du LPS, celui des cellules PC1/3 KD réduit l'intensité de la luminescence de 3 fois à 72 h et de 5 fois à 96 h. Concernant les cellules SKOV3 (Figures 9Ba et b), leur

viabilité diminue significativement pour la condition « 96h + milieu ». Ceci est observé avec les sécrétomes des cellules NT et PC1/3 KD et ce, aussi bien avec que sans stimulation par du LPS. Lorsque ces cellules ne sont pas traitées par du LPS, leurs sécrétomes réduisent d'1,7 fois l'intensité de la luminescence mesurée (**Figure 9Ba**). En présence du sécrétome des macrophages traités par du LPS, cette intensité diminue d'1,4 fois avec celui des cellules NT et de 2,2 fois avec celui des cellules PC1/3 KD (**Figure 9Bb**). Cependant, l'effet anti-tumoral exercé par le sécrétome des macrophages PC1/3 KD traités au LPS est à nouveau plus marqué que celui exercé par le sécrétome des cellules NT stimulées par le LPS (**Figure 9Bb**). L'ensemble de ces résultats montre que suite à une stimulation par du LPS, les macrophages PC1/3 KD sécrètent des facteurs solubles qui ont une activité anti-tumorale. Cependant, leur effet varie selon la lignée cellulaire considérée. En effet, les lignées SKBR3 et SKOV3 ne semblent pas présenter la même sensibilité aux facteurs libérés par les cellules PC1/3 KD. Ainsi, les cellules SKBR3 sont plus sensibles à l'action directe des facteurs sécrétés. Les cellules SKOV3 sont, quant à elles, sensibilisées par ces facteurs. En effet, le renouvellement du milieu conditionné contenant les mêmes molécules est nécessaire pour observer leur effet cytotoxique.

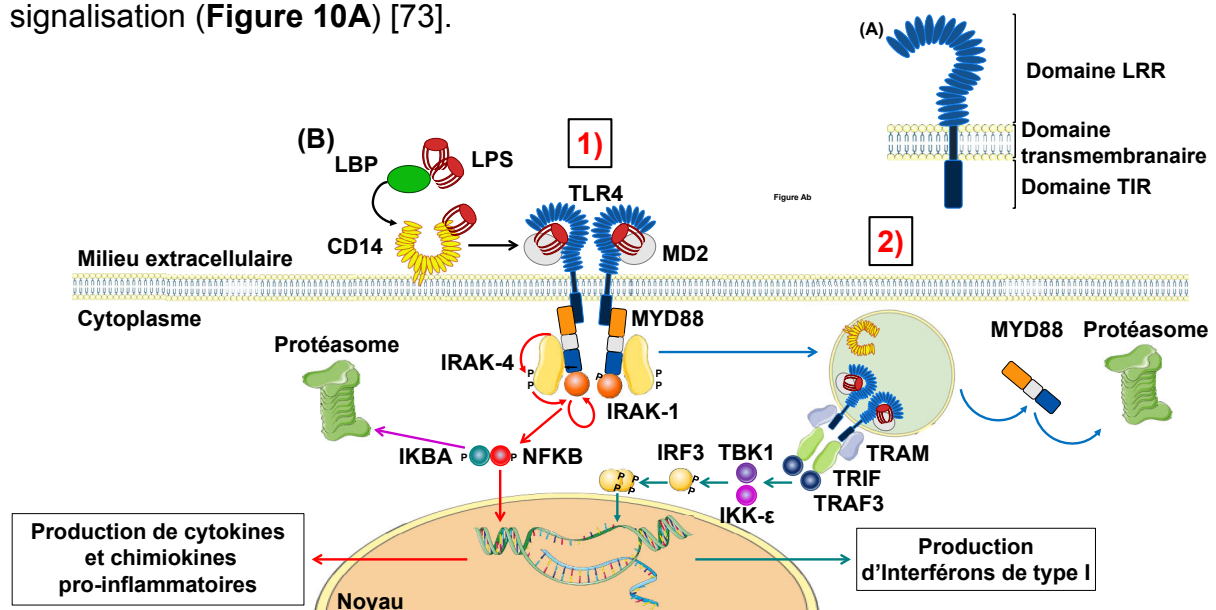
Ainsi, suite à un traitement par du LPS, les macrophages PC1/3 KD présentent un caractère pro-inflammatoire plus marqué. Comme nous venons de le voir, ceci se traduit par une sécrétion accrue de facteurs pro-inflammatoires et anti-tumoraux. En outre, ces résultats suggèrent fortement que la voie de signalisation associée au TLR4 puisse être également dérégulée. C'est ce que nous avons ensuite cherché à déterminer.



## II.3- PC1/3 régule le trafic intracellulaire du TLR4 et ainsi l'activation de la voie dépendante de MYD88.

### II.3.1- Rappels sur les voies de signalisation associées au TLR4.

Comme tous les TLRs, le TLR4 est une glycoprotéine transmembranaire de type 1 composée de trois parties [72] : une partie extracellulaire N-terminale appelée «Leucine Rich Repeat» (LRR), impliquée dans la reconnaissance du ligand, un domaine transmembranaire et une partie C-terminale présentant le domaine TIR (Toll Interleukin 1 Receptor) indispensable pour recruter les éléments de la voie de signalisation (**Figure 10A**) [73].

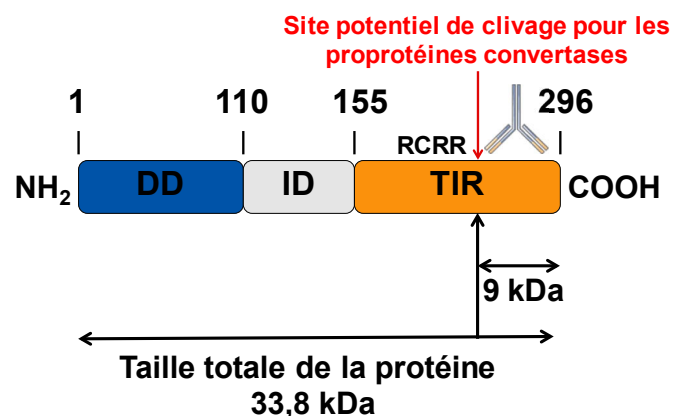


**Figure 10 : (A) Structure du TLR4. (B) Voies de signalisation associées au TLR4. (1) Voie dépendante de MyD88.** Le LPS extrait des membranes des bactéries GRAM négatives par les protéines LBP circulantes est transféré au co-récepteur CD14. Il sépare les agrégats de LPS pour présenter des molécules monomériques au complexe TLR4–MD2. MYD88 est alors recruté au niveau du TLR4 par son domaine TIR. IRAK-4 se lie à MYD88 au niveau de l'ID et DD et s'autophosphoryle. IRAK-1 s'associe avec le DD de MYD88. IRAK-1 est phosphorylée par IRAK-4 activée. IRAK-1 s'autophosphoryle et déclenche la voie de signalisation associée. Il en résulte la phosphorylation de NFKB et de son inhibiteur IKBA. Celui-ci est alors ubiquitiné et ainsi dégradé par le protéasome. NFKB qui était séquestré dans le cytoplasme par IKBA peut alors transloquer dans le noyau pour y induire l'expression de gènes codant des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. (2) Après activation, le TLR4 est internalisé dans les endosomes précoces. MYD88 se dissocie du récepteur et est remplacé par TRIF et TRAM. La voie de signalisation ainsi induite conduit à la phosphorylation d'IRF3 qui transloque dans le noyau pour induire l'expression de gènes codant des interférons de type I.

Lors d'une infection par des bactéries GRAM négatives, le LPS contenu dans leur membrane est tout d'abord extrait par les protéines LBP (LPS binding protein) circulantes (**Figure 10B**). Les LBP transfèrent alors le LPS au co-récepteur CD14 (Cluster de différenciation 14) présent à la surface cellulaire. Le CD14 sépare les agrégats de LPS pour obtenir des molécules monomériques présentées au complexe TLR4–MD-2 qui est exprimé à la membrane plasmique. Le TLR4 se dimérise alors [74] afin d'initier les voies de signalisation qui lui sont associées.

#### A.- La voie dépendante de MYD88.

Comme pour tous les TLRs, à l'exception du TLR3, le premier adaptateur recruté par le TLR4 est MYD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88). MYD88 présente trois parties : un domaine de mort N-terminal (DD), un domaine intermédiaire (ID) et un domaine TIR C-terminal (**Figure 11**) [75].



**Figure 11 : Représentation schématique de la protéine MYD88 avec le site potentiel de clivage pour les proprotéines convertases dans le domaine TIR.** MYD88 présente un poids moléculaire de 33,8 kDa. Un clivage par une proprotéine convertase libérerait un fragment C-terminal de 9 kDa. L'anticorps utilisé lors des expériences de Western blot est dirigé contre un épitope localisé dans la partie C-terminale de MYD88. DD: death domain; ID: intermediate domain.

Le recrutement de MYD88 au niveau du récepteur est réalisé via une interaction homophile entre les domaines TIR du TLR et de l'adaptateur. Ceci induit le recrutement d'IRAK-4 par les domaines ID et DD de MYD88 menant ainsi à l'autophosphorylation d'IRAK-4. IRAK-1, quant à elle, s'associe au DD de MYD88 et est alors phosphorylée par IRAK-4 activée (**Figure 10B**). Ceci conduit à

l'autophosphorylation d'IRAK-1, ce qui déclenche la voie de signalisation associée [76]. L'activation de ces deux protéines mène à une cascade de phosphorylation et à l'activation de facteurs de transcription comme NF $\kappa$ B. A l'état basal, l'inhibiteur IKBA est complexé à NF $\kappa$ B et il le retient ainsi dans le cytoplasme. L'activation de la voie de signalisation conduit à leur dissociation suite à la phosphorylation d'IKBA et de NF $\kappa$ B. En effet, la phosphorylation d'IKBA induit son ubiquitination et ainsi sa dégradation au niveau du protéasome. NF $\kappa$ B phosphorylé ainsi libéré transloque alors dans le noyau pour induire l'expression de gènes codant pour des effecteurs de l'inflammation tels que des cytokines et des chimiokines spécifiques [76–79]. Suite à son activation, le TLR4 est alors internalisé au niveau des endosomes précoces [80].

#### B- La voie indépendante de MYD88.

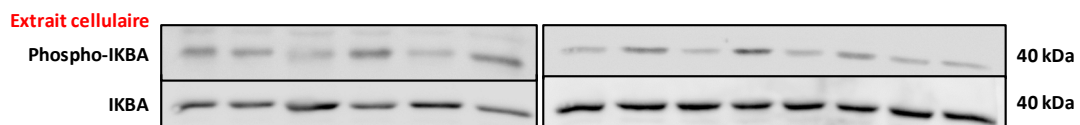
Au niveau de l'endosome, MYD88 se dissocie du récepteur et il est remplacé par les adaptateurs TRIF (TIR-domain-containing protein adaptor inducing IFN- $\beta$ ) et TRAM (TRIF-related adaptor molecule) [81] (**Figure 10B**). TRIF interagit avec TRAF3, ce qui permet le recrutement de TBK1 et d'IKK- $\epsilon$ . Ces kinases phosphorylent IRF3, qui transloque alors sous forme de dimères dans le noyau pour induire l'expression de gènes codant des interférons de type I [82]. Suite à l'induction de la voie IRF-3, l'endosome précoce peut avoir deux devenir. Dans son premier devenir, il est mûri en endosome tardif. Ce dernier fusionne alors avec un lysosome, conduisant ainsi à la destruction du récepteur et à la fin de la signalisation. Dans son deuxième devenir, l'endosome précoce fusionne avec un endosome de recyclage (ERC). Ce dernier constitue une réserve intracellulaire de TLR4 [83].

Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que les voies de signalisation associées au TLR4 puissent être altérées dans les macrophages PC1/3 KD. Cette hypothèse est fortement soutenue par notre étude protéomique [61]. En effet, celle-ci révèle que dans les macrophages PC1/3 KD stimulés ou non par du LPS, l'abondance relative d'IRF3 diminue alors que celle de NF $\kappa$ B1 (sous-unité p105) augmente. La voie dépendante de MYD88 pourrait donc être plus fortement sollicitée dans ces cellules. Afin de le vérifier, nous avons étudié le taux de phosphorylation d'IKBA et la translocation nucléaire d'IRF-3 [61].

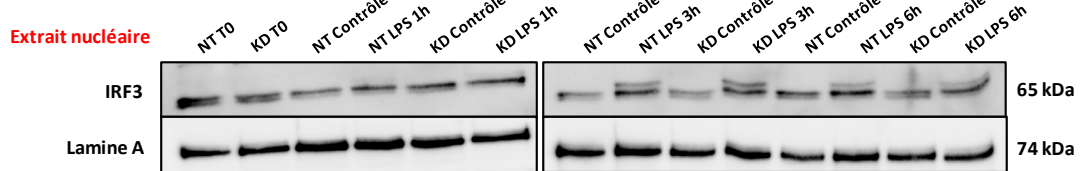
II.3.2- En absence de PC1/3, la voie NFKB est plus longuement activée ce qui indique un recrutement plus important de la voie dépendante de MYD88.

Les macrophages NT et PC1/3 KD ont été stimulés ou non pendant 1 h, 3 h et 6 h par 200 ng/mL de LPS et des western blots ont été réalisés. Afin d'étudier la phosphorylation d'IKBA, des extraits protéiques cellulaires totaux et un anticorps dirigé contre sa forme phosphorylée ont été utilisés (**Figure 12A**).

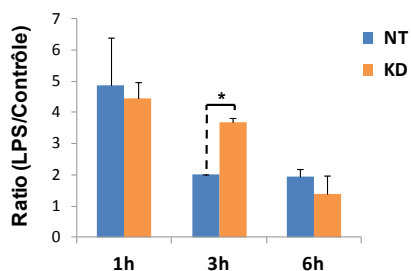
(A)



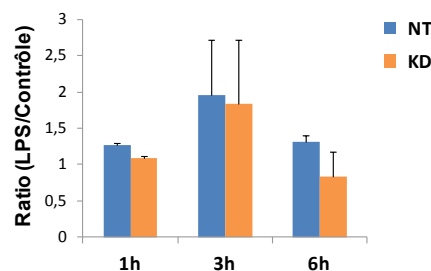
(B)



(C)



(D)



**Figure 12 : Analyse par Western blot des voies de signalisation associées au TLR4. (A)** Etude de la phosphorylation d'IKBA et des taux d'IKBA (extraits cellulaires) et **(B)** d'IRF3 et de la lamine A (extraits nucléaires) après stimulation on non des macrophages NT et PC1/3 KD avec 200 ng/mL de LPS pendant 1 h, 3 h et 6 h. **(C)** Représentations graphiques de la quantification relative de phospho-IKBA et **(D)** d'IRF3. Leurs niveaux relatifs ont été obtenus en réalisant la normalisation suivante : Intensité phospho-IKBA / intensité IKBA et intensité IRF3 / intensité lamine A. Le ratio entre les échantillons stimulés au LPS et ceux non stimulés a ensuite été réalisé. Les expériences ont été réalisées en triplicat et les données ont été analysées par un test de Student (\*p < 0.05).

Pour estimer l'équicharge protéique entre chaque condition, les membranes ont ensuite été déshybridées puis réhybridées avec un anticorps dirigé contre les protéines IKBA totales. Puis, l'intensité des bandes obtenues a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ. Le niveau relatif de phosphorylation d'IKBA a pu alors être

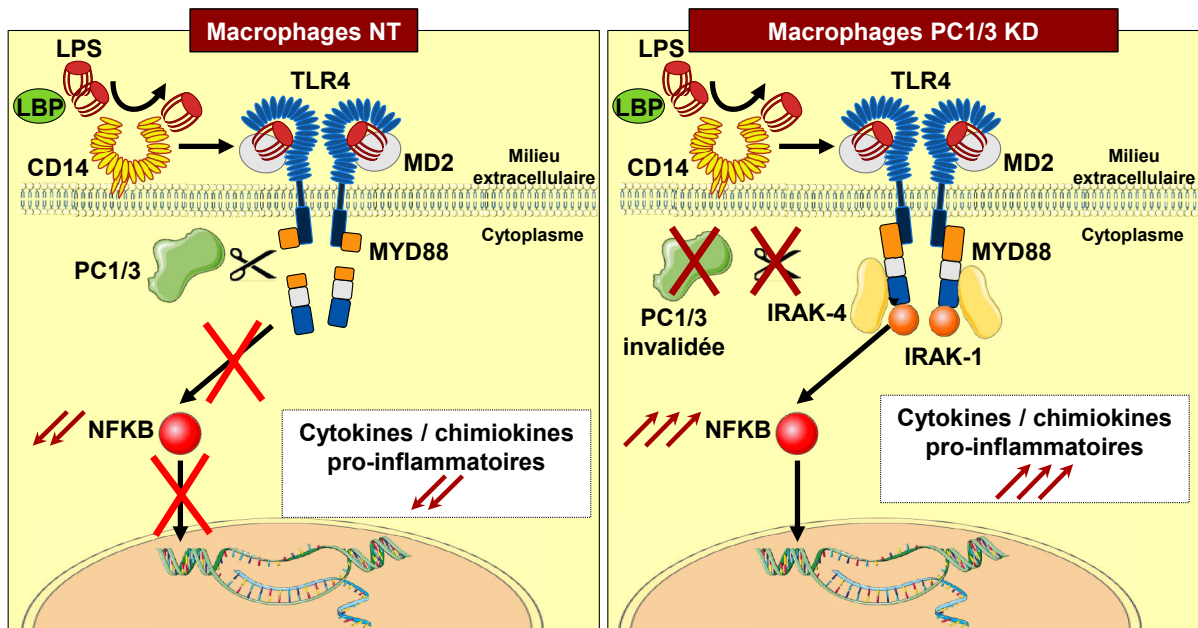
déterminé en réalisant la normalisation suivante : Intensité phospho-IKBA / intensité IKBA. Enfin, afin d'évaluer l'effet du LPS sur le taux de phosphorylation d'IKBA, le ratio suivant a été effectué : Valeur normalisée de phospho-IKBA sous LPS / Valeur normalisée de phospho-IKBA de la condition contrôle. C'est ce ratio qui est représenté sur le graphique de la **Figure 12C**. Dans le cas d'IRF3, les expériences ont été menées sur les fractions nucléaires et avec un anticorps dirigé contre les protéines IRF-3 totales (**Figure 12B**). Cette fois-ci, la normalisation a été réalisée après marquage de la lamine A qui est l'un des constituants de la *lamina* nucléaire. Enfin, l'effet du LPS sur la translocation nucléaire d'IRF-3 a été estimé grâce au ratio suivant : Valeur normalisée d'IRF-3 sous LPS / Valeur normalisée d'IRF-3 de la condition contrôle. Ce ratio est présenté sur le graphique de la **Figure 12D**.

Les résultats obtenus montrent que les cellules NT et PC1/3 KD traitées pendant une heure au LPS présentent le même taux de phosphorylation d'IKBA (**Figure 12C**). En revanche, à 3h post-traitement, celui-ci diminue dans les macrophages NT alors qu'il reste au même niveau pour les cellules PC1/3 KD. Ce n'est qu'après 6h de stimulation au LPS, que cette diminution survient dans les macrophages PC1/3 KD. Cette altération de la cinétique de phosphorylation d'IKBA implique que la voie NF $\kappa$ B est plus longtemps activée dans les macrophages PC1/3 KD traités au LPS. Ceci confirme donc que la voie dépendante de MYD88 est plus fortement stimulée dans ces cellules.

Concernant IRF3, une duplication de sa bande est visible sur le western blot réalisé et ce, après 3 h et 6 h de traitement par du LPS (**Figure 12B**). Celle-ci est liée aux différents états de phosphorylation d'IRF-3. Cependant, au cours de la cinétique de stimulation effectuée, la quantité relative d'IRF-3 qui transloque dans le noyau est identique entre les macrophages NT et PC1/3 KD (**Figure 12D**). Ceci démontre qu'à l'inverse de la voie dépendante de MYD88, la voie indépendante de MYD88 n'est pas impactée par l'absence de PC1/3.

Nous avons donc ensuite cherché à comprendre pourquoi la voie dépendante de MYD88 est plus longtemps activée en absence de PC1/3. Dans les cellules PC1/3 KD, l'organisation du cytosquelette et l'homéostasie calcique sont fortement perturbées [61]. Or, il est connu que le cytosquelette peut moduler la machinerie du trafic intracellulaire via la polymérisation des microtubules et la mobilisation de calcium [84,85]. Par ailleurs, dans les macrophages NR8383 de type sauvage, PC1/3

et le TLR4 cheminent ensemble au sein de la cellule suite à une stimulation par du LPS [60]. Ainsi, nous avons émis la première hypothèse que PC1/3 pourrait contrôler l'expression du TLR4 à la surface cellulaire. Par ailleurs, par une analyse bioinformatique, nous avons trouvé un site de clivage potentiel pour les proprotéines convertases dans le domaine TIR de MYD88 (**Figure 11**) [86]. Nous avons donc émis la seconde hypothèse que PC1/3 contrôlerait l'activation de la voie de signalisation associée au TLR4 par le clivage de MYD88 (**Figure 13**). Ces hypothèses ont été testées par des expériences d'immunofluorescence et de Western blot.

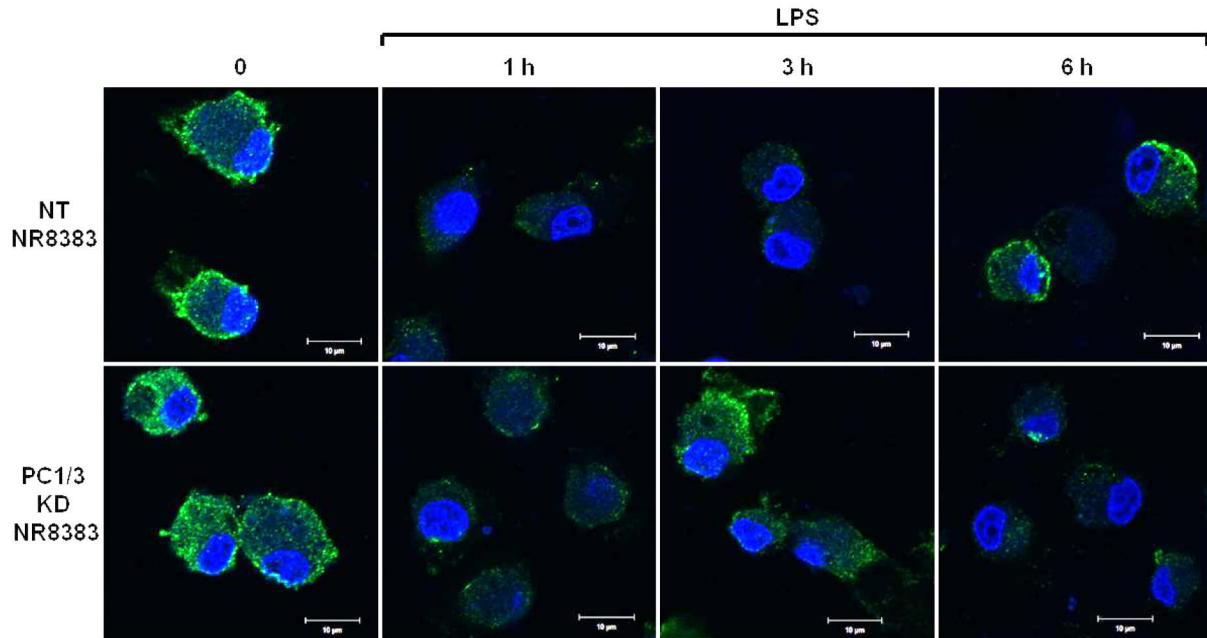


**Figure 13 : PC1/3 pourrait contrôler l'activation de la voie de signalisation associée au TLR4 par le clivage de MYD88.** Suite à l'activation du TLR4 par le LPS, MYD88 est recruté et interagit avec le récepteur par son domaine TIR. Si PC1/3 clive MYD88 au niveau de son domaine TIR alors le récepteur serait découplé de la voie de signalisation. Il en résulterait une réduction de l'activation de NFKB et ainsi de la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. En revanche, en absence de PC1/3, ce clivage ne surviendrait pas. Cela expliquerait pourquoi la voie de signalisation dépendante de MYD88 serait plus longtemps activée.

### II.3.3- Suite à son internalisation, le TLR4 est plus rapidement réexprimé à la surface cellulaire des macrophages PC1/3 KD.

Afin d'étudier l'expression du TLR4 à la surface cellulaire, les macrophages NT et PC1/3 KD ont été stimulés par 200 ng/mL de LPS pendant 0, 1h, 3h et 6h [86]. Une

expérience d'immunofluorescence a alors été réalisée sans perméabiliser les cellules et en utilisant un anticorps qui reconnaît un épitope localisé dans le domaine extracellulaire du TLR4 (**Figure 14**).



**Figure 14** : Suite à son internalisation, le TLR4 est plus rapidement réexprimé à la surface cellulaire des macrophages PC1/3 KD stimulés au LPS. Les macrophages NT et PC1/3 KD ont été stimulés avec 200 ng/mL de LPS pendant 1 h, 3 h et 6 h. Le marquage a été réalisé avec un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire du TLR4 (marquage vert). Afin de détecter uniquement le TLR4 à la surface cellulaire, l'étape de perméabilisation des cellules a été omise lors de l'immunofluorescence réalisée. Les noyaux ont été marqués avec du Hoechst 33 342 (bleu). Une analyse par microscopie confocale a ensuite été réalisée. Barre d'échelle : 10 μm.

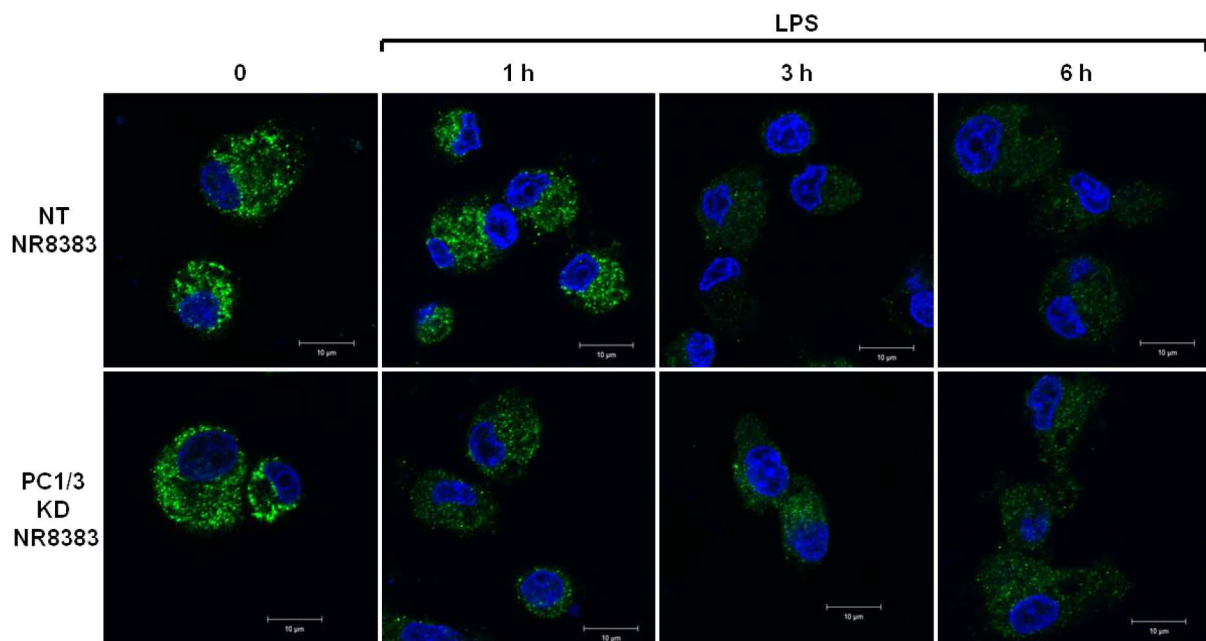
Dans le cas des cellules NT, une diminution forte de l'expression du TLR4 à la surface cellulaire est observée suite à 1 h de traitement au LPS. Celle-ci résulte de l'internalisation du récepteur dans les endosomes précoces. Après 3 h de stimulation, le niveau d'expression du TLR4 à la membrane plasmique reste très bas. Sa présence à la surface cellulaire ne redevient clairement visible qu'après 6h de stimulation. Concernant les macrophages PC1/3 KD, le TLR4 est également internalisé suite à 1 h de traitement. En revanche, sa réexpression au niveau de la membrane plasmique est cette fois-ci observée après 3 h de stimulation. Puis, le TLR4 disparaît de nouveau de la surface cellulaire suite à 6 h de stimulation par le LPS. Ces résultats révèlent que le turnover du TLR4 au niveau de la membrane plasmique est altéré en absence de PC1/3. Par ailleurs, sa réexpression plus rapide

à la surface cellulaire pourrait expliquer pourquoi la voie NFKB est plus longuement activée dans les macrophages PC1/3 KD traités au LPS.

Nous avons alors émis l'hypothèse que ce retour plus précoce du TLR4 au niveau de la membrane plasmique observé en absence de PC1/3 résulterait d'une altération de son trafic intracellulaire.

#### II.3.4- PC1/3 est impliquée dans le contrôle du trafic intracellulaire du TLR4.

Afin d'étudier le trafic intracellulaire du TLR4, les macrophages NT et PC1/3 KD ont été stimulés par 200 ng/mL de LPS pendant 0, 1h, 3h et 6h [86]. Une nouvelle expérience d'immunofluorescence a alors été réalisée mais cette fois-ci en perméabilisant les cellules (**Figure 15**).



**Figure 15 : PC1/3 est impliquée dans le contrôle du trafic intracellulaire du TLR4.** Les macrophages NT et PC1/3 KD ont été stimulés avec 200 ng/mL de LPS pendant 1 h, 3 h et 6 h. Après fixation, les cellules ont été perméabilisées puis le marquage a été réalisé avec un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire du TLR4 (marquage vert). Les noyaux ont été marqués avec du Hoechst 33 342 (bleu). Une analyse par microscopie confocale a ensuite été réalisée. Barre d'échelle : 10 μm.

A l'intérieur des cellules NT à l'état basal, le TLR4 est détecté sous forme d'agrégats fortement marqués. Ceux-ci restent visibles après 1 h de traitement au



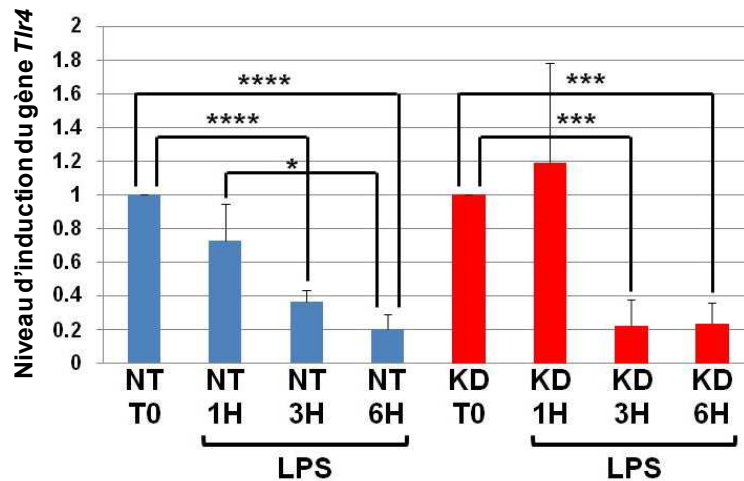
LPS. En revanche, leur intensité décroît très fortement suite à 3 h et 6 h de stimulation. Cette diminution pourrait être le reflet de l'adressage du TLR4 vers la surface cellulaire pour y être réexprimé après 6h de traitement au LPS (**Figure 14**). Dans les macrophages PC1/3 KD non traités, le TLR4 est également détecté sous forme d'agrégats fortement marqués (**Figure 15**). Néanmoins, leur intensité diminue très fortement dès 1 h de traitement au LPS et reste faible tout au long de la cinétique de stimulation. Ceci pourrait également être corrélé avec la réexpression plus rapide du récepteur au niveau de la membrane plasmique des cellules PC1/3 KD (**Figure 14**).

Ces résultats démontrent que PC1/3 est impliquée dans la régulation du trafic du TLR4 depuis des compartiments intracellulaires vers la membrane plasmique des macrophages.

Chez l'Homme, l'expression du gène codant le TLR4 est induite suite à une stimulation par du LPS [87]. De plus, au niveau de son promoteur, plusieurs sites de liaison pour NFκB sont présents [88]. Cela est également observé chez les rongeurs [88]. Puisque la voie NFκB est plus longuement activée dans les macrophages PC1/3 KD traités au LPS, nous avons émis l'hypothèse que l'expression du gène *Tlr4* y serait plus fortement induite.

### II.3.5- Les taux de transcrits codant le TLR4 diminuent dans les macrophages NT et PC1/3 KD traités au LPS.

Les macrophages NT et PC1/3 KD ont été stimulés par 200 ng/mL de LPS pendant 0, 1h, 3h et 6h et des PCR quantitatives en temps réel ont été réalisées (**Figure 16**) [86]. Dans les cellules NT, le niveau de messagers *Tlr4* décroît tout au long de la cinétique de stimulation et devient significativement plus bas à 3 h et 6 h de stimulation. Un résultat similaire est obtenu pour les macrophages PC1/3 KD. Ceci suggère que le récepteur puisse être synthétisé à partir de ce pool préexistant de transcrits. Cette synthèse pourrait soutenir la réexpression du TLR4 à la surface cellulaire ou le réapprovisionnement de l'ERC si la translocation du récepteur s'effectue à partir de ce compartiment [83,89].



**Figure 16 : Les taux de transcrits codant le TLR4 diminuent dans les macrophages NT et PC1/3 KD traités au LPS.** Les macrophages NT et PC1/3 KD ont été stimulés avec 200 ng/mL de LPS pendant 1 h, 3 h et 6 h. Trois expériences indépendantes ont été réalisées. Les résultats sont présentés sous forme graphique (moyenne ± SD). Les données ont été analysées par un test de Student (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

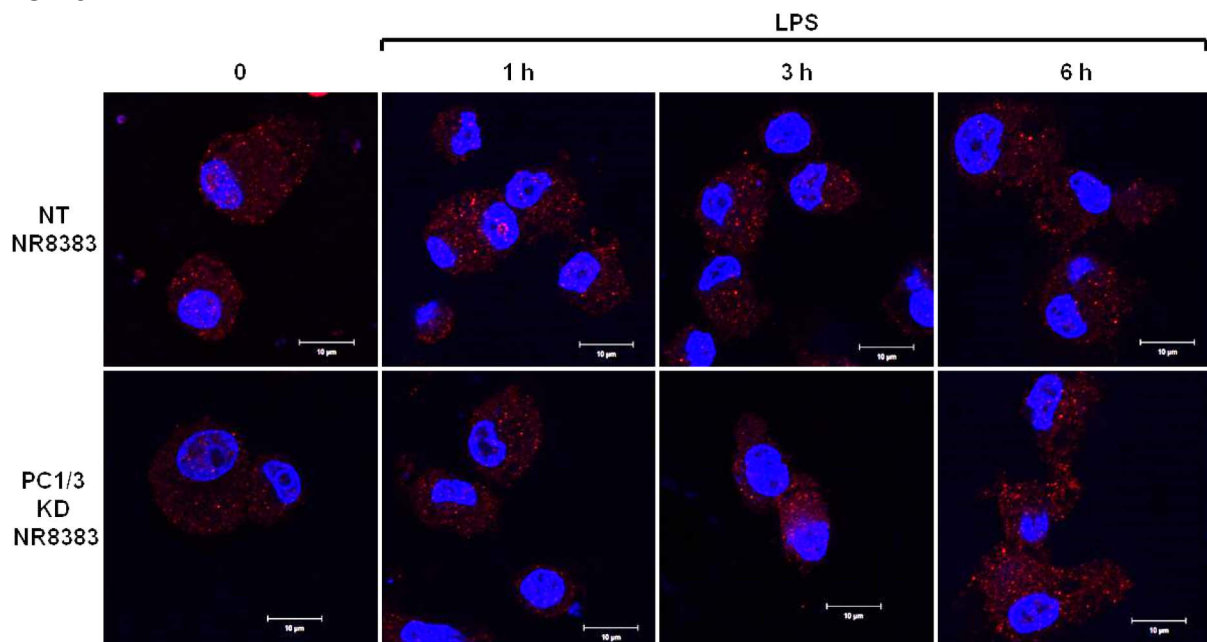
Néanmoins, nous ne pouvons pas non plus exclure que cette diminution puisse être liée à la dégradation des messagers afin de bloquer la production du récepteur. Dans tous les cas et contrairement à ce que nous avons envisagé, le niveau de transcrits codant le TLR4 est modulé de la même façon dans les cellules NT et PC1/3 KD. Ainsi, nous pouvons conclure que la différence que nous avons observée entre les deux types cellulaires est uniquement liée à une altération du trafic intracellulaire du récepteur (**Figures 14 et 15**) [86].

Nous avons ensuite cherché à déterminer si PC1/3 pourrait aussi contrôler l'activation de la voie de signalisation associée au TLR4 par le clivage de MYD88 (**Figure 11**).

### II.3.6- Etude de la localisation intracellulaire de MYD88 dans les macrophages NT et PC1/3 KD traités au LPS.

Dans un premier temps, nous avons souhaité évaluer si l'absence de PC1/3 pourrait impacter la localisation intracellulaire de MYD88 [86]. Pour ce faire, les

macrophages NT et PC1/3 KD ont été stimulés par 200 ng/mL de LPS pendant 0, 1h, 3h et 6h. Une expérience d'immunofluorescence a alors été réalisée à l'aide d'un anticorps qui reconnaît un épitope localisé dans la partie C-terminale du domaine TIR de MYD88 (**Figures 11 et 17**). Durant toute la cinétique de stimulation, MYD88 est détecté sous forme d'agrégats distribués dans le cytoplasme des cellules NT et PC1/3 KD. Par ailleurs, il présente la même distribution dans les deux types cellulaires ce qui indique que sa localisation n'est pas impactée par l'absence de PC1/3.



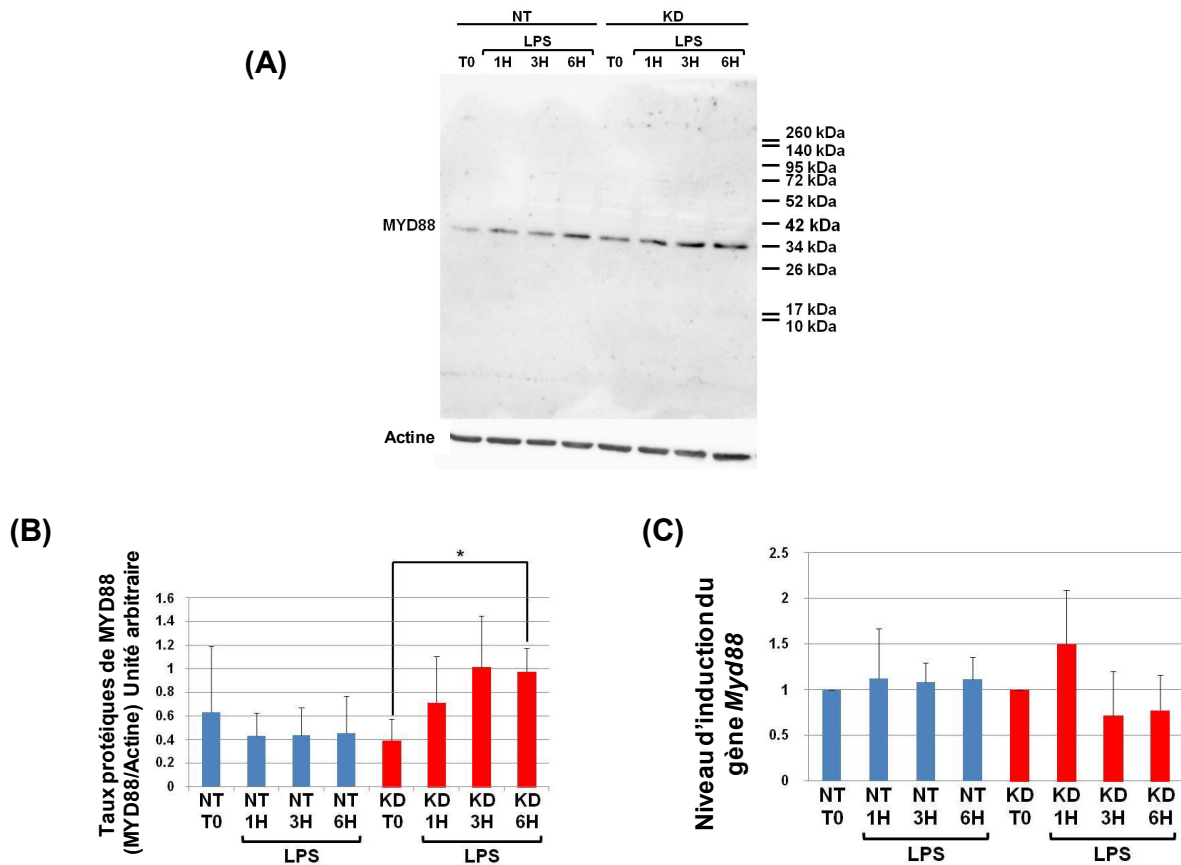
**Figure 17 : PC1/3 ne contrôle pas la localisation de MYD88.** Les macrophages NT et PC1/3 KD ont été stimulés avec 200 ng/mL de LPS pendant 1 h, 3 h et 6 h. Après fixation, les cellules ont été perméabilisées puis le marquage a été réalisé avec un anticorps dirigé contre la partie C-terminale de MYD88 (marquage rouge). Les noyaux ont été marqués avec du Hoechst 33 342 (bleu). Une analyse par microscopie confocale a ensuite été réalisée. Barre d'échelle : 10 μm.

Nous avons ensuite testé l'hypothèse que PC1/3 pourrait cliver MYD88.

### II.3.7- Après 6 h de stimulation au LPS, le taux protéique de MYD88 est plus élevé dans les macrophages PC1/3 KD.

Pour déterminer si PC1/3 clive MYD88, les macrophages NT et PC1/3 KD ont été stimulés par 200 ng/mL de LPS pendant 0, 1h, 3h et 6h et un western blot a été

réalisé (**Figures 18A et B**) [86]. L'anticorps qui reconnaît un épitope localisé dans la partie C-terminale du domaine TIR de MYD88 a de nouveau été utilisé (**Figure 11**).



**Figure 18 : Après 6 h de stimulation au LPS, le taux protéique de MYD88 est plus élevé dans les macrophages PC1/3 KD. (A)** Les macrophages NT et PC1/3 KD ont été stimulés avec 200 ng/mL de LPS pendant 1 h, 3 h et 6 h. Le western blot a été réalisé à l'aide de l'anti-MYD88 (**Figure 11**). **(B)** Les intensités de MYD88 (33,8 kDa) ont été quantifiées et normalisées avec celles de l'actine. **(C)** Etude du niveau d'expression du gène codant MYD88 dans les cellules NT et PC1/3 KD traitées avec 200 ng/mL de LPS pendant 1 h, 3 h et 6 h. Trois expériences indépendantes ont été réalisées. Les résultats sont présentés sous forme graphique (moyenne  $\pm$  SD). Les données ont été analysées par un test de Student (\* $p$  value of < 0.05).

Ainsi, si une proprotéine convertase clive le domaine TIR de MYD88, un fragment de 9 kDa correspondant à la partie protéique clivée serait détecté (**Figure 11**). Cependant, durant toute la cinétique de stimulation, ce fragment protéique n'est jamais observé et ce, que ce soit dans les cellules NT ou PC1/3 KD (**Figure 18A**). Seule la forme entière de MYD88 de 33,8 kDa est visible. Cette absence de clivage n'est pas si surprenante puisque MYD88 est cytosolique, il ne serait donc pas accessible pour une proprotéine convertase. Néanmoins, l'intensité de cette bande

de 33,8 kDa a été mesurée et normalisée avec celle de l'actine (**Figure 18**). Ceci révèle qu'au cours du traitement par le LPS, les taux protéiques de MYD88 varient de façon différente entre les macrophages NT et PC1/3 KD. Dans les cellules NT, le taux protéique de MYD88 tend à diminuer légèrement tout au long de la cinétique de stimulation bien que cela ne soit pas significatif. En revanche, dans les macrophages PC1/3 KD, une augmentation progressive du niveau protéique de MYD88 est observée de 1 h à 3 h de stimulation pour devenir significativement plus élevé après 6 h de traitement. Ces résultats démontrent que PC1/3 ne contrôle pas le clivage protéolytique de MYD88 mais qu'elle peut intervenir dans la régulation de sa biosynthèse. Par ailleurs, notons que cette augmentation du taux protéique de MYD88 pourrait également contribuer à maintenir la voie NF $\kappa$ B activée.

Chez la souris, l'expression du gène *Myd88* est induite dans les macrophages stimulés au LPS [90]. De plus, au niveau de son promoteur, plusieurs sites de liaison pour le facteur de transcription Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) sont présents [91]. Lors de notre étude protéomique, nous avons pu démontrer que STAT1 est exclusivement co-exprimé avec NF $\kappa$ B dans les cellules PC1/3 KD traitées au LPS [61]. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'expression du gène codant MYD88 serait plus fortement induite dans les cellules PC1/3 KD afin de permettre l'augmentation de son niveau protéique (**Figure 18**).

### II.3.8- Quantification des taux de transcrits *Myd88* dans les macrophages NT et PC1/3 KD traités au LPS.

Pour tester cette hypothèse, les macrophages NT et PC1/3 KD ont été stimulés par 200 ng/mL de LPS pendant 0, 1h, 3h et 6h et des PCR quantitatives en temps réel ont été réalisées (**Figure 18C**) [86]. De façon surprenante, aucune modulation significative de l'expression du gène *Myd88* n'est observée et ce, que ce soit dans les cellules NT ou PC1/3 KD. Par ailleurs, les niveaux de messagers *Myd88* ne sont pas significativement différents entre les deux types cellulaires. Une corrélation claire entre la synthèse de la protéine MYD88 et l'expression de son gène ne peut donc pas être établie dans les macrophages PC1/3 KD traités au LPS. Un autre

mécanisme tel qu'une augmentation de la demi-vie de la protéine ou de sa stabilité pourrait donc être responsable de l'élévation du taux protéique de MYD88.

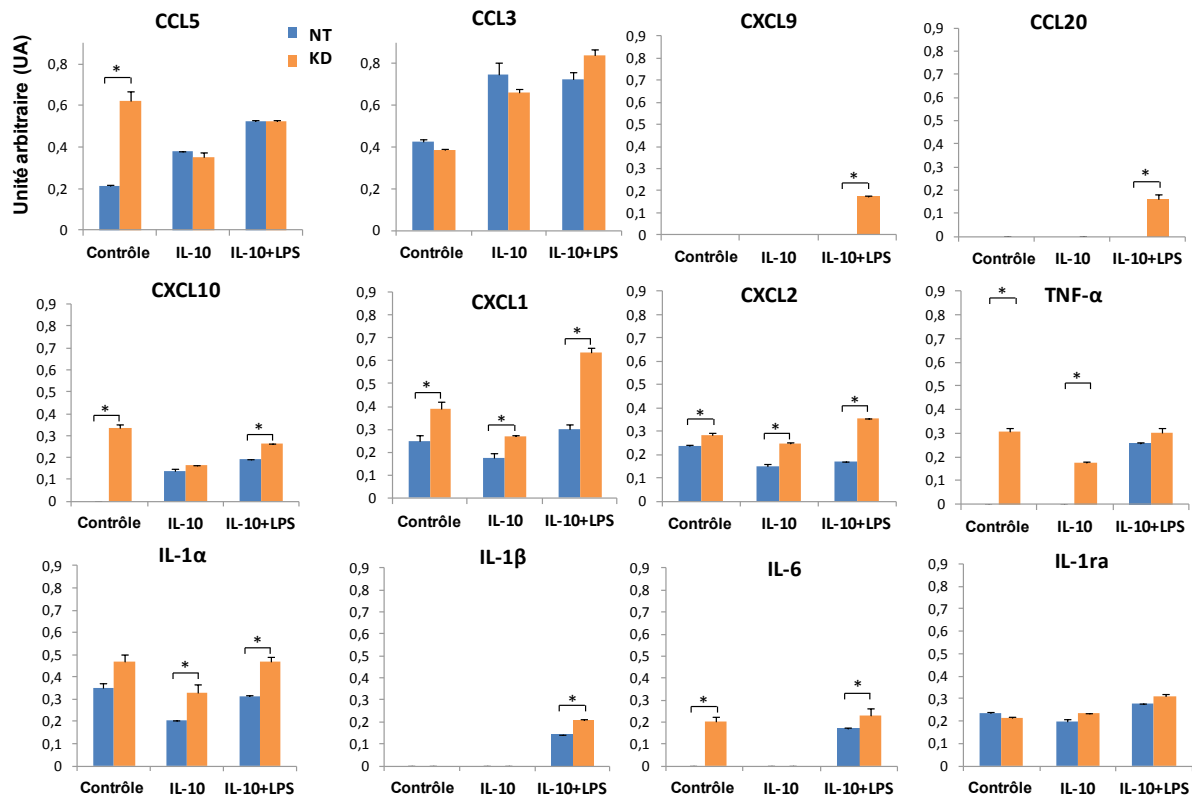
Ainsi, l'ensemble de ces résultats montre que la voie pro-inflammatoire NF $\kappa$ B serait maintenue activée de par la réexpression plus rapide du TLR4 à la surface cellulaire et l'augmentation du taux protéique de MYD88. Rappelons que les souris PC1/3 KO libèrent une quantité plus importante d'une cytokine anti-inflammatoire, l'IL-10 [59]. Malgré tout, chez ces animaux, la réponse immunitaire est orientée vers la voie Th1. Ceci suggère donc l'échec du rétrocontrôle négatif exercé par l'IL-10 sur la réponse pro-inflammatoire. Puisque la voie pro-inflammatoire est altérée dans les cellules PC1/3 KD, nous avons émis l'hypothèse qu'il pourrait en être de même pour la voie anti-inflammatoire. Pour la tester, nous avons stimulé les macrophages NT et PC1/3 KD avec de l'IL-10 et nous avons étudié la voie de signalisation associée.

### II.3.9- En absence de PC1/3, les macrophages résistent à l'effet inhibiteur de l'IL-10 et présentent une inhibition de la voie anti-inflammatoire associée STAT3.

#### A- Les macrophages PC1/3 KD traités avec de l'IL-10 continuent de sécréter plus de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires que les macrophages NT.

Dans un premier temps, nous avons testé l'impact qu'un traitement avec de l'IL-10 pourrait avoir sur la sécrétion cytokinique des macrophages NT et PC1/3 KD [61]. Pour ce faire, ces cellules ont été traitées ou non pendant 24 h avec 20 ng/mL d'IL-10 puis le milieu de culture a été remplacé par du milieu contenant ou non 200 ng/mL de LPS. Après une nouvelle incubation de 24h, les sécrétomes ont été collectés et analysés à l'aide d'une puce à cytokines (**Figure 19**). Ainsi, la quantité des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires CXCL1, CXCL2, TNF- $\alpha$  et IL1- $\alpha$  sécrétées par les macrophages NT et PC1/3 KD décroît suite à ce traitement avec de l'IL-10. Néanmoins, les cellules PC1/3 KD résistent mieux à l'inhibition exercée par l'IL-10 puisqu'elles continuent d'en libérer plus que les cellules NT. Lorsque les cellules ont été stimulées par du LPS suite à ce traitement avec de l'IL-10, la sécrétion cytokinique est rétablie et ce, pour les deux types cellulaires. A nouveau, une

augmentation significative de la quantité de cytokines et chimiokines libérées est observée pour les cellules PC1/3 KD et en particulier pour CXCL1, CXCL2, CXCL10, IL1- $\alpha$  et IL-6. Ceci démontre que même en présence d'un environnement inhibiteur, les macrophages PC1/3 KD conservent un phénotype pro-inflammatoire plus marqué.



**Figure 19 : Profils de sécrétion cytokinique et chimiokinique des macrophages NT et PC1/3 KD sous condition inhibitrice.** Les cellules ont été traitées ou non pendant 24 h avec 20 ng/mL d'IL-10 (IL-10) puis le milieu de culture a été remplacé par du milieu contenant ou non 200 ng/mL de LPS (IL-10+LPS). Après une nouvelle incubation de 24h, les sécrétomes ont été collectés et analysés à l'aide d'une puce à cytokines. Les résultats obtenus avec les sécrétomes des cellules NT sont présentés en bleu et ceux obtenus avec les sécrétomes des cellules PC1/3 KD sont présentés en orange. Les diagrammes ont été obtenus en réalisant le ratio entre la densité moyenne de pixels des spots expérimentaux et celle des spots de référence. Pour estimer la significativité des résultats, un test de Student a été réalisé (\*p < 0.05).

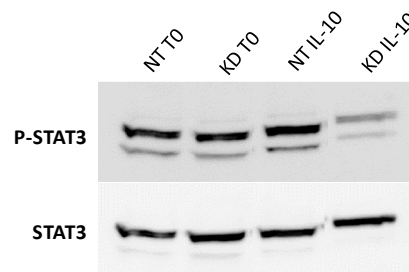
L'IL-10 exerce son effet via son récepteur et l'activation de la voie de signalisation associée JAK-STAT (Janus Kinase - Signal transducer and activator of transcription) [92]. Cette activation conduit notamment à la phosphorylation du facteur de

transcription STAT3. Pour déterminer si cette voie de signalisation est altérée en absence de PC1/3, nous avons donc étudié cette phosphorylation de STAT3.

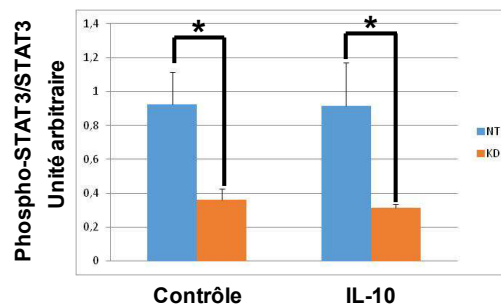
B- La voie anti-inflammatoire STAT3 est réprimée dans les macrophages PC1/3 KD traités ou non avec de l'IL-10.

Les macrophages NT et PC1/3 KD ont été stimulés ou non pendant 24 h par 20 ng/mL d'IL-10 [93]. Un western blot a alors été réalisé à l'aide d'un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de STAT3 (**Figure20A**).

(A)



(B)



**Figure 20 : La voie anti-inflammatoire STAT3 est réprimée dans les macrophages PC1/3 KD traités ou non avec de l'IL-10.** Les cellules NT et PC1/3 KD ont été traitées ou non pendant 24 h avec 20 ng/mL d'IL-10. (A) Des western blots ont été réalisés avec un anti-phospho-STAT3 et un anti-STAT3. (B) Les intensités de phospho-STAT3 ont été quantifiées et normalisées avec celles de STAT3. Trois expériences indépendantes ont été effectuées. Les résultats sont présentés sous forme graphique (moyenne ± SD). Les données ont été analysées par un test de Student (\* $p < 0.05$ ).

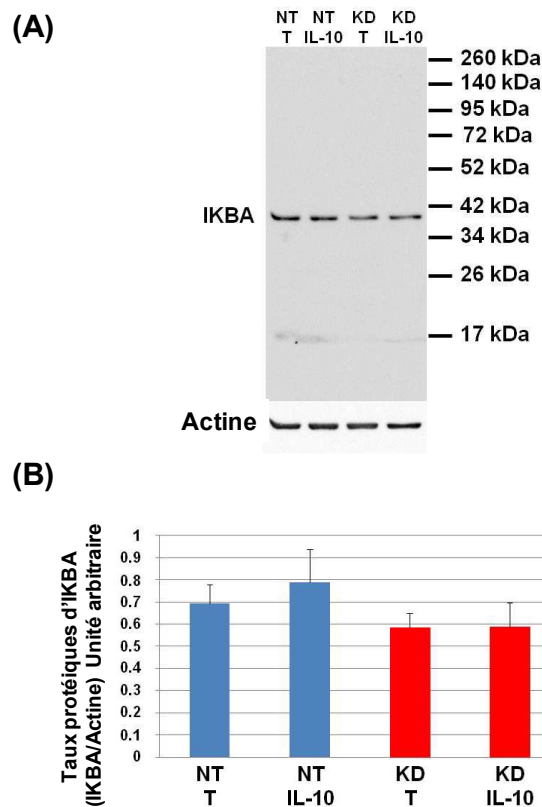
L'intensité des bandes détectées a été mesurée et normalisée avec celle obtenue pour les protéines STAT3 totales (**Figure 20B**). Ceci révèle que le taux de phosphorylation de STAT3 est beaucoup plus bas dans les cellules PC1/3 KD que dans les cellules NT et ce, qu'il y ait eu stimulation par l'IL-10 ou non. La voie anti-inflammatoire STAT3 est donc réprimée en absence de PC1/3. Elle ne pourrait donc



pas exercer son rétrocontrôle négatif sur la réponse pro-inflammatoire. C'est ce que nous avons ensuite cherché à déterminer.

C- En absence de PC1/3, la voie pro-inflammatoire n'est pas impactée par un traitement avec de l'IL-10.

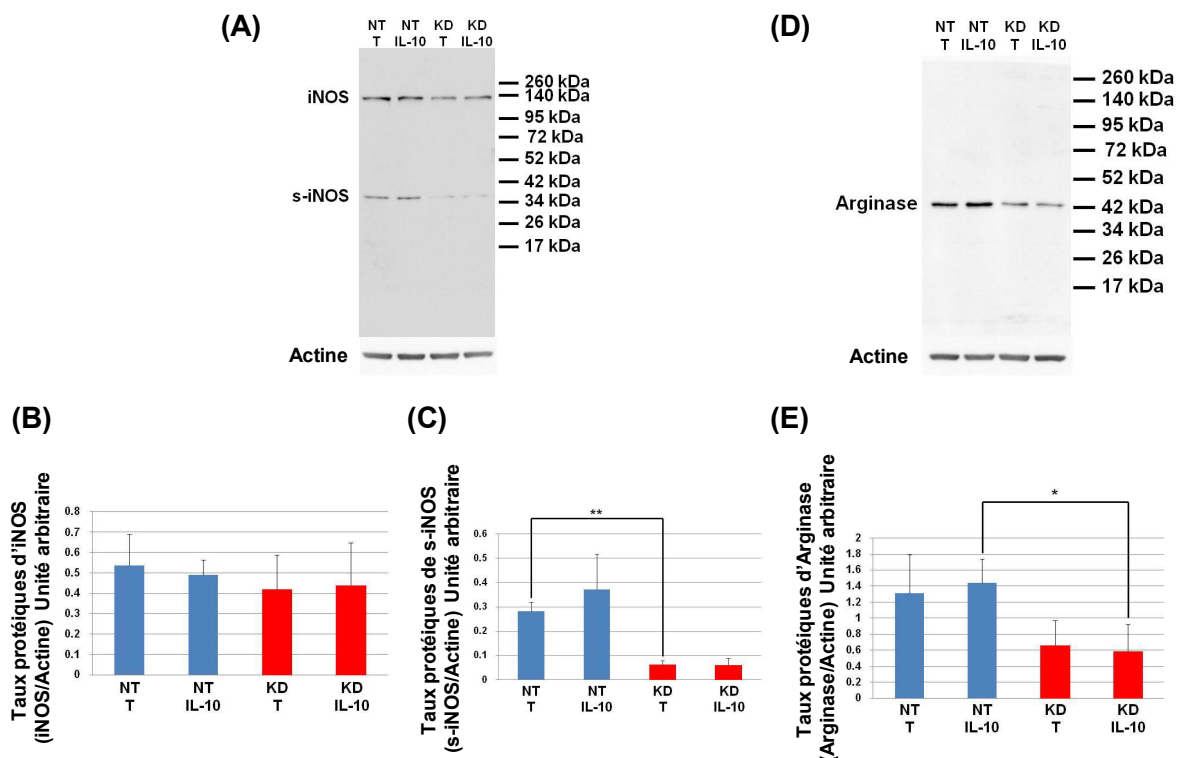
Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'état d'activation de la voie pro-inflammatoire NF $\kappa$ B suite à un traitement avec de l'IL-10 [86]. Pour ce faire, les macrophages NT et PC1/3 KD ont été stimulés ou non pendant 24 h par 20 ng/mL d'IL-10 et nous avons évalué le niveau de dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  (**Figure 10B**). Un western blot a donc été réalisé à l'aide d'un anticorps dirigé contre les protéines I $\kappa$ B $\alpha$  totales (**Figure 21**).



**Figure 21 : Etude de la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  après un traitement à l'IL-10.** Les cellules NT et PC1/3 KD ont été traitées ou non pendant 24 h avec 20 ng/mL d'IL-10. **(A)** Des western blots ont été réalisés avec un anti-I $\kappa$ B $\alpha$ . **(B)** Les intensités d'I $\kappa$ B $\alpha$  ont été quantifiées et normalisées avec celles de l'actine. Trois expériences indépendantes ont été effectuées. Les résultats sont présentés sous forme graphique (moyenne  $\pm$  SD). Les données ont été analysées par un test de Student. Aucune différence significative n'a été observée.

L'intensité des bandes détectées a été mesurée et normalisée avec celle obtenue pour l'actine. Ainsi, la comparaison avec les cellules NT montre que le taux d'iKBA tend à être plus bas dans les cellules PC1/3 KD. Cette tendance est d'ailleurs plus marquée suite au traitement avec de l'IL-10. Ceci démontre qu'en absence de PC1/3, la voie pro-inflammatoire NFκB n'est pas impactée par une stimulation avec cette cytokine anti-inflammatoire.

Pour affiner notre étude, nous avons ensuite estimé par Western blot, les niveaux protéiques de l'arginase et de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) (**Figure 22**) [86]. Nous avons porté notre attention sur ces deux enzymes car elles régulent la production d'oxyde nitrique (NO) qui est un facteur indicatif d'une réaction inflammatoire [94]. Ces deux enzymes entrent en compétition pour leur substrat commun qui est la L-arginine. Alors qu'iNOS l'utilise pour produire du NO, l'arginase s'en sert pour former de l'urée.



**Figure 22 : Après un traitement à l'IL-10, les macrophages PC1/3 KD présentent des taux plus faibles d'Arginase.** Les cellules NT et PC1/3 KD ont été traitées ou non pendant 24 h avec 20 ng/mL d'IL-10. **(A)** Des western blots ont été réalisés avec un anti-iNOS. **(B)** Les intensités d'iNOS ont été quantifiées et normalisées avec celles de l'actine. **(C)** Les intensités de s-iNOS ont été quantifiées et normalisées avec celles de l'actine. **(D)** Des western blots ont été réalisés avec un anti- Arginase. **(E)** Les intensités d'Arginase ont été quantifiées et normalisées avec celles de l'actine. Trois expériences indépendantes ont été effectuées. Les résultats sont présentés sous forme graphique (moyenne ± SD). Les données ont été analysées par un test de Student (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

Les expériences réalisées révèlent que le niveau d'iNOS est le même dans les cellules NT et PC1/3 KD et ce, qu'il y ait eu stimulation ou non par de l'IL-10 (**Figures 22A et B**). Par contre, de façon surprenante, ce western blot met en évidence l'existence d'une forme tronquée d'iNOS de 38 kDa que nous avons nommée s-iNOS (**Figures 22A et C**). De façon intéressante, le taux de s-iNOS tend clairement à être plus bas dans les cellules PC1/3 KD traitées ou non par de l'IL-10. Il serait intéressant de déterminer si s-iNOS rentre en compétition avec iNOS pour la L-arginine afin de réguler la production de NO. En effet, le taux moins élevé de s-iNOS dans les macrophages PC1/3 KD pourrait réduire le niveau d'inhibition qu'elle pourrait exercer sur la production de NO. Ceci pourrait donc aussi contribuer à conférer à ces cellules leur phénotype pro-inflammatoire. Concernant l'arginase, son niveau est également nettement plus bas dans les cellules PC1/3 KD et en particulier suite au traitement par de l'IL-10 (**Figures 22 D et E**). Ceci va également dans le sens d'une production de NO plus importante par les macrophages PC1/3 KD.

L'ensemble de ces résultats renforce l'hypothèse que les cellules PC1/3 KD résistent à l'effet inhibiteur de l'IL-10. Ceci a pu être définitivement confirmé par l'étude protéomique que nous avons réalisée [86]. En effet, celle-ci montre que les cellules PC1/3 KD traitées par de l'IL-10 continuent de produire des facteurs pro-inflammatoires alors que les cellules NT sont orientées vers un phénotype pro-tumoral.

### II.3.10- Discussion.

L'ensemble de ces résultats révèle que PC1/3 est un inhibiteur de la réponse immunitaire. Ceci est similaire à ce qui avait été observé pour les souris PC1/3 KO [59]. Ainsi, les macrophages pour lesquels PC1/3 a été inhibée présentent un phénotype pro-inflammatoire marqué. Celui-ci est caractérisé par la présence de longues protrusions membranaires (**Figure 4**) et la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (**Figure 6**). Rappelons que ce phénotype est observé même en l'absence de toute stimulation. Ceci pourrait être expliqué par l'action autocrine et paracrine des alarmines qui sont spontanément sécrétées par les cellules PC1/3 KD. En effet, certaines d'entre elles pourraient se lier au TLR4 afin d'initier une réponse immunitaire [68]. Par ailleurs, nous avons pu démontrer que le

phénotype pro-inflammatoire des macrophages PC1/3 KD est accentué par une stimulation avec du LPS. Ceci est lié à la régulation qu'exerce PC1/3 sur la voie de signalisation associée au TLR4 et en particulier sur la voie dépendante de MYD88 (**Figure 10B**). En effet, suite à un traitement au LPS, les macrophages PC1/3 KD présentent une activation plus longue de la voie NFκB (**Figure 12C**). Plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer ce résultat. Tout d'abord, il est possible que la désensibilisation du TLR4 puisse être altérée dans les cellules PC1/3 KD. De façon intéressante, il a été montré qu'à la surface des cellules endothéliales aortiques humaines, l'ectodomaine du TLR4 est clivé afin de réduire l'activité du récepteur [95]. Ce clivage est réalisé par la métalloprotéase ADAM17 qui est un substrat connu de PC1/3 [96]. Ainsi, dans les cellules PC1/3 KD, le domaine extracellulaire du TLR4 pourrait être clivé avec une fréquence réduite. Cependant, nos résultats permettent d'exclure cette hypothèse. En effet, suite à une heure de stimulation par du LPS, une diminution forte de l'expression du TLR4 à la surface cellulaire est observée et ce, aussi bien pour les cellules NT que PC1/3 KD (**Figure 14**). Ceci révèle également qu'il n'y a pas eu de défaut d'internalisation du récepteur dans les macrophages PC1/3 KD. Cette conclusion est pleinement soutenue par nos données qui démontrent que la quantité relative d'IRF-3 qui transloque dans le noyau est identique entre les cellules NT et PC1/3 KD (**Figure 12D**). En revanche, nos expériences établissent que l'activation plus longue de la voie NFκB observée dans les cellules PC1/3 KD repose sur la réexpression plus rapide du TLR4 à la surface cellulaire (**Figure 14**). Celle-ci s'explique par une altération du trafic intracellulaire du récepteur (**Figure 15**) tout comme nous l'avons déjà observée pour un autre TLR, le TLR9 [97]. La possibilité que PC1/3 régule le trafic du TLR4 est confortée par des résultats précédents du laboratoire. En effet, ceux-ci montrent que PC1/3 et le TLR4 cheminent ensemble au sein des macrophages NR8383 traités par du LPS [60]. En outre, ces travaux ont également mis en évidence que PC1/3 est principalement localisée dans le TGN de ces cellules [60]. Nos résultats suggèrent donc que PC1/3 restreint la translocation du TLR4 depuis l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique. Une telle inhibition serait donc levée dans les macrophages PC1/3 KD (**Figures 14 et 15**). Cependant, nous ne pouvons pas non plus exclure que les récepteurs réexprimés à la surface cellulaire proviennent des ERC. Ils y auraient été adressés suite à leur internalisation ou leur maturation dans l'appareil de Golgi [83,89]. Ceci est cohérent avec la détection du TLR4 sous forme d'agrégats à

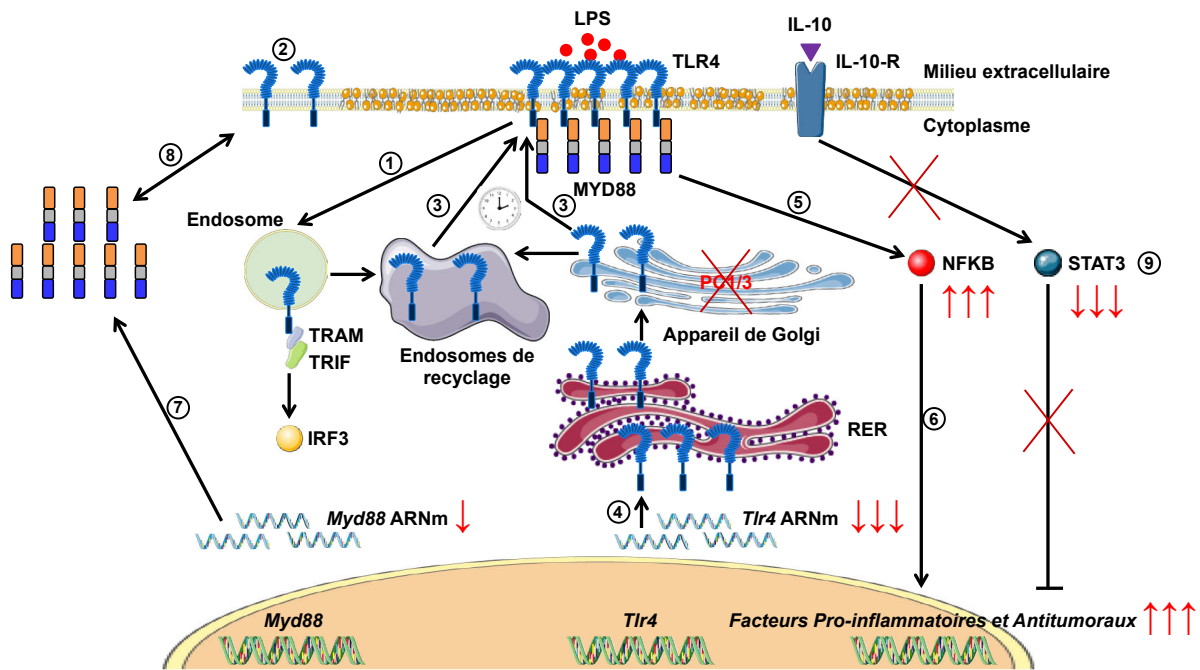
l'intérieur des cellules NT et PC1/3 KD à l'état basal et à leur dispersion au cours de la stimulation par du LPS (**Figure 15**). Néanmoins, rappelons que dans le cas des cellules NT, cette dispersion survient après 3 h et 6 h de traitement au LPS alors que pour les cellules PC1/3 KD, elle est observée dès une heure de stimulation. Ceci suggère une accélération du processus de recyclage dans les macrophages PC1/3 KD. Cela expliquerait pourquoi le TLR4 est à nouveau détecté à la surface de ces cellules après une heure de traitement au LPS (**Figure 14**). Cette accélération du recyclage du TLR4 pourrait résulter du remodelage du compartiment endosomal que présentent les macrophages PC1/3 KD. Ceci pourrait être mis en corrélation avec la sur-expression de Rab11 que nous avons observée dans les macrophages péritonéaux isolés de souris PC1/3 KO. En effet, celle-ci contrôle la localisation du TLR4 dans les ERC [83] et le recyclage des protéines à la surface cellulaire [98,99]. De façon intéressante, des sites potentiels de clivage pour les proprotéines convertases sont trouvés dans le domaine N-terminal du canal calcique TRPM7 ainsi que dans une boucle intracellulaire et l'extrémité C-terminale du transporteur du cholestérol ABCA1. Il a été montré que TRPM7 interviendrait dans le contrôle du recyclage du TLR4 [100]. ABCA1, quant à lui, est impliqué dans l'inhibition de l'expression du TLR4 à la surface cellulaire [101]. Il est donc tentant de spéculer que PC1/3 pourrait réguler le trafic et le recyclage du TLR4 via le clivage d'ABCA1 et de TRPM7. Cependant, ceci reste très incertain puisque le domaine N-terminal de TRPM7 ainsi que la boucle intracellulaire et l'extrémité C-terminale d'ABCA1 sont exposés du côté cytosolique. Ils ne seraient donc pas accessibles pour PC1/3. Une autre hypothèse qui peut être considérée est que cette modification du trafic intracellulaire du TLR4 pourrait être liée à la désorganisation du cytosquelette et à la dérégulation de l'homéostasie calcique observées en absence de PC1/3. En effet, le cytosquelette régule la machinerie du trafic intracellulaire par la mobilisation des microtubules et du calcium [84,85]. De façon intéressante, une analyse bioinformatique révèle la présence d'un site potentiel de clivage pour les proprotéines convertases dans l'extrémité N-terminale du canal calcique ORAI1. Notons que l'expression du gène codant ORAI1 est sous la dépendance de NF $\kappa$ B [102]. Ainsi, il est à nouveau tentant de spéculer qu'en absence de PC1/3, ORAI1 ne serait pas clivé et que son expression pourrait être plus importante. En effet, ceci pourrait en partie expliquer l'augmentation de l'influx calcique observée. Il en résulterait un réarrangement du cytosquelette et ainsi le trafic accru du TLR4.

Cependant, comme précédemment, cette hypothèse est à prendre avec précaution puisque l'extrémité N-terminale d'ORAI1 est localisée du côté cytoplasmique. Elle pourrait donc ne pas être accessible pour PC1/3. Les modalités avec lesquelles PC1/3 régule le trafic et/ou le recyclage du TLR4 restent donc à être déterminées.

Durant cette étude, nous avons également observé qu'après 6 h de traitement avec du LPS, le TLR4 est à nouveau internalisé dans les cellules PC1/3 KD alors qu'il est réexprimé à la surface des cellules NT (**Figure 14**). De ce fait, à ce temps de stimulation, nous aurions pu nous attendre à une activation plus forte de la voie NF $\kappa$ B dans les cellules NT. Cependant, nos résultats montrent qu'elle est identique entre les cellules NT et PC1/3 KD (**Figure 12C**). Rappelons qu'à 6 h de traitement par du LPS, le taux protéique de MYD88 est plus élevé dans les macrophages PC1/3 KD (**Figure 18B**). Cette augmentation du taux protéique de MYD88 pourrait compenser la perte du TLR4 à la surface de ces cellules et maintenir ainsi le niveau d'activation de la voie NF $\kappa$ B. En revanche, le mécanisme par lequel PC1/3 régule le taux protéique de MYD88 reste à être élucidé.

Par ailleurs, nous avons pu démontrer qu'en absence de PC1/3, la voie pro-inflammatoire n'est pas impactée par un traitement avec une cytokine anti-inflammatoire telle que l'IL-10 (**Figures 21 et 22**). Nos résultats montrent que ceci est lié à une répression de la voie anti-inflammatoire STAT3 dans les macrophages PC1/3 KD (**Figure 20**). Cependant, les raisons expliquant cette répression de la voie STAT3 ne sont pas connues à ce jour. Il serait donc intéressant d'étudier le niveau d'expression de l'IL10-R à la surface cellulaire et l'état d'activation du reste de la voie de signalisation.

Ainsi, l'ensemble de nos résultats montre que PC1/3 régule la réponse immunitaire en contrôlant le trafic intracellulaire et/ou le recyclage du TLR4, la voie de signalisation qui lui est associée ainsi que la voie anti-inflammatoire STAT3. Néanmoins, afin d'élucider les mécanismes mis en jeu, il est maintenant crucial d'identifier les substrats de PC1/3. Nous proposons un modèle récapitulant les principaux changements que présentent les macrophages PC1/3 KD dans la **Figure 23**.



**Figure 23 : Représentation schématique décrivant comment l'inactivation de PC1/3 dans les macrophages impacte la biologie du TLR4.** Les gouttes jaunes dans la membrane plasmique symbolisent que les cellules PC1/3 KD présentent une modification de leur contenu lipidique comme nous avons pu le déterminer avec une analyse SpiderMass. (1) Après une stimulation par du LPS, le TLR4 est internalisé dans les endosomes pour initier la voie de signalisation indépendante de MyD88. Celle-ci conduit à l'activation d'IRF-3. (2) Du fait de cette internalisation, la quantité de TLR4 à la surface cellulaire décroît. (3) En absence de PC1/3, le TLR4 est plus rapidement réexprimé au niveau de la membrane plasmique. Ceci est symbolisé avec le pictogramme représentant une montre et survient après un traitement de 3h au LPS. Les récepteurs nouvellement adressés à la surface cellulaire pourraient provenir d'un stock constitué dans les endosomes de recyclage ou de l'appareil de Golgi suite à leur synthèse *de novo* et leur maturation. (4) Le TLR4 pourrait être synthétisé à partir d'un pool de messagers préexistants. Ceci pourrait favoriser la réexpression du récepteur à la surface cellulaire ou la reconstitution du stock de TLR4 dans les endosomes de recyclage si celui-ci a été mobilisé. (5) La réexpression du TLR4 à la membrane plasmique après 3h de traitement au LPS conduit à une activation plus forte de la voie pro-inflammatoire NFKB. La voie anti-inflammatoire STAT-3 est, quant à elle, réprimée. (6) Il en résulte une sécrétion plus importante de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs anti-tumoraux. Le traitement des macrophages PC1/3 KD avec du LPS pendant 6h conduit à une nouvelle internalisation du TLR4. Le taux de récepteurs à la surface cellulaire diminue par conséquent (2). (7) Dans ces macrophages, MYD88 est synthétisé à partir d'un pool préexistant d'ARNms. (8) L'augmentation du taux protéique de MYD88 observée pourrait compenser la diminution du nombre de TLR4 présents à la surface cellulaire. Ceci permettrait de maintenir le niveau d'activation de la voie de signalisation. (9) Les macrophages PC1/3 KD résistent à l'effet anti-inflammatoire de l'IL-10 et continuent de présenter une réponse pro-inflammatoire.

## **II.4- PC1/3 régule le trafic intracellulaire du TLR9 et ainsi l'activation de la voie pro-inflammatoire NFKB.**

Nous avons pu démontrer que PC1/3 régule la biologie du TLR4 [61,70,86,93]. Dans les macrophages, PC1/3 est principalement localisée dans le TGN [60]. Néanmoins, sa présence dans le RE, les endosomes tardifs et les phagolysosomes a également été observée [60]. En son absence, le compartiment endosomal est remodelé dans ces cellules [61]. Rappelons également que pour être pleinement active, cette enzyme nécessite un pH acide. Nous avons donc émis l'hypothèse que PC1/3 pourrait aussi contrôler la fonction du TLR9. En effet, ce récepteur est endosomal [103] et il nécessite également un pH acide pour être activé [104].

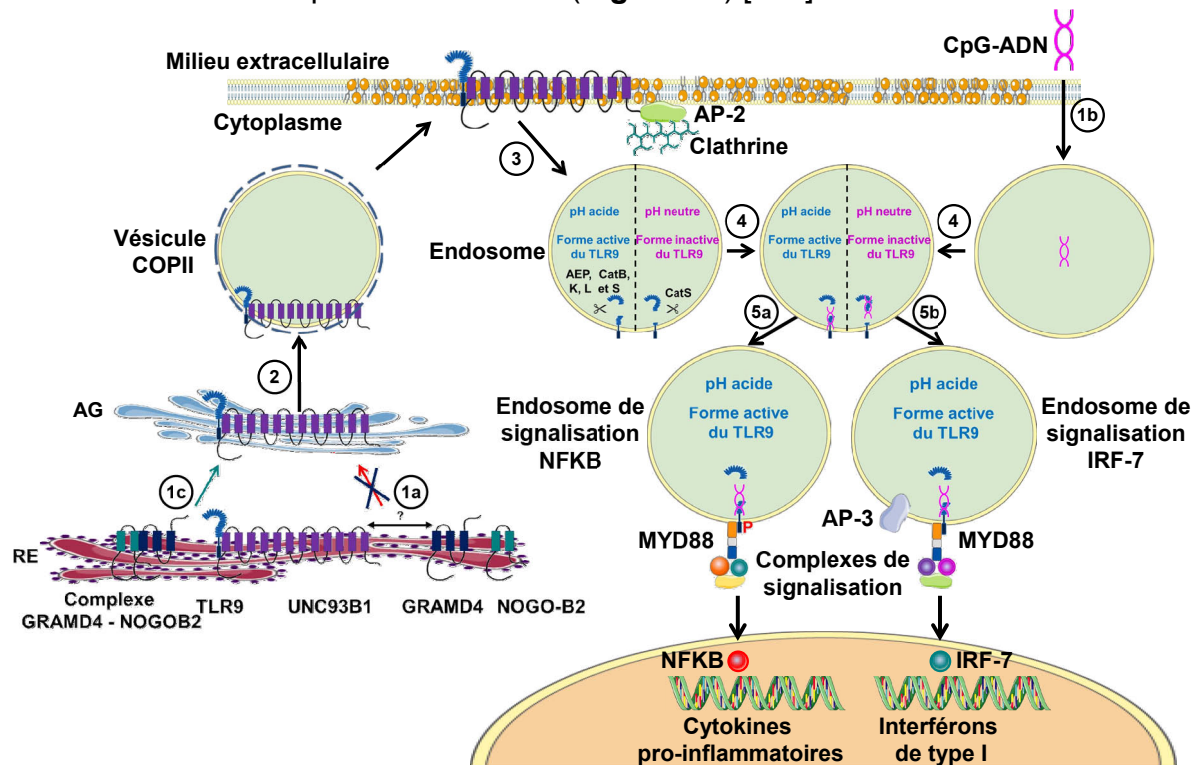
### II.4.1- Rappels sur le trafic intracellulaire du TLR9 et la voie de signalisation qui lui est associée.

Le TLR9 est impliqué dans la reconnaissance d'ADN doubles brins riches en motifs CpG (Cytosine phosphodiester Guanine) non méthylés d'origine bactérienne ou virale [103,105]. Il est exprimé dans de nombreux types cellulaires tels que les cellules dendritiques plasmacytoïdes, les astrocytes, les cellules microgliales et les macrophages. Son implication dans de nombreuses pathologies telles que les maladies autoimmunes [106–108], la malaria cérébrale expérimentale [109], les méningites liées à des infections bactériennes [110,111], les tumeurs cérébrales [112,113] ou encore la maladie d'Alzheimer [114] a fait de ce récepteur une cible thérapeutique de choix. Un agoniste synthétique du TLR9, le CpG-ODN, est ainsi à différents stades précliniques et cliniques d'évaluation comme agent anti-tumoral, antiviral, antibactérien ou encore comme adjuvant de vaccins thérapeutiques.

Les travaux réalisés sur les macrophages et les cellules dendritiques montrent que la reconnaissance de CpG-ODN par le TLR9 nécessite des changements dans la dynamique et le trafic membranaires [115]. Il en résulte une compartimentalisation spatio-temporelle stricte du TLR9 et de son ligand. Celle-ci est cruciale pour discriminer l'ADN du soi de celui du non soi et éviter ainsi les réactions auto-immunes [116]. Ainsi, le TLR9 est synthétisé au niveau du RE, compartiment



subcellulaire où il réside tant que les cellules ne sont pas infectées par une bactérie, un virus ou stimulées par du CpG-ODN (**Figure 24**) [117].



**Figure 24 : Trafic intracellulaire du TLR9.** Le TLR9 est synthétisé dans le RE, compartiment subcellulaire où il réside tant que les cellules ne sont pas stimulées par son ligand, le CpG-ADN. **1a)** En effet, GRAMD4 retient le TLR9 dans le RE et empêche ainsi son trafic vers les endosomes. **1b)** Suite à l'internalisation de CpG-ADN, **1c)** NOGO-B2 interagit avec GRAMD4 pour lever cette inhibition. Le TLR9 rentre alors en interaction avec UNC93B1 et chemine vers l'appareil de Golgi. **2)** Dans celui-ci, UNC93B1 régule l'adressage du TLR9 vers des vésicules COPII pour qu'il soit délivré à la surface cellulaire. **3)** A ce niveau, UNC93B1 recrute AP-2, ce qui permet l'assemblage d'un manteau de clathrine et ainsi l'endocytose du TLR9 dans les endosomes précoces. Dans ce compartiment, le TLR9 est clivé. Si le pH de l'endosome s'acidifie, l'extrémité N-terminale du récepteur est clivée par l'asparagine endopeptidase (AEP) et les cathepsines B, K, L et S. Ceci génère la forme active du TLR9 puisqu'elle peut lier le CpG-ADN et recruter les adaptateurs du complexe de signalisation. En revanche, dans les endosomes présentant un pH neutre, le récepteur est clivé au niveau de sa partie C-terminale par la cathepsine S. Ceci génère la forme inactive du TLR9 puisqu'elle ne possède plus le domaine TIR qui est indispensable pour recruter les adaptateurs de la voie de signalisation. **4)** Le TLR9 lie alors son ligand qui a été internalisé par endocytose. A la suite de cette étape, seule la forme active du TLR9 est représentée sur la figure. En effet, elle seule peut initier les voies de signalisation qui lui sont associées. **5a)** Si le TLR9 est phosphorylé au niveau de sa queue cytoplasmique (symbolisé par « P » sur la figure), il est adressé vers les endosomes de signalisation NFKB. Il en résulte la production de cytokines pro-inflammatoires. En revanche, **5b)** si AP-3 est recrutée alors le TLR9 est acheminé vers les endosomes de signalisation IRF-7 conduisant ainsi à la production d'interférons de type I.

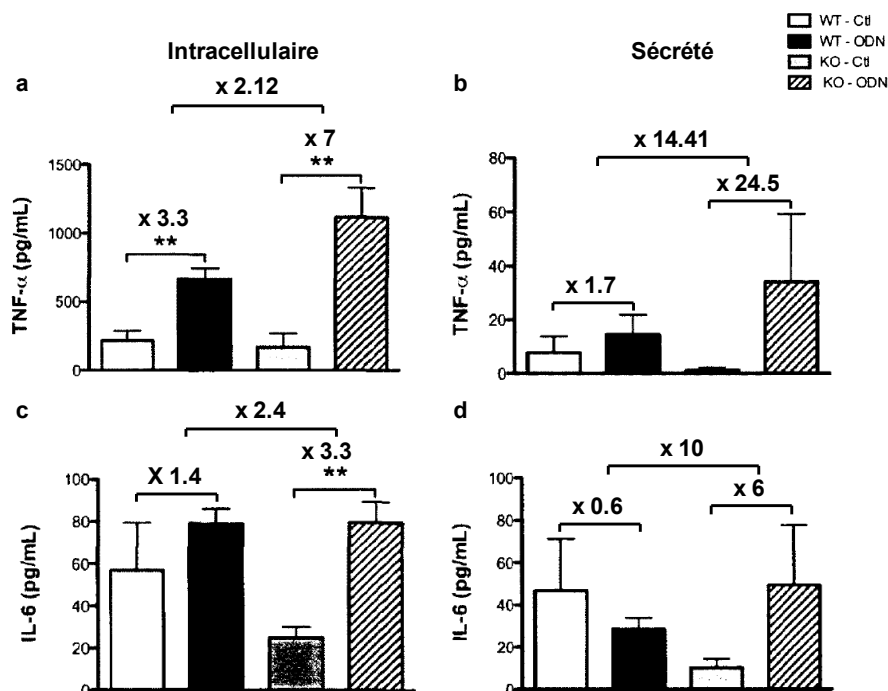
En effet, GRAMD4 (glucosyltransferases, Rab-like GTPase activators and myotubularins (GRAM) domain containing 4) retient le TLR9 dans le RE et empêche ainsi son trafic vers les endosomes [118]. Suite à l'internalisation de CpG-ADN ou de CpG-ODN, l'isoforme B2 de la protéine réticulon-4 (NOGO-B2) interagit avec GRAMD4 pour lever cette inhibition [118]. La sortie du TLR9 du RE fait alors intervenir différentes protéines telles que PRAT4 [119], Gp96 [120], ARF3 [121], HMGB1 [122], CD82 [123] et surtout UNC93B1 [124,125]. En effet, UNC93B1 est la protéine principale qui régule le trafic du TLR9. Après stimulation avec du CpG-ODN, elle interagit avec le récepteur afin de permettre son trafic vers l'appareil de Golgi [126]. Dans celui-ci, UNC93B1 régule alors l'adressage du TLR9 vers des vésicules présentant un manteau de protéines COPII pour qu'il soit délivré à la surface cellulaire [127]. Au niveau de la membrane plasmique, UNC93B1 recrute la protéine adaptatrice AP-2 [127]. Ceci permet l'assemblage d'un manteau de clathrine et ainsi l'endocytose du TLR9 qui se retrouve alors dans les endosomes précoces [116,117]. UNC93B1 joue également un rôle actif et crucial pour assurer que le TLR9 soit uniquement acheminé vers les endosomes [128]. Dans ces organelles, le TLR9 subit des clivages protéolytiques différents afin de générer soit sa forme active, soit sa forme inactive [104]. Lorsque le pH de l'endosome s'acidifie, l'extrémité N-terminale du récepteur est clivée. Ceci conduit à la genèse d'un fragment C-terminal de 64 kDa qui est considéré comme la forme active du TLR9. En effet, ce fragment peut lier le CpG-ODN et il possède le domaine TIR qui est indispensable pour recruter les adaptateurs nécessaires à l'initiation de la voie de signalisation associée. En revanche, dans les endosomes présentant un pH neutre, le clivage protéolytique survient au niveau de la partie C-terminale du récepteur. Le fragment N-terminal de 81,4 kDa ainsi généré correspond à la forme inactive du TLR9. En effet, bien qu'il soit capable de lier son ligand, ce fragment ne possède plus le domaine TIR. Après son internalisation dans les endosomes, le TLR9 lie son ligand qui aura été internalisé par endocytose. Il pourra alors être acheminé vers deux types d'endosomes tardifs qui sont distingués par la nature de la voie de signalisation qui sera initiée suite à l'activation du récepteur [129]. Dans un premier type d'endosomes, le TLR9 recrute IRF-7 afin de conduire à la production d'interférons de type I. Dans l'autre type d'endosomes, c'est la voie NF $\kappa$ B qui est activée permettant ainsi la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. L'adressage du TLR9 vers les endosomes à partir desquels la signalisation s'effectue via IRF-7 dépend de la

protéine adaptatrice 3 (AP-3) [129]. En revanche, son acheminement vers les endosomes tardifs au niveau desquels la voie NFKB est recrutée dépendrait de la phosphorylation de sa queue cytoplasmique [130,131].

Afin de déterminer si PC1/3 pourrait réguler la biologie du TLR9, nous avons mesuré les quantités de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 produites et sécrétées par les macrophages de souris PC1/3 KO isolés à partir du péritoine.

#### II.4.2- Les macrophages péritonéaux isolés de souris PC1/3 KO synthétisent et sécrètent des quantités plus importantes de TNF- $\alpha$ et d'IL-6.

Les macrophages péritonéaux de souris de type sauvage (WT) et PC1/3 KO ont été stimulés pendant 4 h avec 1  $\mu$ M de CpG-ODN 2006 [97]. Les quantités de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 qu'ils synthétisent et sécrètent ont alors été mesurées par ELISA (**Figure 25**).



**Figure 25 : Après un traitement au CpG-ODN, les macrophages péritonéaux isolés de souris PC1/3 KO synthétisent et sécrètent des quantités plus importantes de TNF- $\alpha$  (a et b) et d'IL-6 (c et d).** Les macrophages péritonéaux ont été stimulés pendant 4 h avec 1  $\mu$ M de CpG-ODN 2006 et les concentrations de TNF $\alpha$  ou d'IL-6 ont été mesurées par ELISA. Les résultats sont présentés sous forme graphique (moyenne  $\pm$  SD). Les données ont été analysées par un test de Student (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01). n=4.

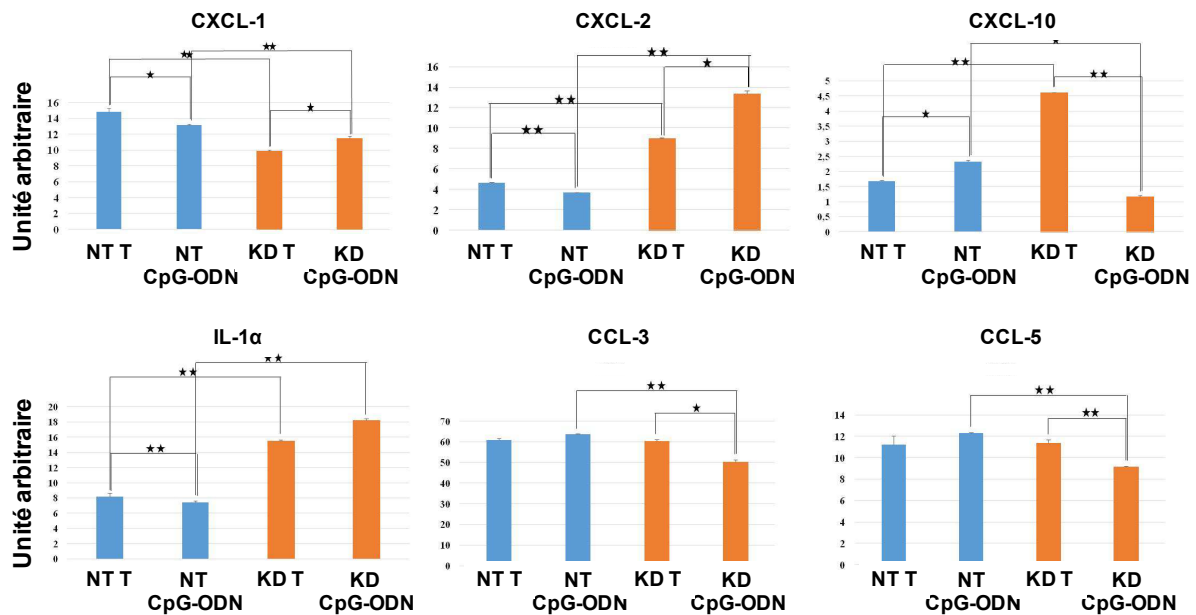
Cette analyse montre que les macrophages WT et PC1/3 KO traités par du CpG-ODN produisent et sécrètent des quantités plus importantes de TNF- $\alpha$  (**Figures 25a et b**). Les « fold changes » entre la condition CpG-ODN et la condition sans stimulation ont ensuite été calculés. Ceci révèle que les macrophages PC1/3 KO synthétisent 2,12 x et libèrent 14,41 x plus de TNF- $\alpha$  que les macrophages WT. Des résultats similaires ont été obtenus pour l'IL-6. En effet, le calcul des « fold changes » montre que les cellules PC1/3 KO produisent 2,5 x et relarguent 10 x plus d'IL-6 que les cellules WT (**Figures 25c et d**).

Ces résultats indiquent que PC1/3 exerce un effet inhibiteur sur la production et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages stimulés par du CpG-ODN. Ils suggèrent également que PC1/3 régule la voie de signalisation associée au TLR9. Afin de comprendre au niveau moléculaire comment PC1/3 contrôle la biologie du TLR9, nous avons à nouveau utilisé la lignée de macrophages alvéolaires de rat NR8383. Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier que les macrophages PC1/3 KD sécrètent aussi plus de cytokines pro-inflammatoires que les macrophages NT suite à un traitement au CpG-ODN.

#### II.4.3- Suite à un traitement au CpG-ODN, les macrophages PC1/3 KD seraient orientés vers un phénotype pro-inflammatoire plus marqué.

Les cellules NT et PC1/3 KD ont été stimulées ou non pendant 24 h avec 1  $\mu$ M de CpG-ODN 2006 et les sécrétomes ont été collectés [97]. Ceux-ci ont alors été analysés à l'aide d'une puce à cytokines (**Figure 26**). Cette expérience révèle qu'en comparaison des cellules NT, les macrophages PC1/3 KD stimulés ou non libèrent des taux plus faibles de CXCL1. En outre, suite au traitement avec du CpG-ODN, les quantités de CCL3 et CCL5 relarguées par les cellules PC1/3 KD diminuent alors qu'elles restent inchangées pour les cellules NT. En revanche, sous CpG-ODN, les cellules PC1/3 KD sécrètent plus de CXCL2 et d'IL-1 $\alpha$  que les cellules NT. Par ailleurs, les macrophages PC1/3 KD sécrètent spontanément plus de CXCL10. Néanmoins, après stimulation par du CpG-ODN, la quantité de CXCL10 qu'ils libèrent décroît très fortement alors qu'elle augmente légèrement pour les cellules NT. Cette faible augmentation de CXCL10 dans les cellules NT est cohérente avec l'utilisation de CpG-ODN 2006. En effet, celui-ci est un CpG-ODN de type B qui

active préférentiellement la voie pro-inflammatoire. Or, il est connu que la libération de CXCL10 est induite par l'IFN- $\gamma$ . La forte diminution de CXCL10 dans les cellules PC1/3 KD suggère également qu'en absence de PC1/3, la voie pro-inflammatoire NFkB serait préférée. Ceci serait similaire à ce que nous avons observé pour le TLR4. Pour tester cette hypothèse, nous nous sommes intéressés à son état d'activation suite à un traitement avec du CpG-ODN.

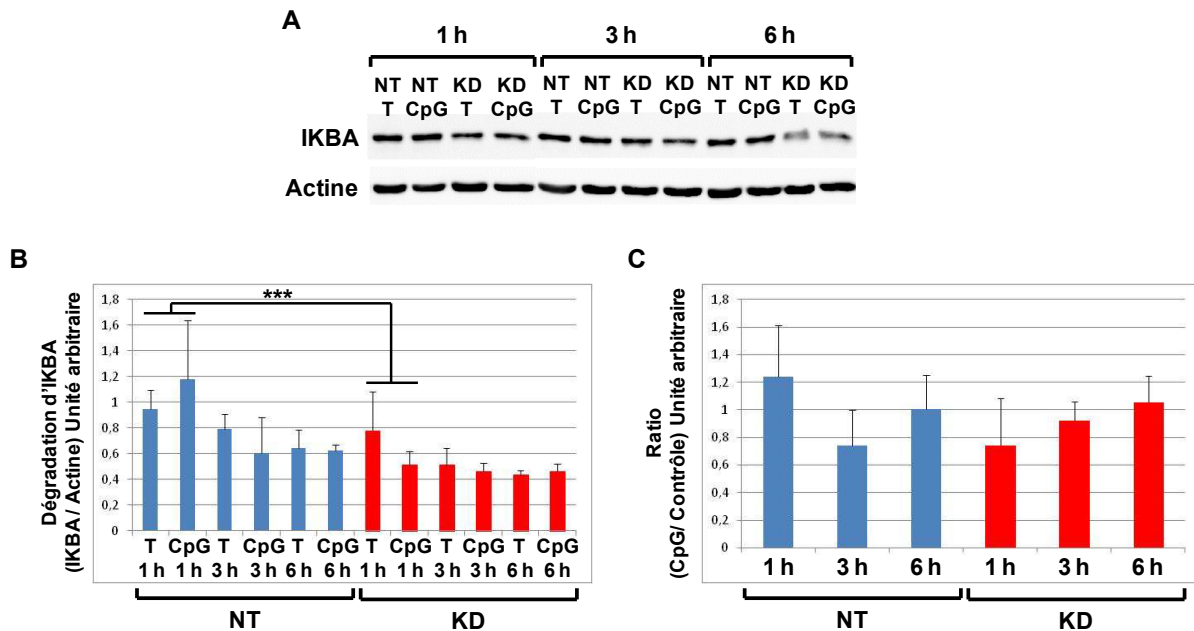


**Figure 26 : Profils de sécrétion cytokinique et chimiokinique des macrophages NT et PC1/3 KD après un traitement au CpG-ODN.** Les cellules ont été traitées ou non pendant 24 h avec 1 $\mu$ M de CpG-ODN puis les sécrétomes ont été collectés et analysés à l'aide d'une puce à cytokines. Les résultats obtenus avec les sécrétomes des cellules NT sont présentés en bleu et ceux obtenus avec les sécrétomes des cellules PC1/3 KD sont présentés en orange. Les diagrammes ont été obtenus en réalisant le ratio entre la densité moyenne de pixels des spots expérimentaux et celle des spots de référence. Pour estimer la significativité des résultats, un test de Student a été réalisé (\*p < 0.05, \*\* P≤0.01).

#### II.4.4- Suite à un traitement au CpG-ODN, l'activation de la voie NFkB survient plus rapidement dans les macrophages PC1/3 KD.

Les macrophages NT et PC1/3 KD ont été stimulés ou non pendant 1 h, 3 h et 6 h avec 1  $\mu$ M de CpG-ODN 2006 et nous avons évalué le niveau de dégradation d'IKBA [97]. Pour ce faire, des western blots ont été réalisés à l'aide d'un anticorps dirigé contre les protéines IKBA totales (**Figure 27**). L'intensité des bandes détectées a été

mesurée et normalisée avec celle obtenue pour l'actine. Ces résultats ont alors été analysés par un test ANOVA à trois voies suivi d'un test Holm-Sidak. Ainsi, la comparaison avec les cellules NT montre qu'à 1 h, le taux d'IKBA est significativement plus bas dans les cellules PC1/3 KD ( $p < 0.001$ ) (**Figure 27B**).



**Figure 27 : Etude de la dégradation d'IKBA au cours du temps après un traitement au CpG-ODN.** Les cellules NT et PC1/3 KD ont été traitées ou non pendant 1, 3 et 6 h avec 1  $\mu$ M de CpG-ODN 2006. **A)** Des western blots ont été réalisés avec un anti-**IKBA**. **B)** Les intensités d'IKBA ont été quantifiées et normalisées avec celles de l'actine. Les résultats sont présentés sous forme graphique (moyenne  $\pm$  SD). **C)** Le ratio entre les échantillons stimulés au CpG-ODN et ceux non stimulés a ensuite été réalisé. Trois expériences indépendantes ont été effectuées. Les données ont été analysées par un test ANOVA à 3 (**B**) ou 2 (**C**) voies suivi par un test posthoc Holm-Sidak (\*\* $p < 0.001$ ).

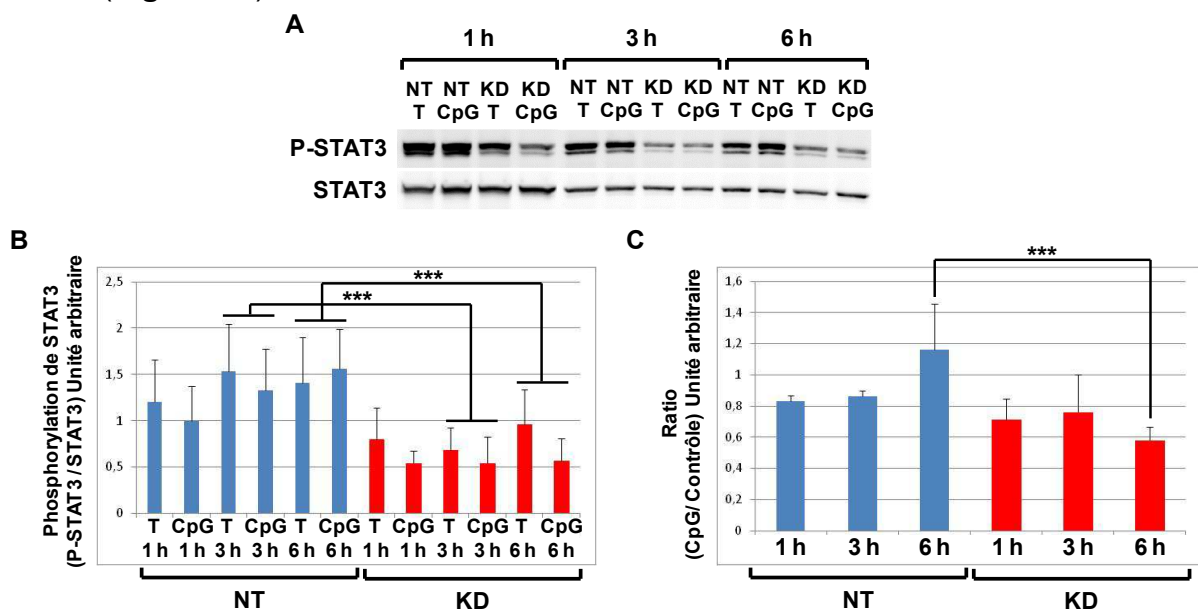
Les « fold changes » entre les conditions CpG-ODN et les conditions sans stimulation ont ensuite été calculés (**Figure 27C**). Ceci permet d'étudier la dynamique de synthèse et de dégradation d'IKBA. Les résultats obtenus ont alors été analysés par un test ANOVA à deux voies suivi d'un test Holm-Sidak. Ceux-ci se sont révélés non significatifs. Néanmoins, à 1 h, le taux d'IKBA tend à être plus bas dans les cellules PC1/3 KD. Ceci indique qu'IKBA est plus fortement et rapidement dégradé suite à une stimulation par du CpG-ODN. La voie NFKB est donc plus fortement activée dans les macrophages PC1/3 KD. A 3 h, la situation inverse est observée et à 6 h, le niveau d'IKBA est le même dans les deux types cellulaires.

L'ensemble de ces résultats révèle que la voie pro-inflammatoire NFκB est plus rapidement activée dans les macrophages PC1/3 KD.

Nous avons ensuite cherché à déterminer si le phénotype pro-inflammatoire observé en absence de PC1/3 pourrait être aussi favorisé par une répression de la voie anti-inflammatoire.

#### II.4.5- La voie anti-inflammatoire STAT3 est réprimée dans les macrophages PC1/3 KD.

Nous avons porté notre attention sur l'activation de STAT3 puisque celle-ci est connue pour exercer un rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation associée au TLR9 [132]. Pour ce faire, les macrophages NT et PC1/3 KD ont été stimulés ou non pendant 1 h, 3 h et 6 h avec 1 μM de CpG-ODN 2006 [97]. Des western blots ont alors été réalisés à l'aide d'un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de STAT3 (**Figure 28**).



**Figure 28 : La voie anti-inflammatoire STAT3 est réprimée dans les macrophages PC1/3 KD.** Les cellules NT et PC1/3 KD ont été traitées ou non pendant 1, 3 et 6 h avec 1 μM de CpG-ODN 2006. **A)** Des western blots ont été réalisés avec un anti-phospho-STAT3. **B)** Les intensités de phospho-STAT3 ont été quantifiées et normalisées avec celles de STAT3. Les résultats sont présentés sous forme graphique (moyenne ± SD). **C).** Le ratio entre les échantillons stimulés au CpG-ODN et ceux non stimulés a ensuite été réalisé. Trois expériences indépendantes ont été effectuées. Les données ont été analysées par un test ANOVA à 3 (**B**) ou 2 (**C**) voies suivi par un test posthoc Holm-Sidak (\*\*\*) $p < 0.001$ .

L'intensité des bandes détectées a été mesurée et normalisée avec celle obtenue pour les protéines STAT3 totales (**Figure 28B**). Ces résultats ont alors été analysés par un test ANOVA à trois voies suivi d'un test Holm-Sidak. Ceci révèle qu'à 3 h et 6 h, le taux de phosphorylation de STAT3 est significativement plus bas dans les cellules PC1/3 KD ( $p < 0.001$ ). Les « fold changes » entre les conditions CpG-ODN et les conditions sans stimulation ont ensuite été calculés (**Figure 28C**). Les résultats obtenus ont alors été analysés par un test ANOVA à deux voies suivi d'un test Holm-Sidak. Cette analyse montre que la phosphorylation de STAT3 ne s'effectue pas avec la même dynamique entre les cellules NT et PC1/3 KD. En effet, le niveau de phosphorylation de STAT3 décroît significativement ( $p < 0.001$ ) dans les macrophages PC1/3 KD traités pendant 6 h avec du CpG-ODN. L'ensemble de ces données indique que la voie anti-inflammatoire STAT3 est réprimée en absence de PC1/3.

Nos résultats montrent que PC1/3 est impliquée dans la régulation de la voie de signalisation associée au TLR9. Nous avons donc ensuite cherché à déterminer si une corrélation entre l'état d'activation de PC1/3 et celui du TLR9 pourrait être faite.

#### II.4.6- Le traitement des macrophages NR8383 WT avec du CpG-ODN induit le clivage et l'activation de PC1/3.

PC1/3 est synthétisée en zymogène inactif de 97 kDa (**Figures 2 et 3**). Son activation nécessite plusieurs clivages protéolytiques. Dans les cellules neuroendocrines, ceux-ci surviennent lors du trafic intracellulaire de PC1/3 depuis le RE vers les vésicules de sécrétion. Ainsi, outre le précurseur de 97 kDa, des formes moléculaires de PC1/3 de 93 kDa, 87 kDa, 74 kDa et 66 kDa peuvent être observées. Il a été démontré que la forme de 87 kDa est partiellement active, celle de 74 kDa plus fortement active et celle de 66 kDa pleinement active. L'activation du TLR9 est également directement liée à sa compartimentalisation spatio-temporelle et à son clivage protéolytique qui survient dans les endosomes (**Figure 24**). Son clivage dans les endosomes ayant un pH acide génère un fragment C-terminal de 64 kDa qui est considéré comme la forme active du récepteur. En revanche, dans les endosomes présentant un pH neutre, son clivage engendre un fragment N-terminal



de 81,4 kDa qui correspond à la forme inactive du TLR9. Pour déterminer si une corrélation entre l'état d'activation de PC1/3 et celui du TLR9 existerait, des macrophages NR8383 de type sauvage (WT) ont été stimulés pendant 15 minutes et 1 h avec 1  $\mu$ M de CpG-ODN 2006 [97]. Un fractionnement cellulaire puis des western blots ont alors été effectués (Figure 29). Ceux-ci ont été réalisés à l'aide d'anticorps qui reconnaissent respectivement des épitopes localisés dans le domaine extracellulaire du TLR9 et le domaine catalytique de PC1/3.

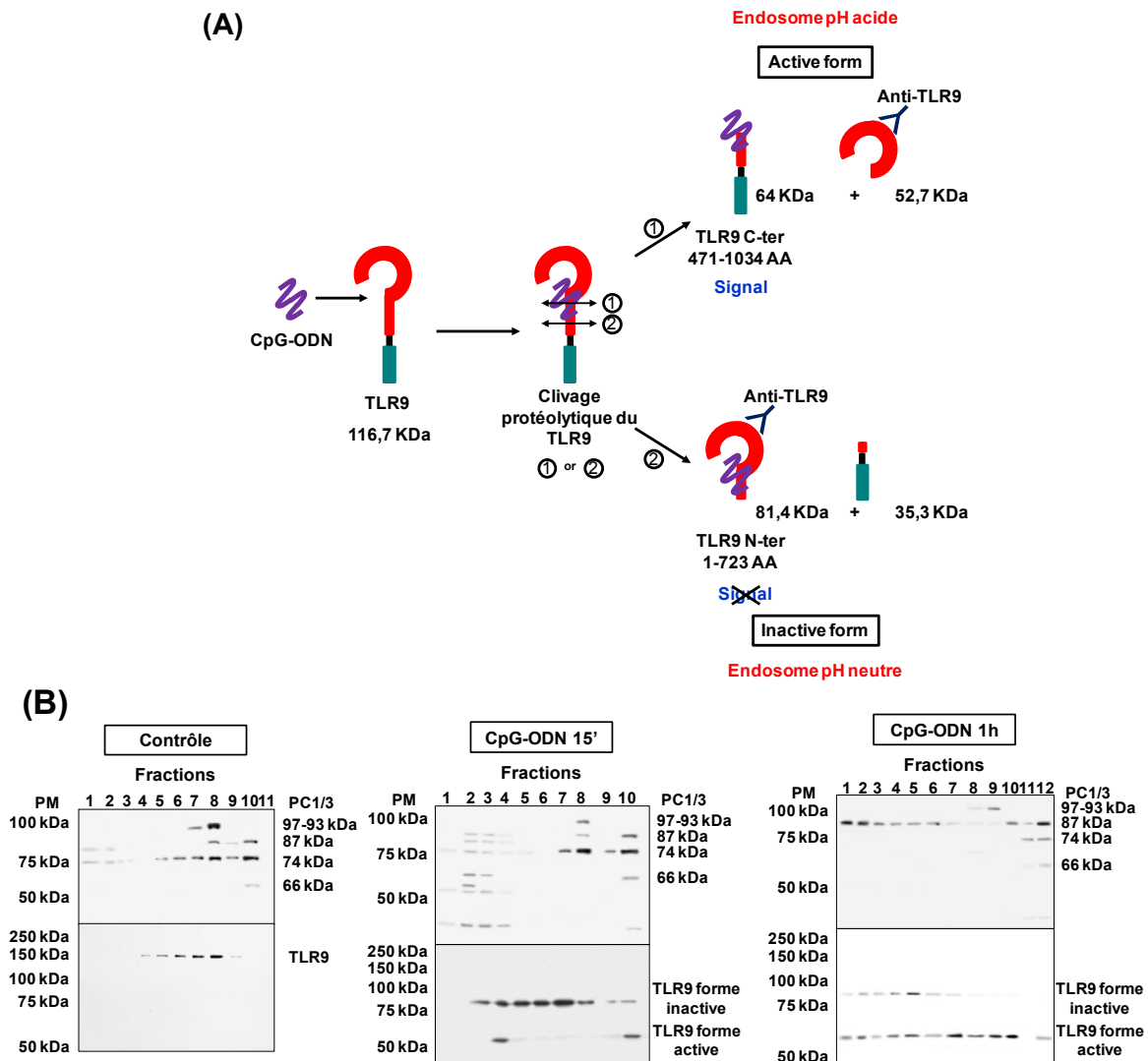


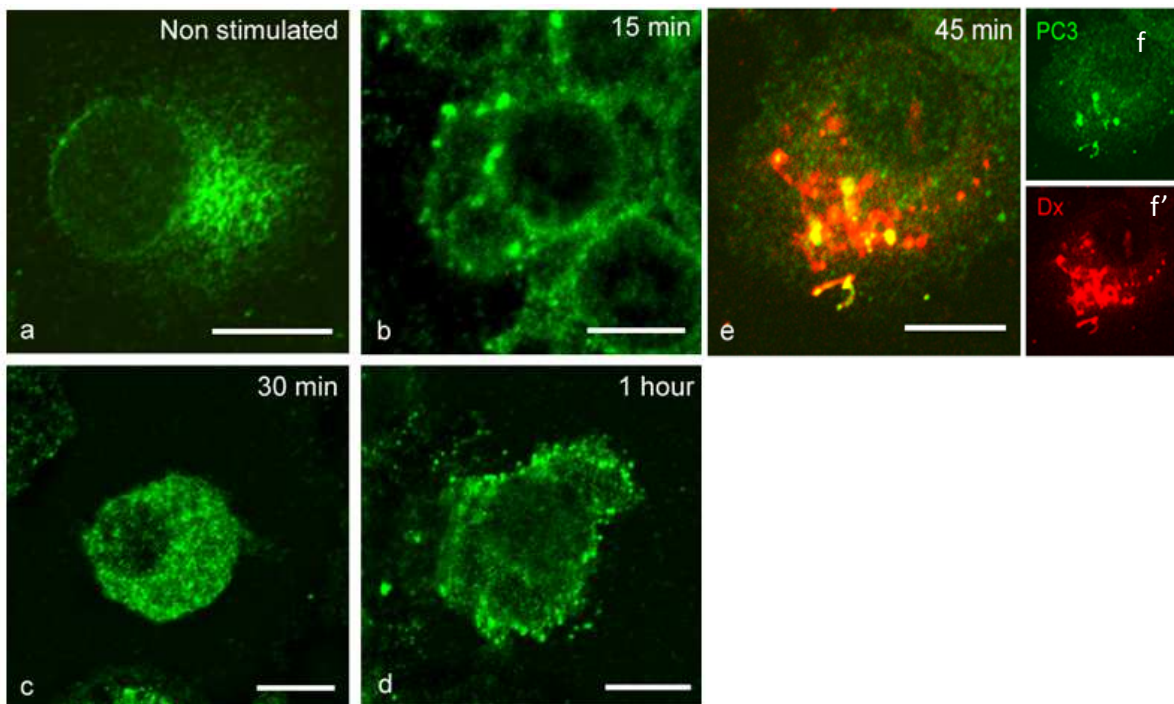
Figure 29 : Etude de l'activation de PC1/3 et du TLR9 lors d'un traitement au CpG-ODN. (A) Représentations schématiques des formes clivées du TLR9. L'anticorps utilisé pour détecter le TLR9 est dirigé contre son domaine extracellulaire. Les poids moléculaires des différentes formes reconnues par l'anticorps après clivage protéolytique du TLR9 sont indiqués. (B) Les cellules NR8383 ont été traitées ou non pendant 15 minutes et 1 h avec 1  $\mu$ M de CpG-ODN 2006 puis un fractionnement cellulaire a été réalisé. Les fractions collectées ont ensuite été déposées sur un gel SDS-PAGE (8%) et des immunoblots ont été effectués à l'aide d'anticorps dirigés contre PC1/3 et le TLR9.

Dans les cellules non stimulées, les différentes formes moléculaires de PC1/3 sont détectées. Néanmoins, ce sont les formes les moins actives qui sont observées. Concernant le TLR9, seule la forme entière du récepteur est mise en évidence. Après 15 minutes de traitement avec du CpG-ODN, les formes clivées du TLR9 sont détectées dans des fractions également positives pour PC1/3. A ce temps de stimulation, c'est la forme inactive du récepteur qui est majoritairement observée. PC1/3 est également clivée pour être activée comme le montre l'apparition accrue des formes actives de 74 kDa et 66 kDa (fractions 2 et 3). Notons que cette forme de 66 kDa est typiquement faiblement détectée du fait de son instabilité naturelle [133]. Par conséquent, après 1 h de traitement, cette forme et celle de 74 kDa disparaissent. En revanche, une augmentation de la forme de 87 kDa est observée. Ceci indique la synthèse et le trafic de PC1/3 depuis le RE vers le TGN afin d'être clivée pour générer une quantité suffisante de formes actives. De façon intéressante, la forme active du TLR9 est très majoritairement détectée à ce temps de stimulation. Ces résultats suggèrent que PC1/3 contrôle l'activation du TLR9. Pour tester cette hypothèse, nous avons tout d'abord étudié l'effet qu'un traitement avec du CpG-ODN exerce sur la localisation intracellulaire de PC1/3.

#### II.4.7- Le traitement des macrophages NR8383 WT avec du CpG-ODN induit la translocation de PC1/3 vers les endosomes.

A l'état basal, PC1/3 est principalement localisée dans le TGN des macrophages NR8383 WT [60]. En revanche, l'expérience d'immunofluorescence que nous avons réalisée montre qu'une stimulation avec 100 nM de CpG-ODN 2006 déclenche le trafic intracellulaire de PC1/3 (**Figures 30a–d**) [97]. Après seulement 15 minutes de traitement, de nombreuses structures vésiculaires contenant PC1/3 commencent à apparaître (**Figure 30b**). Suite à 30 minutes d'incubation, celles-ci occupent quasiment tout l'espace cytoplasmique (**Figure 30c**). Puis après 1 h de stimulation, ces structures vésiculaires contenant PC1/3 migrent vers la périphérie cellulaire et la membrane plasmique (**Figure 30d**). Afin de visualiser les vésicules d'endocytose, ces macrophages ont ensuite été incubés avec du dextran marqué au Texas Red. Suite à ce traitement, une nouvelle expérience d'immunofluorescence a été réalisée à l'aide de l'anti-PC1/3 (**Figure 30e**). La co-localisation observée indique que les

structures vésiculaires dans lesquelles se trouve PC1/3 correspondent à des endosomes et des lysosomes.



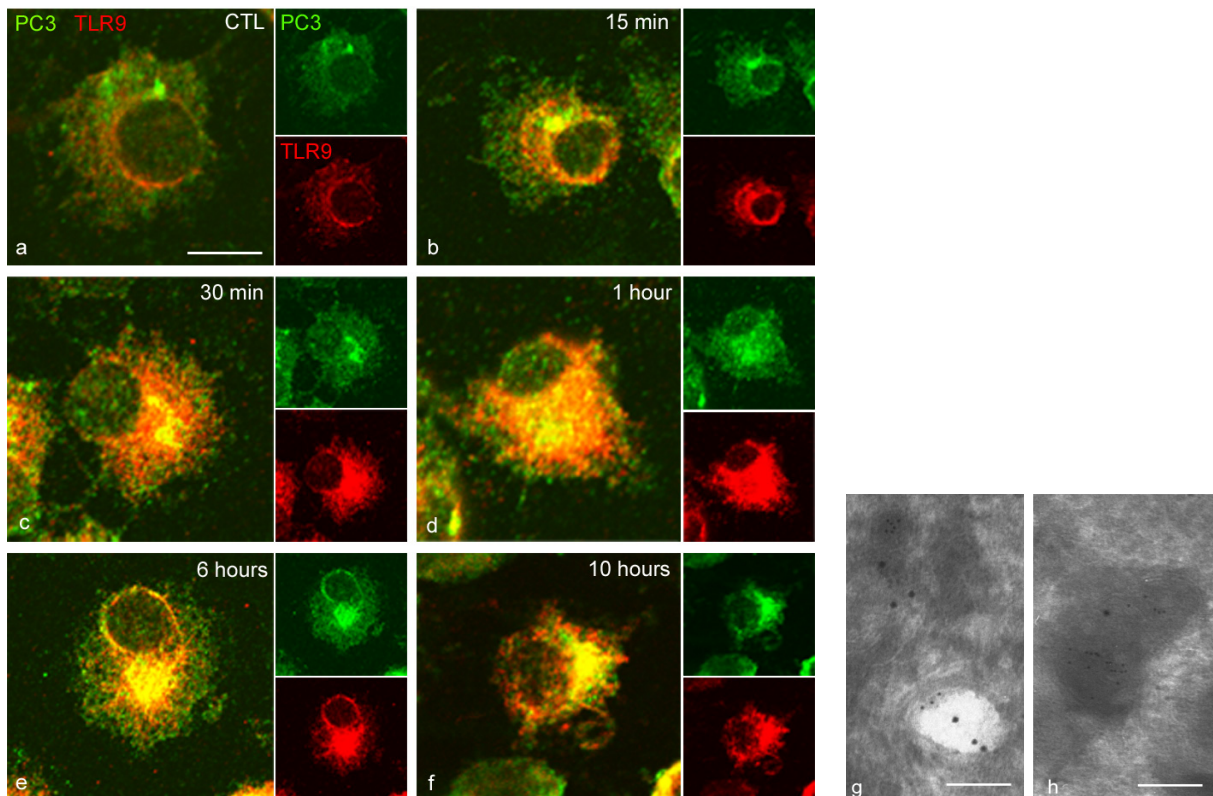
**Figure 30 : Une stimulation avec du CpG-ODN déclenche le trafic intracellulaire de PC1/3.** Une expérience d'immunofluorescence a été réalisée à l'aide d'un anti-PC1/3 (marquage vert). Une analyse par microscopie confocale a ensuite été effectuée. **(a)**. Cellules NR8383 non stimulées. **(b-e)**. Cellules NR8383 stimulées avec 100 nM de CpG-ODN 2006 durant 15, 30, 45 et 60 minutes. **(e)**. La co-localisation observée entre PC1/3 (marquage vert) et du dextran couplé au Texas Red (marquage rouge) révèle que les structures vésiculaires dans lesquelles PC1/3 est détectée correspondent à des lysosomes (grosses vésicules) et endosomes (petites vésicules). Barre d'échelle : 10  $\mu$ m.

Nous avons ensuite suivi conjointement le cheminement intracellulaire de PC1/3 et du TLR9 dans les cellules NR8383 WT traitées avec du CpG-ODN.

#### II.4.8- Suite à un traitement au CpG-ODN, PC1/3 et le TLR9 cheminent vers les mêmes endosomes à pH acide.

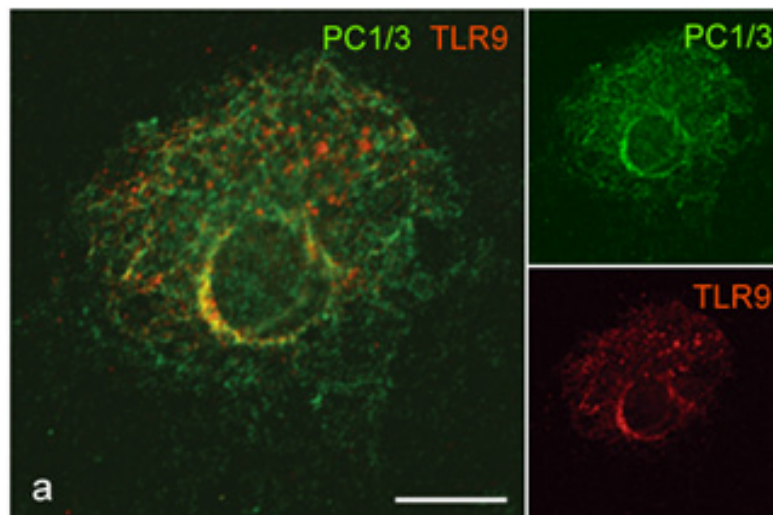
Des macrophages NR8383 WT ont été traités avec 100 nM de CpG-ODN 2006 et le trafic intracellulaire de PC1/3 et du TLR9 au cours du temps a été suivi par immunofluorescence (**Figures 31a-f**) [97]. Cette expérience révèle que dans les cellules non stimulées, PC1/3 et le TLR9 ne sont pas co-localisés (**Figure 31a**).

Néanmoins, après seulement 15 minutes de traitement avec du CpG-ODN, une part de TLR9 est détectée dans un compartiment positif pour PC1/3 (**Figure 31b**). Suite à 30 minutes et 1 h de stimulation, cette co-localisation s'étend progressivement dans l'espace cytoplasmique et vers la périphérie cellulaire (**Figures 31c et d**). Après des temps d'incubation plus longs de 6 et 10 h, cette co-localisation devient très forte et une distribution similaire est observée entre PC1/3 et le TLR9 (**Figures 31e-f'**). Afin de caractériser précisément les organites dans lesquels PC1/3 et le TLR9 sont co-localisés après stimulation, un immunomarquage en microscopie électronique a été réalisé (**Figures 31g-h**). Ainsi, le double marquage immunogold effectué montre clairement leur co-localisation dans les mêmes endosomes et lysosomes.



**Figure 31 : PC1/3 et le TLR9 transloquent dans les mêmes structures vésiculaires dès le début d'un traitement avec du CpG-ODN.** Images de microscopie confocale des cellules NR8383 marquées avec un anti-PC1/3 (marquage vert) et un anti-TLR9 (marquage rouge). **(a)** Cellules non stimulées. **(b-f')** Cellules NR8383 stimulées avec 100 nM de CpG-ODN 2006 durant 15 min, 30 min, 1 h, 6 h et 10 h. Barre d'échelle : 10  $\mu$ m. **(g-h)** Photos de microscopie électronique à transmission après un marquage immunogold. Celles-ci montrent la présence de PC1/3 (petites particules d'or, 6 nm) et du TLR9 (grosses particules d'or, 12 nm) dans les mêmes endosomes **(g)** et lysosomes **(h)** après une incubation avec 100 nM de CpG-ODN 2006 pendant 6 h. Barre d'échelle : 250 nm.

Nos résultats montrent qu'il existe une corrélation entre l'état d'activation de PC1/3 et celui du TLR9 (**Figure 29B**). Rappelons que le TLR9 est clivé dans les endosomes présentant un pH acide afin de générer sa forme active et que PC1/3 nécessite aussi un pH acide pour être pleinement active. Ceci suggère donc que la co-localisation de PC1/3 et du TLR9 survienne dans les endosomes ayant un pH acide. Pour tester cette hypothèse, les macrophages NR8383 WT ont été traités pendant 2h avec 100 nM de bafilomycine A1 puis stimulés durant 6 h avec 100 nM de CpG-ODN (**Figure 32**) [97]. En effet, ce composé bloque l'acidification des endosomes en inhibant l'activité de la pompe à protons vacuolaires V-ATPase présente au niveau de leurs membranes. L'expérience d'immunofluorescence réalisée montre que suite à ce traitement à la bafilomycine A1, il n'y a plus de co-localisation entre PC1/3 et le TLR9 sauf au niveau du RE. Ceci démontre que leur co-localisation survient donc bien dans les endosomes présentant un pH acide.

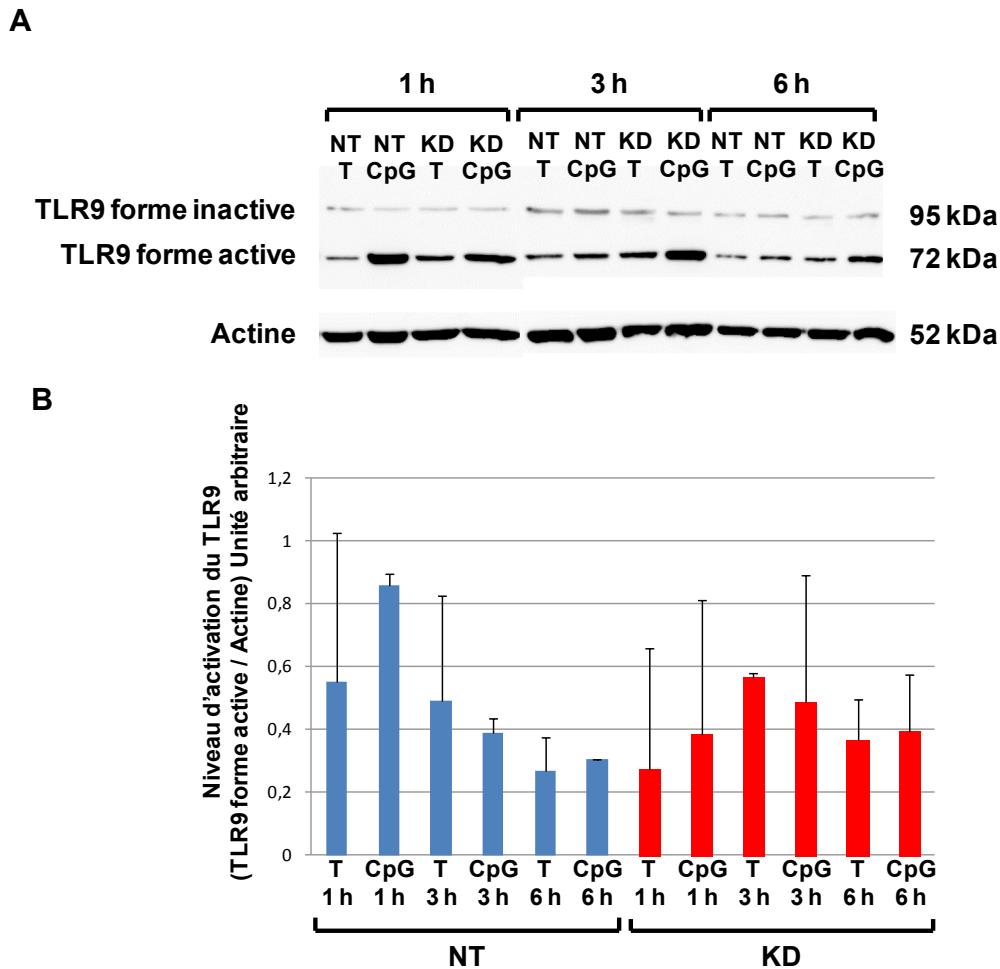


**Figure 32** : La bafilomycine A1 abolit la co-localisation entre PC1/3 et le TLR9 qui était observée suite à un traitement avec du CpG-ODN. Les cellules NR8383 ont été traitées pendant 2h avec 100 nM de bafilomycine A1 puis stimulées durant 6 h avec 100 nM de CpG-ODN 2006. Un double marquage a alors été réalisé avec un anti-PC1/3 (marquage vert) et un anti-TLR9 (marquage rouge). Une analyse par microscopie confocale a ensuite été effectuée. Barre d'échelle : 10  $\mu$ m.

L'ensemble de ces résultats suggère également que PC1/3 puisse contrôler l'activation du TLR9 en le clivant.

#### II.4.9- PC1/3 ne contrôle pas l'activation du TLR9 par son clivage protéolytique.

Pour déterminer si PC1/3 pourrait activer le TLR9 en le clivant, nous avons à nouveau utilisé les macrophages NT et PC1/3 KD. Ceux-ci ont été stimulés ou non pendant 1 h, 3 h et 6 h avec 1  $\mu$ M de CpG-ODN 2006 et le clivage protéolytique du TLR9 a été étudié par Western blot (**Figure 33**) [97].



**Figure 33 : PC1/3 ne contrôle pas l'activation du TLR9 par son clivage protéolytique.** Les cellules NT et PC1/3 KD ont été traitées ou non pendant 1, 3 et 6 h avec 1  $\mu$ M de CpG-ODN 2006. **A)** Des western blots ont été réalisés avec un anti-TLR9. **B)** Les intensités des bandes de 64 kDa qui correspondent à la forme active du TLR9 ont été quantifiées et normalisées avec celles de l'actine. Les résultats sont présentés sous forme graphique (moyenne  $\pm$  SD). Trois expériences indépendantes ont été effectuées. Les données ont été analysées par un test ANOVA à 3 voies suivi par un test posthoc Holm-Sidak.

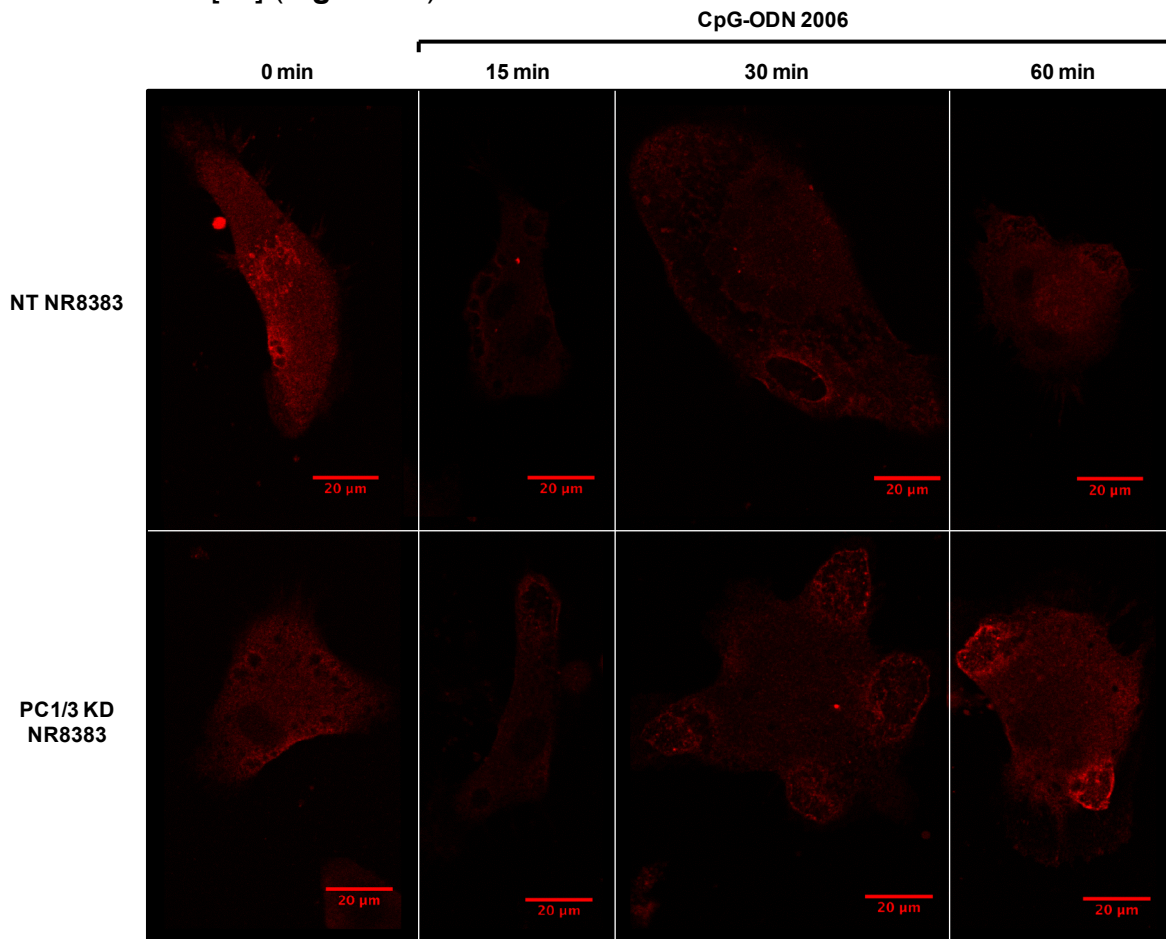
L'intensité des bandes détectées à 64 kDa correspondant à la forme active du récepteur a été mesurée et normalisée avec celle obtenue pour l'actine (**Figure**

**33B**). Ces résultats ont alors été analysés par un test ANOVA à trois voies suivi d'un test Holm-Sidak. Cependant, au cours de la cinétique de stimulation, aucune différence n'est observée entre les cellules NT et PC1/3 KD. Ceci démontre que PC1/3 ne contrôle pas le clivage du TLR9 et donc son activation.

Compte tenu de nos résultats (**Figures 31a-f**), l'autre hypothèse que nous avons émise est que PC1/3 pourrait réguler le trafic intracellulaire du TLR9.

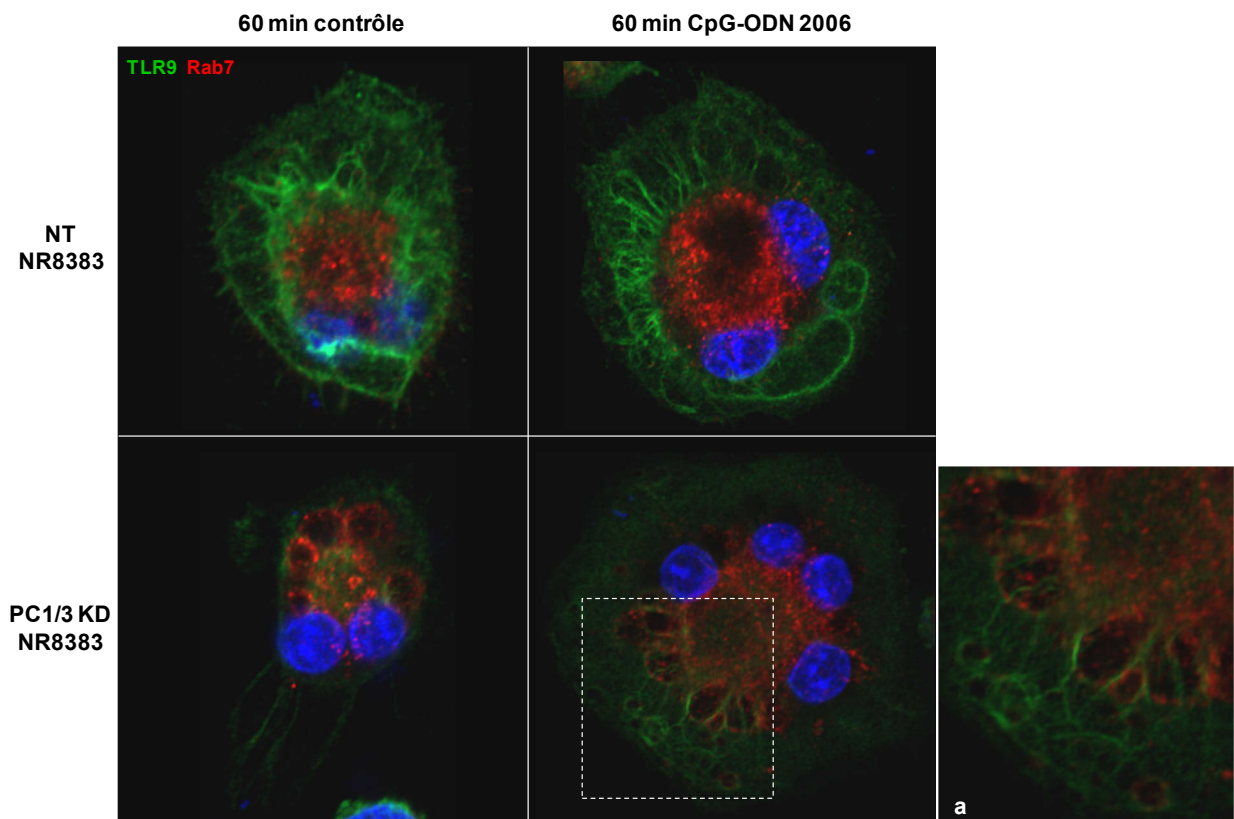
#### II.4.10- PC1/3 régule le trafic intracellulaire du TLR9.

Des macrophages NT et PC1/3 KD ont été traités pendant 15 min., 30 min. et 1 h avec 1  $\mu$ M de CpG-ODN 2006. Une immunofluorescence a alors été réalisée afin de détecter le TLR9 [97] (**Figure 34**).



**Figure 34 : PC1/3 régule la localisation intracellulaire du TLR9.** Les cellules NT et PC1/3 KD ont été traitées pendant 0, 15, 30 et 60 min avec 1  $\mu$ M de CpG-ODN 2006. Un marquage a alors été réalisé avec un anti-TLR9 (marquage rouge) et une analyse par microscopie confocale a été effectuée. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m.

Celle-ci révèle qu'au cours de la cinétique de stimulation, le TLR9 forme des agrégats. Néanmoins, ceux-ci sont plus fortement marqués dans les cellules PC1/3 KD. Un co-marquage effectué avec un anticorps dirigé contre Rab7 montre que l'agrégation du TLR9 dans les macrophages PC1/3 KD survient au niveau des corps multi-vésiculaires (Figure 35). Ceci démontre que PC1/3 est cruciale pour le trafic intracellulaire correct du TLR9. Par ailleurs, cette agrégation du TLR9 dans les corps multi-vésiculaires pourrait expliquer pourquoi la voie NF $\kappa$ B est plus précocement activée en absence de PC1/3 (Figure 27B).

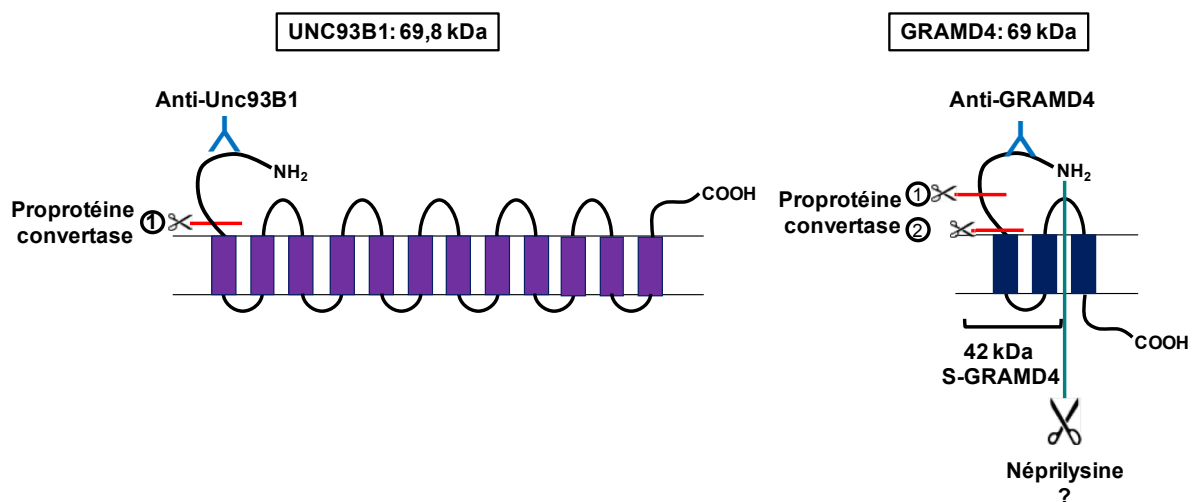


**Figure 35 : En absence de PC1/3, le TLR9 s'agrège au niveau des corps multi-vésiculaires (MVB) suite à un traitement avec du CpG-ODN.** Les cellules NT et PC1/3 KD ont été traitées pendant 60 min avec 1  $\mu$ M de CpG-ODN 2006. Un double marquage avec un anti-TLR9 (marquage vert) et un anti-Rab7 (marquage rouge) a alors été réalisé. Les noyaux ont été marqués avec du Hoechst 33 342 (bleu). Une analyse par microscopie confocale a ensuite été réalisée. Un agrandissement de la région encadrée est présenté en (a). Il montre que le TLR9 est co-localisé avec Rab7, ce qui révèle l'agrégation du TLR9 dans les MVB.

Nous avons ensuite cherché à comprendre comment PC1/3 régule le trafic du TLR9. Rappelons que GRAMD4 inhibe le trafic du TLR9 en le retenant dans le RE (Figure 24) [118]. Suite à l'internalisation de CpG-ODN, cette inhibition est levée par



l'interaction de NOGO-B2 avec GRAMD4 [118]. Le TLR9 peut alors être pris en charge par UNC93B1 qui est la protéine majeure régulant son cheminement du RE vers les endosomes [124,125]. De façon intéressante, par des analyses bioinformatiques, nous avons identifié des sites potentiels de clivage pour les proprotéines convertases dans les extrémités N-terminales d'UNC93B1 et de GRAMD4 (**Figure 36**) [70]. Nous avons donc émis l'hypothèse que PC1/3 pourrait contrôler le trafic du TLR9 en clivant UNC93B1 et GRAMD4.

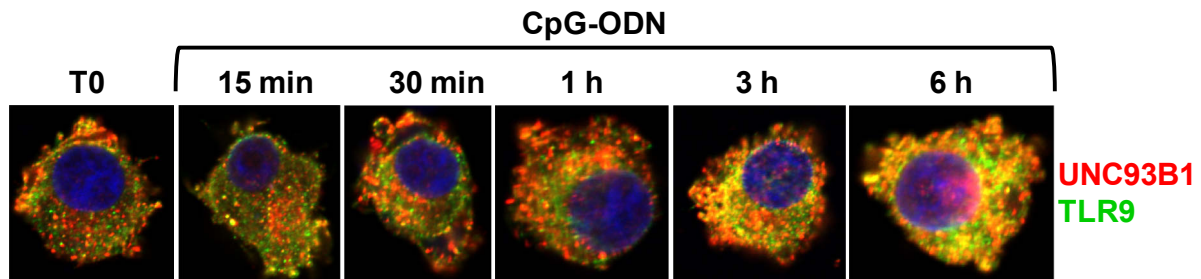


**Figure 36 : UNC93B1 et GRAMD4 présentent des sites potentiels de clivage pour les proprotéines convertases au niveau de leurs extrémités N-terminales.** Ces sites potentiels de clivage ont été identifiés par une analyse bioinformatique. Alors qu'UNC93B1 présente un seul site potentiel de clivage, GRAMD4 en possède deux. Le clivage d'UNC93B1 conduirait à la libération de fragments protéiques de 8 kDa et 61,8 kDa. Dans le cas de GRAMD4, un clivage au niveau du premier site conduirait à la libération de fragments protéiques de 17 kDa et 52 kDa. Son clivage au niveau du second site, libèrerait des fragments de 28 kDa et 41 kDa. Lors de nos expériences (**Figure 39**), nous avons montré la présence d'une forme courte de GRAMD4 de 42 kDa que nous avons appelée S-GRAMD4. Celle-ci ne présenterait que les deux premiers domaines transmembranaires. Une analyse bioinformatique révèle que cette forme clivée pourrait être produite après clivage de GRAMD4 par la néprilysine. Les deux anticorps utilisés lors des expériences de Western blot sont dirigés contre les extrémités N-terminales d'UNC93B1 et GRAMD4.

#### II.4.11- PC1/3 ne clive pas UNC93B1.

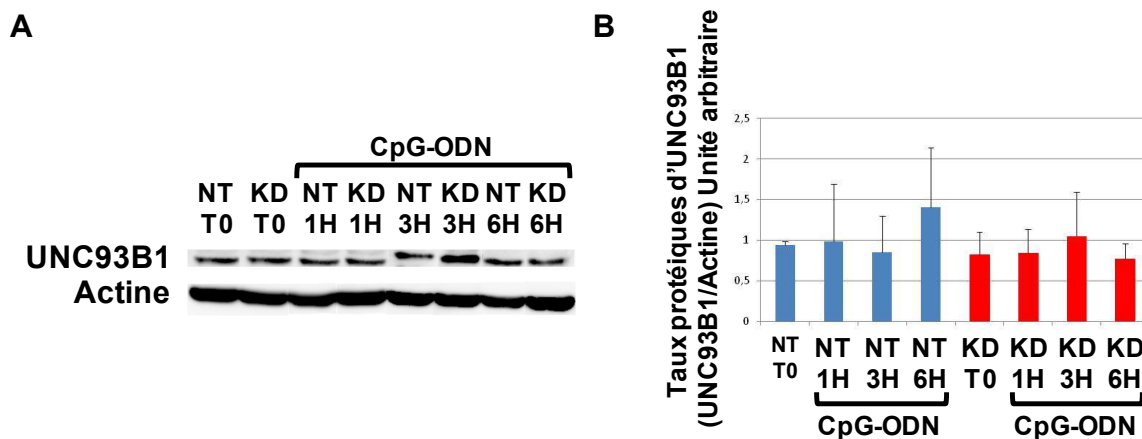
Dans un premier temps, nous avons souhaité déterminer par Western blot si PC1/3 clive UNC93B1. Pour réaliser cette expérience, nous utiliserons un anticorps qui reconnaît un épitope localisé dans l'extrémité N-terminale d'UNC93B1 (**Figure**

**36A).** Une caractéristique d'UNC93B1 est de cheminer avec le TLR9 depuis le RE vers les endosomes suite à une stimulation avec du CpG-ODN. Nous avons donc utilisé cette caractéristique afin de valider l'anticorps dirigé contre UNC93B1. Pour ce faire, les macrophages NT et PC1/3 KD ont été stimulés par 1  $\mu$ M de CpG-ODN 2006 pendant 0, 15 min., 30 min., 1h, 3h et 6h [70]. Une immunofluorescence a alors été réalisée afin de détecter le TLR9 et UNC93B1 (**Figure 37**).



**Figure 37 :** Dans les macrophages NR8383 NT, UNC93B1 et le TLR9 transitent ensemble suite à un traitement avec du CpG-ODN. Les cellules NT ont été traitées pendant 15 min, 30 min, 1 h, 3 h et 6 h avec 1  $\mu$ M de CpG-ODN 2006. Un double marquage avec un anti-TLR9 (marquage vert) et un anti-UNC93B1 (marquage rouge) a alors été réalisé. Les noyaux ont été marqués avec du Hoechst 33 342 (bleu). Une analyse par microscopie confocale a ensuite été effectuée.

Celle-ci montre que l'anticorps utilisé détecte une protéine présentant le comportement typique d'UNC93B1. En effet, après 30 minutes de traitement avec du CpG-ODN, une agrégation d'UNC93B1 dans la cellule est observée. Suite à 1 h de stimulation, un début de co-localisation entre UNC93B1 et le TLR9 est visible. Celle-ci s'intensifie fortement après 3 h et 6 h d'incubation. L'anticorps semble donc reconnaître spécifiquement UNC93B1 et peut être utilisé pour effectuer le western blot envisagé. Celui-ci a été réalisé sur des extraits protéiques de macrophages NT et PC1/3 KD stimulés par 1  $\mu$ M de CpG-ODN 2006 pendant 0, 1h, 3h et 6h (**Figure 38**) [70]. Cependant, durant toute la cinétique de stimulation, aucun clivage d'UNC93B1 n'a été observé et ce, que ce soit dans les cellules NT ou PC1/3 KD. L'intensité des bandes révélées lors de ce western blot a quand même été mesurée et normalisée avec celle de l'actine (**Figure 38B**). Néanmoins, aucune modulation significative des taux protéiques d'UNC93B1 n'a été mise en évidence et ce, que ce soit dans les cellules NT, PC1/3 KD ou entre ces deux types cellulaires.

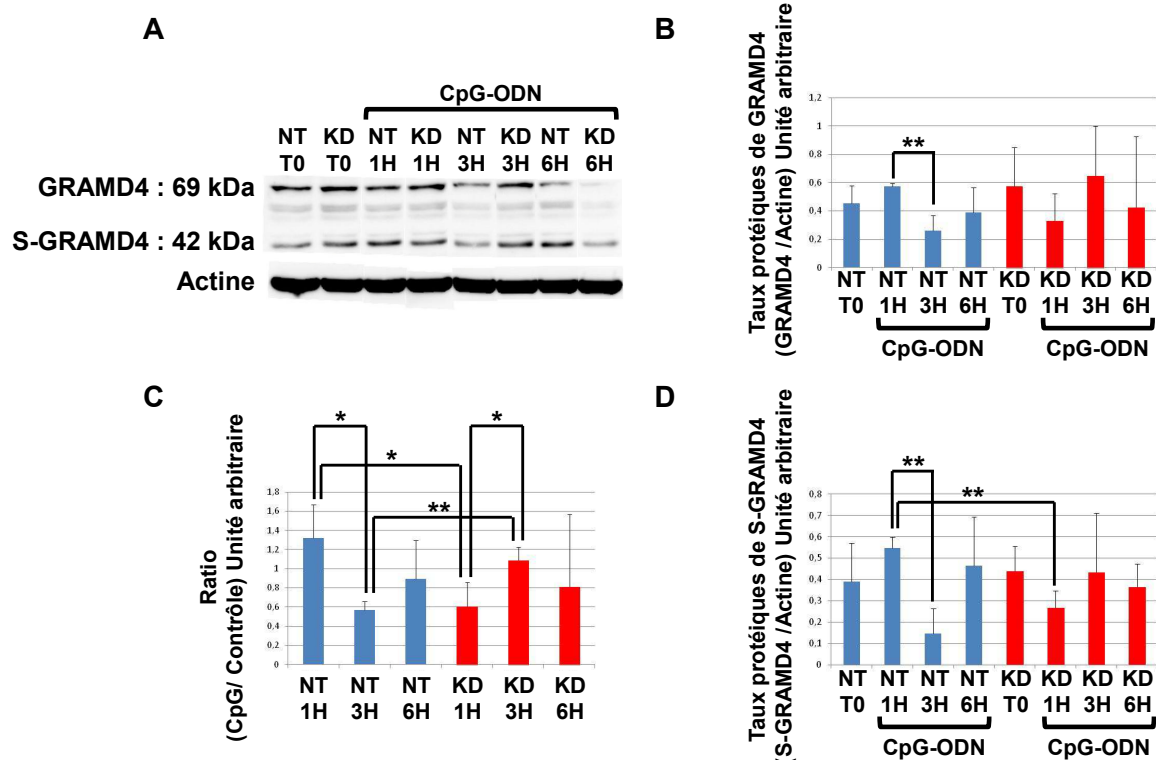


**Figure 38 : Aucune variation significative des taux protéiques d'UNC93B1 n'a été observée dans les cellules NT et PC1/3 KD suite à un traitement avec du CpG-ODN.** Les cellules NT et PC1/3 KD ont été traitées ou non pendant 1, 3 et 6 h avec 1  $\mu$ M de CpG-ODN 2006. **A)** Des western blots ont été réalisés avec un anti-UNC93B1. **B)** Les intensités d'UNC93B1 ont été quantifiées et normalisées avec celles de l'actine. Trois expériences indépendantes ont été effectuées. Les résultats sont présentés sous forme graphique (moyenne  $\pm$  SD). Les données ont été analysées par un test de Student.

#### II.4.12- PC1/3 régule les taux protéiques de GRAMD4 et d'une forme tronquée de GRAMD4 (S-GRAMD4).

Afin de déterminer si PC1/3 clive GRAMD4, les macrophages NT et PC1/3 KD ont été traités par 1  $\mu$ M de CpG-ODN 2006 pendant 0, 1h, 3h et 6h et un western blot a été réalisé [70]. L'anticorps utilisé reconnaît un épitope localisé dans les 100 premiers acides aminés N-terminaux de GRAMD4 (**Figure 36B**). Cependant, durant toute la cinétique de stimulation, aucun clivage de GRAMD4 par une proprotéine convertase n'est observé et ce, que ce soit dans les cellules NT ou PC1/3 KD. L'intensité des bandes de 69 kDa correspondant à GRAMD4 a été mesurée et normalisée avec celle de l'actine (**Figures 39B**). Ceci révèle que le niveau protéique de GRAMD4 diminue fortement dans les cellules NT entre 1 h et 3 h de traitement au CpG-ODN. Ceci n'est pas observé dans les cellules PC1/3 KD. Les « fold changes » entre les conditions CpG-ODN et les conditions sans stimulation ont ensuite été calculés (**Figure 39C**). Ils montrent que l'effet exercé par le CpG-ODN sur les taux protéiques de GRAMD4 est significativement différent entre les macrophages NT et PC1/3 KD. Dans les cellules NT, le CpG-ODN induit l'augmentation du niveau

protéique de GRAMD4 après 1 h de traitement puis sa diminution suite à 3 h d'incubation. L'effet opposé est significativement observé dans les cellules PC1/3 KD stimulées au CpG-ODN.



**Figure 39 : Après 1 h de traitement avec du CpG-ODN, les cellules PC1/3 KD présentent des taux protéiques de GRAMD4 et S-GRAMD4 plus faibles.** Les cellules NT et PC1/3 KD ont été traitées ou non pendant 1, 3 et 6 h avec 1  $\mu$ M de CpG-ODN 2006. **A)** Des western blots ont été réalisés avec un anti-GRAMD4. **B)** Les intensités de GRAMD4 (69 kDa) ont été quantifiées et normalisées avec celles de l'actine. **C)** Le ratio entre les échantillons stimulés au CpG-ODN et ceux non stimulés (T0) a ensuite été réalisé. **D)** Les intensités de S-GRAMD4 (42 kDa) ont été quantifiées et normalisées avec celles de l'actine. Trois expériences indépendantes ont été effectuées. Les résultats sont présentés sous forme graphique (moyenne  $\pm$  SD). Les données ont été analysées par un test de Student (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01).

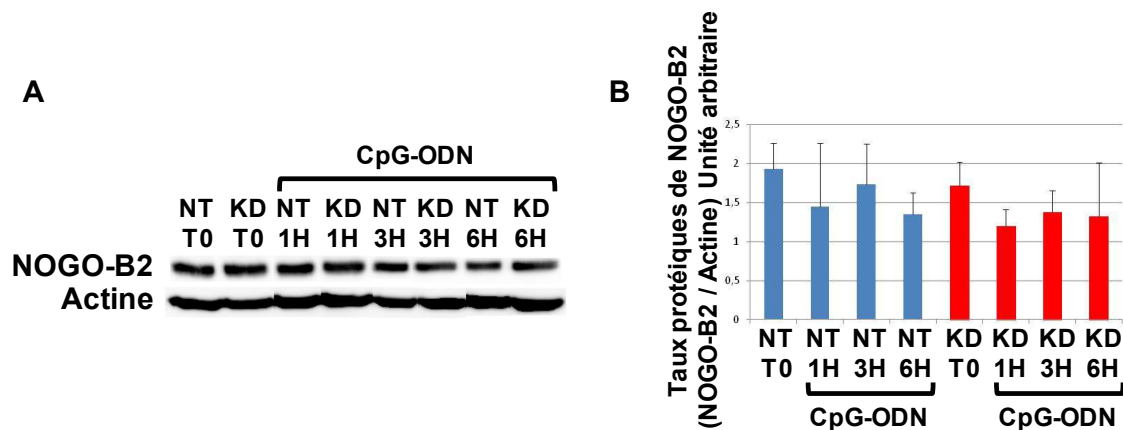
Durant cette expérience, une bande à environ 42 kDa est également détectée (**Figure 39A**). Bien évidemment, seul son séquençage par spectrométrie de masse peut confirmer définitivement l'identité de la protéine détectée. Néanmoins, pour déterminer si l'anticorps aurait pu se lier à une autre protéine, nous avons effectué une analyse Blast avec la séquence contenant l'épitope reconnu. Seules des séquences correspondant à GRAMD4 ont été retrouvées. Ainsi, la bande de 42 kDa mise en évidence correspondrait à une forme plus courte de GRAMD4. Nous l'avons appelée S-GRAMD4. Cette forme possède toujours l'extrémité N-terminale de la

protéine puisque l'épitope reconnu par l'anticorps y est localisé (**Figure 36B**). En revanche, la taille de S-GRAMD4 suggère que cette forme ne présente que les deux premiers domaines transmembranaires (**Figure 36B**). L'intensité des bandes de 42 kDa correspondant à S-GRAMD4 a été mesurée et normalisée avec celle de l'actine (**Figure 39D**). Dans les cellules NT, une forte diminution du niveau protéique de S-GRAMD4 survient à nouveau entre 1 h et 3 h de traitement au CpG-ODN. Celle-ci n'est toujours pas observée dans les cellules PC1/3 KD. Néanmoins, après 1 h d'incubation avec du CpG-ODN, le taux protéique de S-GRAMD4 détecté dans les cellules PC1/3 KD est significativement plus bas que celui observé dans les cellules NT. Ainsi, ces résultats montrent que lors d'une stimulation avec du CpG-ODN, PC1/3 contribuerait à réguler le renouvellement protéique de GRAMD4 et/ou indirectement son clivage.

Rappelons que NOGO-B2 intervient pour lever l'inhibition exercée par GRAMD4 sur le trafic intracellulaire du TLR9. Compte tenu de nos résultats, nous avons souhaité déterminer si la variation des taux protéiques de NOGO-B2 pourrait aussi être altérée en absence de PC1/3.

#### II.4.13- Estimation des niveaux protéiques de NOGO-B2 dans les macrophages NT et PC1/3 KD traités au CpG-ODN.

Les macrophages NT et PC1/3 KD ont été traités par 1  $\mu$ M de CpG-ODN 2006 pendant 0, 1 h, 3 h et 6 h et un western blot a été réalisé (**Figure 40**) [70]. L'intensité des bandes révélées a été mesurée et normalisée avec celle de l'actine. Néanmoins, aucune modulation significative des taux protéiques de NOGO-B2 n'a été mise en évidence et ce, que ce soit dans les cellules NT, PC1/3 KD ou entre ces deux types cellulaires.



**Figure 40** : Aucune variation significative des taux protéiques de NOGO-B2 n'a été observée dans les cellules NT et PC1/3 KD suite à un traitement avec du CpG-ODN. Les cellules NT et PC1/3 KD ont été traitées ou non pendant 1, 3 et 6 h avec 1  $\mu$ M de CpG-ODN 2006. **A**) Des western blots ont été réalisés avec un anti-NOGO-B2. **B**) Les intensités de NOGO-B2 ont été quantifiées et normalisées avec celles de l'actine. Trois expériences indépendantes ont été effectuées. Les résultats sont présentés sous forme graphique (moyenne  $\pm$  SD). Les données ont été analysées par un test de Student.

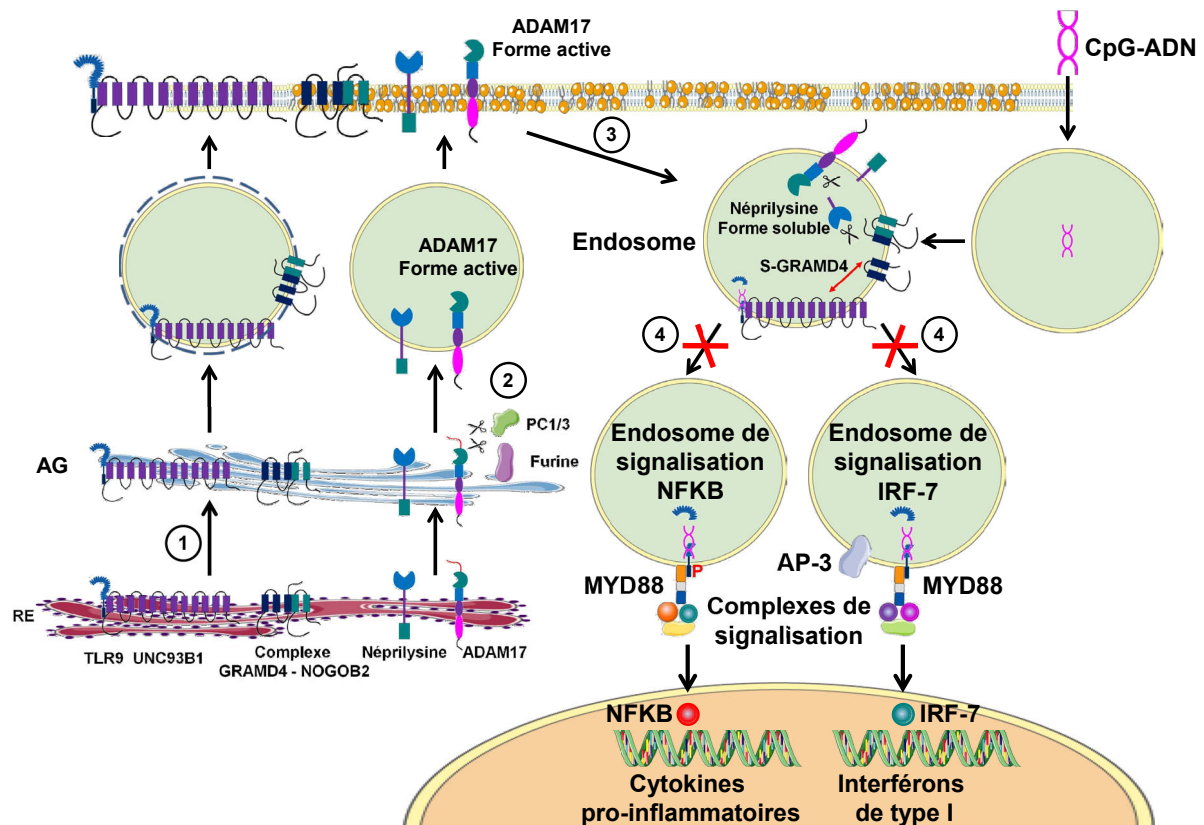
#### II.4.14- Discussion.

Nos résultats révèlent que PC1/3 contrôle aussi la biologie du TLR9 dans les macrophages. Ainsi, nous avons pu démontrer pour la première fois sa maturation en enzyme active suite à une stimulation avec du CpG-ODN (**Figure 29B**). Au cours de ce traitement, elle chemine avec le TLR9 vers les endosomes à pH acide (**Figure 32**). Puisque PC1/3 est une protéase pleinement active à un tel pH, nous avons envisagé qu'elle puisse cliver le récepteur dans ces endosomes. Néanmoins, nos résultats montrent que ce n'est pas le cas (**Figure 33**). En revanche, ils révèlent que PC1/3 intervient dans la régulation du trafic intracellulaire du TLR9. En effet, en son absence, l'adressage du récepteur est altéré et celui-ci s'agrège dans les corps multi-vésiculaires (**Figures 34 et 35**). Il en résulte une activation préférentielle et plus précoce de la voie pro-inflammatoire NF $\kappa$ B (**Figure 27b**). Nos données sont contraires à ce qui a pu être observé pour la furine dans l'immunité antivirale exercée par d'autres TLRs endosomaux, les TLR7 et 8 [134,135]. En effet, cette proprotéine convertase ne régule pas le trafic du TLR7 mais est requise pour le clivage des TLR7 et 8 dans les endosomes. Par des analyses bioinformatiques, nous avons identifié

des sites potentiels de clivage pour les proprotéines convertases dans les extrémités N-terminales d'UNC93B1 et de GRAMD4 (**Figure 36**). Alors que GRAMD4 inhibe le trafic du TLR9 en le retenant dans le RE [118], UNC93B1 est indispensable pour son adressage vers les endosomes [124,125]. Ceci suggérerait fortement que PC1/3 puisse contrôler le trafic du TLR9 en clivant UNC93B1 et GRAMD4. Cependant, nous n'avons pas pu observer de tels clivages au cours de nos expériences. En revanche, nous avons pu montrer que le CpG-ODN exerce un effet significativement différent sur les taux protéiques de GRAMD4 lorsque PC1/3 est absente (**Figure 39B et C**). Ainsi, dans les cellules NT, le CpG-ODN induit l'augmentation du niveau protéique de GRAMD4 après 1 h de traitement puis sa diminution suite à 3 h d'incubation. Dans ces macrophages, c'est à ce temps de 3 h que la co-localisation forte entre le TLR9 et UNC93B1 débute (**Figure 37**). En outre, dans les cellules PC1/3 KD, les taux protéiques de GRAMD4 évoluent de façon opposée à ce qui est observé dans les cellules NT (**Figure 39B et C**). En effet, ils diminuent après 1 h de traitement puis augmentent suite à 3 h d'incubation. Or, c'est à 1 h de stimulation avec du CpG-ODN que l'adressage accru du TLR9 est visible dans les macrophages PC1/3 KD (**Figure 34**). Ces résultats suggèrent que PC1/3 retarde le trafic du TLR9 en maintenant des niveaux protéiques de GRAMD4 plus élevés. Leur diminution suite à une stimulation par du CpG-ODN permettrait à NOGO-B2 de lever l'inhibition exercée par GRAMD4 sur le trafic du TLR9. En absence de PC1/3, ceci surviendrait plus précocement. Cela expliquerait pourquoi une agrégation du récepteur est observée dans les corps multi-vésiculaires dès 1 h d'incubation avec du CpG-ODN. Par ailleurs, PC1/3 pourrait aussi contrôler le trafic du TLR9 en régulant indirectement le clivage de GRAMD4. En effet, nous avons pu mettre en évidence une forme courte de GRAMD4 de 42 kDa que nous avons appelée S-GRAMD4 (**Figures 36B et 39A**). Alors que celle-ci posséderait toujours l'extrémité N-terminale de la protéine, elle ne présenterait que deux domaines transmembranaires au lieu de trois (**Figure 36**). A l'heure actuelle, seule une isoforme de GRAMD4 a été décrite (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6IC98>). Néanmoins, celle-ci code pour une protéine tronquée de 10 kDa. Ce n'est donc pas celle-ci que nous détectons ici. S-GRAMD4 serait donc une nouvelle isoforme de GRAMD4 qui pourrait être générée par épissage alternatif. Une autre possibilité qui peut être envisagée est que S-GRAMD4 serait générée suite au clivage protéolytique de GRAMD4. Une analyse bioinformatique révèle que cette forme clivée pourrait être produite après clivage de GRAMD4 par une autre protéase

telle que la néprilysine (**Figure 36B**). L'expression de cette enzyme dans les macrophages est connue. Bien que principalement décrite comme membranaire, son clivage par ADAM17 a pu être démontré dans l'endothélium vasculaire afin de générer une forme soluble [136]. Celle-ci est alors émise dans le milieu extracellulaire par des exosomes [136]. Le clivage de la néprilysine surviendrait donc lors de son internalisation avec ADAM17. Par ailleurs, si la néprilysine clive GRAMD4, cela implique que celle-ci chemine depuis le RE vers la membrane plasmique pour ensuite être internalisée dans les mêmes vésicules. A l'heure actuelle, le suivi du trafic de GRAMD4 et de NOGO-B2 au cours d'un traitement avec du CpG-ODN n'a encore jamais été réalisé. Ainsi, après que NOGO-B2 ait levé l'inhibition exercée par GRAMD4 sur le trafic du TLR9, nous ne savons pas si ces deux protéines cheminent également vers la membrane plasmique puis les endosomes. Néanmoins, nous ne pouvons pas l'exclure. En effet, il a été montré que d'autres membres de la famille RTN à laquelle appartient NOGO-B2 pourraient fonctionner comme des protéines de transport depuis le RE vers la membrane plasmique, le Golgi et les endosomes [137–139]. Lors d'un traitement avec du CpG-ODN, GRAMD4 et NOGO-B2 pourraient donc être adressées avec UNC93B1 et le TLR9 vers la membrane plasmique (**Figure 41**). Suite à l'internalisation du complexe protéique, GRAMD4 pourrait alors être clivée par la néprilysine afin de produire S-GRAMD4. Maintenant, quel rôle peut-il être envisagé pour S-GRAMD4 ? NOGO-B2 et GRAMD4 sont toutes deux des protéines transmembranaires (**Figure 24**). Il est donc vraisemblable que leur interaction se fasse via leurs domaines transmembranaires (TMs). Suite à son clivage, GRAMD4 perdrait un TM (**Figure 36B**). Ceci pourrait rompre son interaction avec NOGO-B2. Ainsi, de façon similaire à ce qui est observé avec GRAMD4 dans le RE, S-GRAMD4 pourrait alors inhiber l'acheminement du TLR9 vers les endosomes de signalisation. Cette hypothèse peut être considérée compte tenu de nos résultats et elle contribuerait à expliquer pourquoi le trafic du TLR9 est altéré en absence de PC1/3. En effet, pour être activée, ADAM17 est clivée par l'action combinée de différentes proprotéines convertases dont PC1/3 (**Figure 41**) [96]. De plus, l'agrégation du TLR9 dans les cellules PC1/3 KD traitées pendant 1 h avec du CpG-ODN survient dans les corps multi-vésiculaires qui sont une source d'exosomes (**Figure 35**) [140]. Or, c'est à ce temps de stimulation que le taux protéique de S-GRAMD4 est significativement plus bas dans les cellules PC1/3 KD (**Figure 39D**).



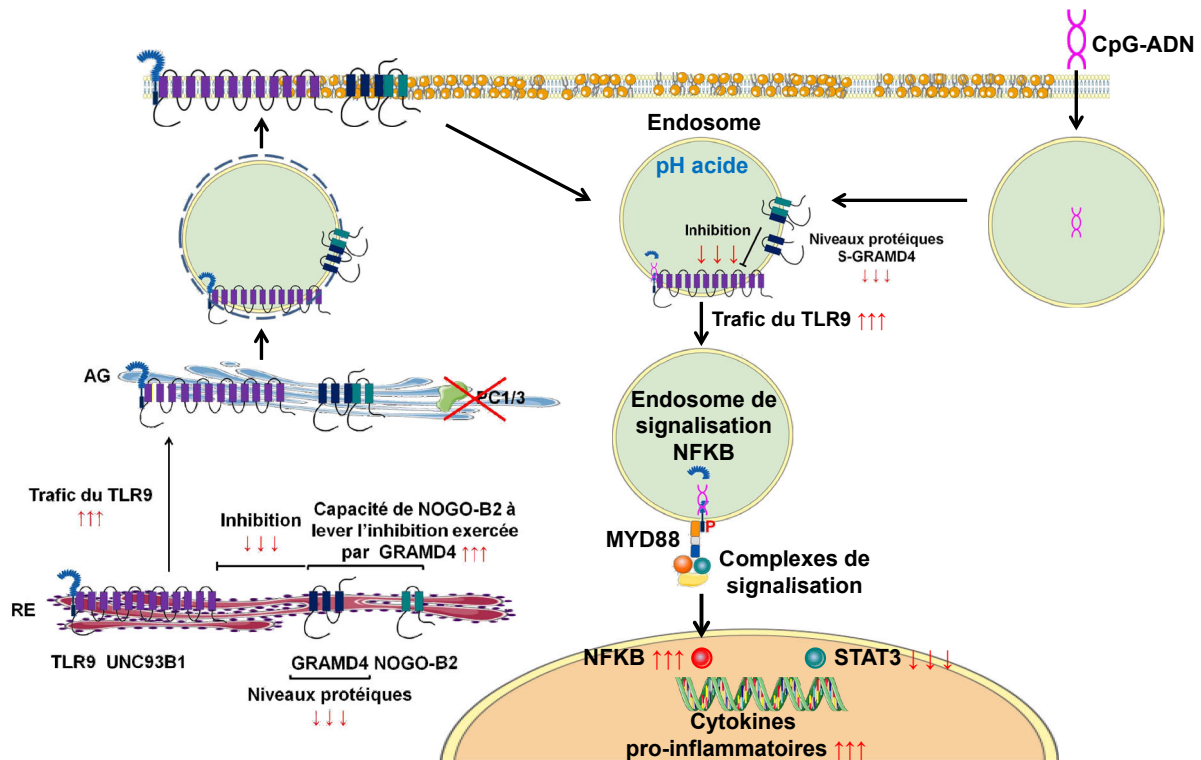


**Figure 41 : La forme courte de GRAMD4 (S-GRAMD4) pourrait réguler le trafic intracellulaire du TLR9 vers les endosomes de signalisation. 1)** Après que NOGO-B2 ait levé l'inhibition exercée par GRAMD4, les complexes GRAMD4-NOGOB2 et TLR9-UNC93B1 pourraient cheminer vers l'appareil de Golgi puis la membrane plasmique. **2)** Dans le TGN, le prodomaine d'ADAM17 serait clivé par PC1/3 et la furine. Ceci permettrait de générer la forme active d'ADAM17 qui serait adressée vers la surface cellulaire. La néprilysine serait également acheminée au niveau de la membrane plasmique. Notons qu'ADAM17 active et la néprilysine se retrouveraient dans les mêmes microdomaines que les complexes GRAMD4-NOGOB2 et TLR9-UNC93B1. **3)** Toutes ces protéines seraient alors internalisées dans les mêmes endosomes précoces. Dans ceux-ci, ADAM17 cliverait la néprilysine pour générer sa forme soluble. Celle-ci cliverait alors GRAMD-4 afin de conduire à la formation de S-GRAMD4. Ce clivage de GRAMD4 mettrait fin à son interaction avec NOGO-B2 **4)** S-GRAMD4 ainsi libérée inhiberait l'acheminement du TLR9 vers les endosomes de signalisation.

Ainsi, dans ces macrophages, l'activation d'ADAM17 ne serait pas complètement abolie puisque d'autres proprotéines convertases pourraient compenser l'absence de PC1/3. Néanmoins, l'absence de PC1/3 pourrait ralentir et réduire cette activation d'ADAM17. Lors de l'internalisation du complexe protéique, moins de formes solubles de la néprilysine seraient générées et donc moins de S-GRAMD4. Ainsi, elle ne pourrait pas exercer aussi fortement son inhibition sur la translocation du TLR9 vers les endosomes de signalisation. Ceci pourrait également être corrélé avec

l'initiation plus précoce de la voie pro-inflammatoire NF $\kappa$ B qui est observée dans les cellules PC1/3 KD (**Figure 27B**). Néanmoins, nous ne pouvons pas non plus exclure que PC1/3 pourrait réguler le trafic du TLR9 en clivant directement certains partenaires protéiques du récepteur. Par exemple, un site potentiel de clivage pour les proprotéines convertases est présent dans le domaine N-terminal de LRRC59. Cette protéine présente au niveau de la membrane du RE contrôle la sortie du TLR9 de cet organite [141]. Il est donc tentant de spéculer que PC1/3 pourrait réguler le trafic du TLR9 via le clivage de LRRC59. Cependant, ceci reste très incertain puisque le domaine N-terminal de LRRC59 est exposé du côté cytosolique. Il ne serait donc pas accessible pour PC1/3. Par ailleurs, il a été démontré que le cytosquelette joue un rôle crucial dans le trafic du TLR9. En effet, la stabilisation des microtubules par la protéine Ly49Q est indispensable pour permettre la formation du système endolysosomal et ainsi l'adressage correct du TLR9 [115]. Par ailleurs, dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes, une polymérisation de l'actine contrôlée par le complexe ARP2/3 est observée autour des endosomes contenant du CpG-ODN [142]. Celle-ci régule le trafic intracellulaire et la compartimentalisation du CpG-ODN afin de limiter la sécrétion d'IFNs de type I. Dans les cellules PC1/3 KD, plusieurs protéines du complexe ARP2/3 sont détectées avec des taux plus élevés [61]. Il en résulte une désorganisation forte du cytosquelette. Celle-ci pourrait aussi expliquer pourquoi en absence de PC1/3, le trafic intracellulaire du TLR9 est altéré (**Figure 34**) et/ou la voie pro-inflammatoire NF $\kappa$ B préférée (**Figure 27B**). En outre, une abondance plus élevée de protéines impliquées dans la régulation de l'adressage protéique entre le TGN et les endosomes est observée dans les cellules PC1/3 KD [61]. Le trafic vésiculaire serait donc altéré dans ces macrophages. Cela pourrait aussi expliquer pourquoi en absence de PC1/3, une agrégation du TLR9 est observée dans les corps multi-vésiculaires. De façon intéressante, un site de clivage potentiel pour les proprotéines convertases est présent dans la sous-unité beta-2 du complexe AP-3. Elle pourrait donc être un substrat de PC1/3. Or, le complexe AP-3 est indispensable pour maintenir une dynamique endosomale adéquate et ainsi la bonne compartimentalisation du TLR9 [143]. De plus, l'adressage du TLR9 vers les endosomes à partir desquels la signalisation s'effectue via IRF-7 dépend de la protéine adaptatrice 3 (AP-3) [129]. Ceci pourrait donc aussi expliquer comment l'absence de PC1/3 impacte le trafic intracellulaire du TLR9 (**Figure 34**) et/ou l'orienté préférentiellement vers la voie pro-inflammatoire NF $\kappa$ B (**Figure 27B**).

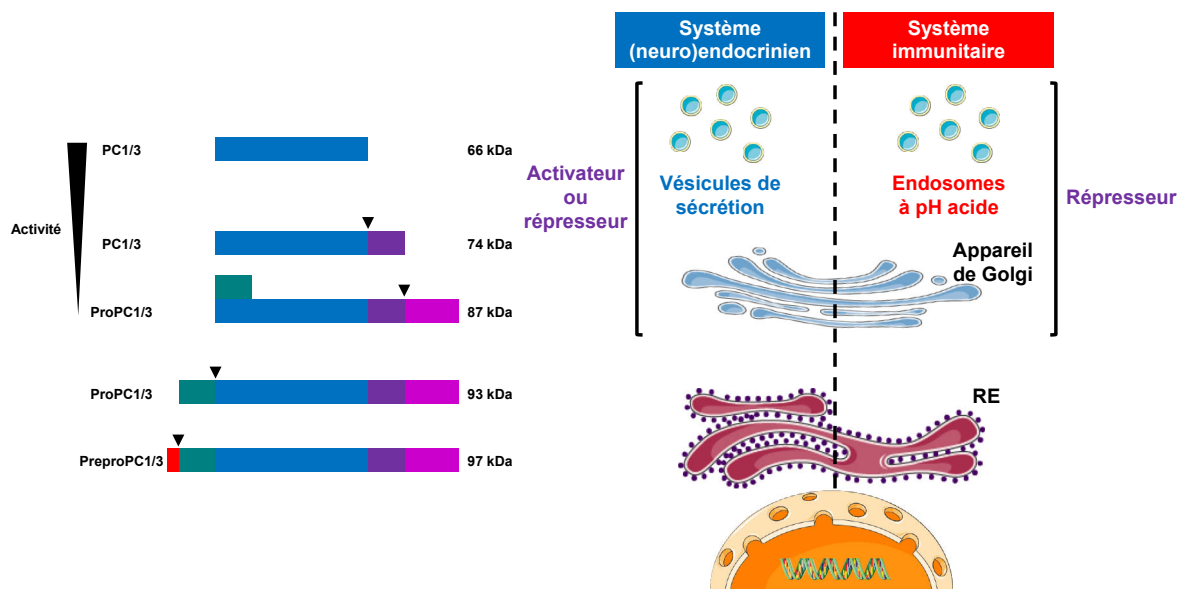
Néanmoins, seule l'identification des substrats de PC1/3 permettra d'élucider les mécanismes par lesquels elle contrôle l'adressage du TLR9 vers les endosomes. Nous proposons un modèle expliquant comment l'absence de PC1/3 pourrait altérer le trafic du TLR9 dans les macrophages (**Figure 42**).



**Figure 42 : Représentation schématique décrivant comment l'invalidation de PC1/3 dans les macrophages impacte la biologie du TLR9.** Les gouttes jaunes dans la membrane plasmique symbolisent que les cellules PC1/3 KD présentent une modification de leur contenu lipidique. Dans ces macrophages, les niveaux protéiques de GRAMD4 et de sa forme courte S-GRAMD4 sont moins élevés suite à 1h de stimulation du TLR9 par du CpG-ODN. Ainsi, au niveau du réticulum endoplasmique, NOGO-B2 pourrait lever plus rapidement l'inhibition exercée par GRAMD4 sur le trafic du TLR9. Dans les endosomes précoces, l'inhibition exercée par S-GRAMD4 sur l'acheminement du TLR9 vers les endosomes de signalisation NFKB serait également réduite. Ceci pourrait expliquer pourquoi en absence de PC1/3, le trafic du TLR9 vers les endosomes serait plus important et l'activation de la voie pro-inflammatoire NFKB plus rapide. La voie anti-inflammatoire STAT-3 est, quant à elle, réprimée. Il en résulte une sécrétion plus importante de cytokines pro-inflammatoires.

## II.5- Conclusion générale.

PC1/3 joue un rôle activateur majeur dans le système (neuro)endocrinien en assurant la maturation de précurseurs de (neuro)peptides. Afin d'être pleinement activée, son zymogène subit plusieurs clivages protéolytiques spécifiques (**Figure 43**). Ceux-ci surviennent lors du cheminement de PC1/3 depuis le réticulum endoplasmique vers les vésicules de sécrétion.



**Figure 43 : Maturation du zymogène PC1/3 en enzyme active dans le système (neuro)endocrinien et dans le système immunitaire.** Les sites de clivages protéolytiques sont indiqués par les triangles noirs.

Cependant, contrairement à ce qui était communément pensé, le rôle de PC1/3 ne se limite pas au SNE. En effet, nos travaux démontrent très clairement qu'elle est également un régulateur majeur de la réponse immunitaire. Dans les macrophages et de façon similaire à ce qui est observé dans les cellules (neuro)endocrines, PC1/3 est maturée en enzyme active lors d'un challenge immunitaire. Cette maturation se fait également par clivages protéolytiques qui ont lieu lors de son trafic intracellulaire. Néanmoins, après son cheminement depuis le RE vers le TGN, PC1/3 n'est pas adressée vers les vésicules de sécrétion mais vers les endosomes présentant un pH acide (**Figure 43**). Ceci est cohérent avec le fait que dans les macrophages, la présence de vésicules de sécrétion est rare [144]. Ainsi, la voie de sécrétion régulée est très peu utilisée au profit de la voie de sécrétion constitutive et de la voie de

sécrétion non-conventionnelle [57,144]. Par ailleurs, dans le SNE, PC1/3 peut être un activateur ou un répresseur de la réponse neuro(endocrine) selon la nature des neuropeptides et pro-hormones qu'elle mature. En revanche, dans le système immunitaire, PC1/3 serait uniquement un inhibiteur de la réponse immunitaire. Pour ce faire, elle restreint le trafic intracellulaire de récepteurs immunitaires clés que sont le TLR4 et le TLR9. En effet, nos résultats montrent que l'inhibition de PC1/3 dans les macrophages conduit à une désensibilisation moins longue du TLR4 et un trafic accru du TLR9. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées afin d'expliquer ces altérations. Premièrement, celles-ci pourraient être liées à une modification du trafic vésiculaire dans les macrophages PC1/3 KD. En effet, ces cellules présentent un remodelage du compartiment endosomal et une abondance plus forte de protéines régulant le trafic vésiculaire entre le réseau trans-golgien et les endosomes. Deuxièmement, cette modification du trafic intracellulaire du TLR4 et du TLR9 pourrait également être la conséquence de la désorganisation du cytosquelette. Troisièmement, ces altérations pourraient être dues à l'impact que l'absence de PC1/3 aurait sur le renouvellement protéique et/ou de façon indirecte le clivage de protéines contrôlant le trafic intracellulaire de ces deux récepteurs. Enfin, nous pouvons également envisager que PC1/3 pourrait aussi cliver des substrats spécifiques régulant l'adressage du TLR4 et du TLR9. Par des analyses bioinformatiques, nous avons identifié des candidats potentiels tels qu'UNC93B1 et GRAMD4. Cependant, nos expériences visant à démontrer leur clivage protéolytique par PC1/3 se sont révélées infructueuses. Ainsi, nous n'avons pas encore pu à ce jour identifier les substrats de PC1/3. Néanmoins, nous ne pouvons pas non plus exclure que la régulation exercée par PC1/3 sur la réponse immunitaire fasse intervenir des modalités différentes. Les mécanismes moléculaires par lesquels elle régule le trafic intracellulaire du TLR4 et du TLR9 restent donc encore à être élucidés.

Nos résultats révèlent qu'en conditions physiologiques, PC1/3 est indispensable pour éviter une réaction immunitaire délétère. En effet, en réfrénant celle-ci, PC1/3 empêche la survenue d'un choc septique. Cette caractéristique et son rôle crucial dans la régulation du trafic intracellulaire du TLR4 et du TLR9 ouvrent des perspectives thérapeutiques importantes. Rappelons par exemple que le TLR9 est impliqué dans le développement de maladies autoimmunes [106,107]. Dans ce contexte, favoriser l'activation de PC1/3 permettrait d'inhiber le trafic du TLR9 et de

réduire ainsi son activation. Au contraire, comme nous avons pu le démontrer, son inhibition est par contre favorable dans la lutte contre des pathologies telles que les cancers. En effet, lors du développement tumoral, les macrophages sont recrutés et orientés vers un phénotype anti-inflammatoire et pro-tumoral. Or, combiner l'inhibition de PC1/3 et l'activation de TLRs permet d'orienter ces cellules vers un phénotype pro-inflammatoire et anti-tumoral. PC1/3 constitue donc une cible thérapeutique de choix.

De par nos travaux, nous avons donc pu démontrer la plasticité fonctionnelle de PC1/3. En revanche, nous n'avons pas encore pu déterminer si dans cette plasticité, PC1/3 utilise ou non les mêmes mécanismes de régulation que dans le SNE à savoir le clivage de substrats protéiques. Ainsi, il est désormais crucial d'identifier ses partenaires protéiques.

## II.6- Perspectives.

Afin de déterminer précisément comment PC1/3 régule la réponse immunitaire des macrophages NR8383, il est désormais nécessaire de caractériser ses substrats et / ou interacteurs protéiques. Rappelons que les extrémités N- et C-terminales de PC1/3 sont indispensables pour sa bonne compartimentation au sein de la cellule [29–31]. Cependant, celles-ci et le domaine P doivent être clivés pour générer la forme pleinement active de PC1/3 (**Figure 3**). Ainsi, transférer les cellules avec un vecteur d'expression permettant de surexprimer la forme complète de PC1/3 en fusion avec une étiquette moléculaire du côté N- ou C-terminal n'est donc pas approprié pour aller rechercher ses partenaires. Une construction permettant de synthétiser une protéine de fusion entre le domaine catalytique de PC1/3 et l'étiquette moléculaire n'est pas non plus souhaitable. En effet, ceci pourrait conduire à une mauvaise compartimentation cellulaire de l'enzyme et ainsi ne pas permettre son interaction avec ses substrats. Par ailleurs, utiliser un anticorps dirigé contre le domaine catalytique de PC1/3 afin d'immunoprécipiter sa forme endogène en interaction avec ses partenaires ne serait pas non plus la meilleure stratégie à adopter. En effet, si PC1/3 agit en clivant des substrats spécifiques, elle interagit avec ceux-ci via son domaine catalytique. L'épitope reconnu pourrait donc ne pas être accessible par l'anticorps utilisé. C'est pourquoi, nous réaliserons la recherche des partenaires de PC1/3 par purification par affinité (**Figure 44**). Pour ce faire, nous utiliserons une protéine recombinante humaine de PC1/3. Celle-ci, disponible chez R&D SYSTEMS, présente le domaine catalytique de l'enzyme fusionné à une étiquette histidine. Elle sera donc immobilisée sur microbilles de chélate métallique de nickel-NTA. Ces billes auxquelles est maintenant liée la protéine recombinante seront ensuite incubées en présence d'extraits protéiques de macrophages NR8383 WT. L'identification des partenaires de PC1/3 sera alors effectuée par une analyse protéomique.

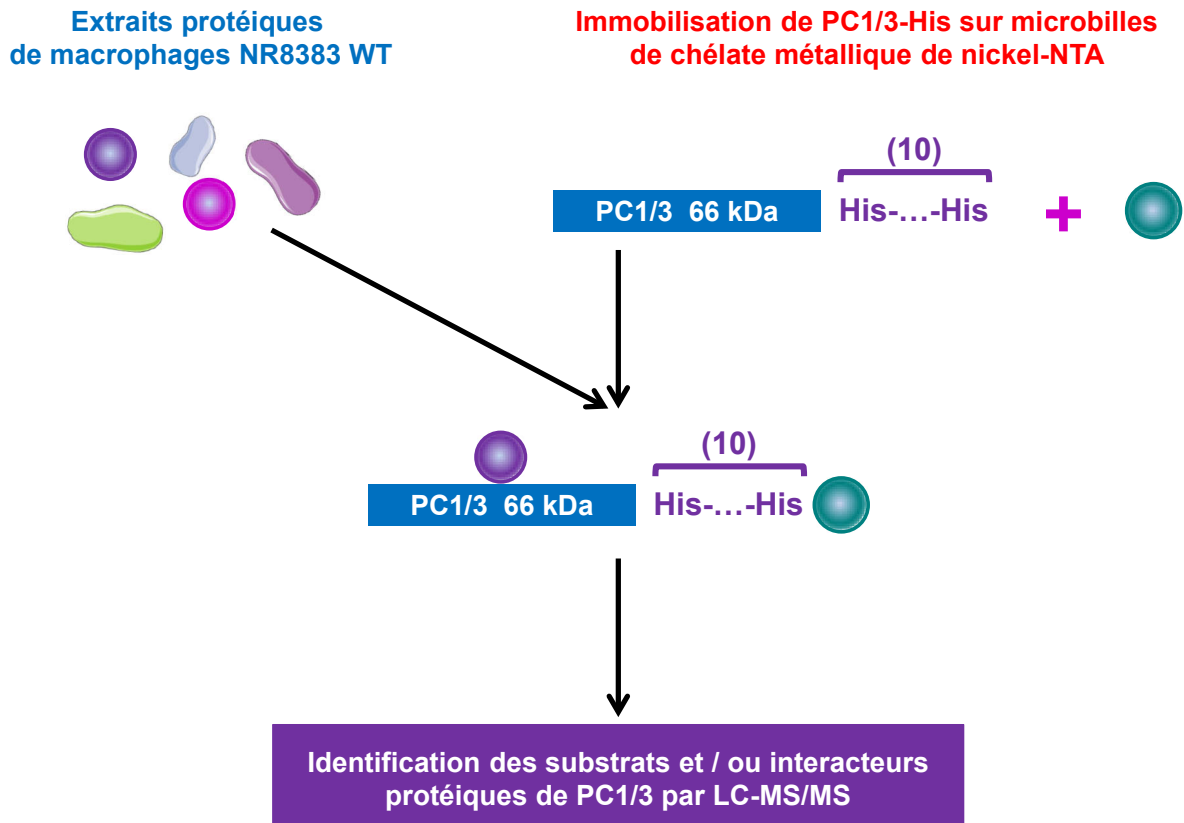
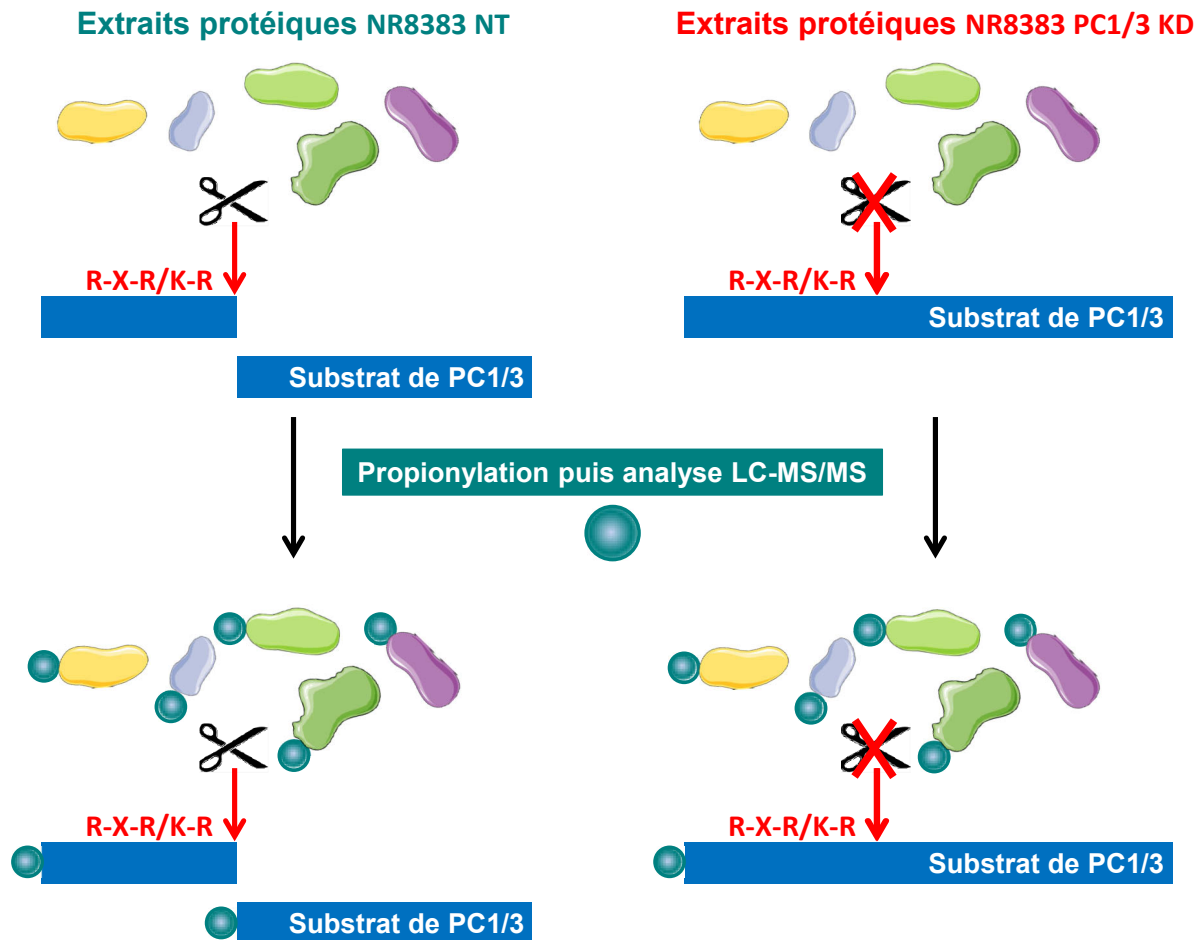


Figure 44 : Recherche des partenaires de PC1/3 par purification par affinité.

En parallèle, la recherche des cibles potentielles de PC1/3 sera également réalisée par une approche de N-terminome (**Figure 45**). Celle-ci consiste à bloquer l'extrémité N-terminale des protéines par une modification chimique détectable par spectrométrie de masse telle qu'une propionylation. Ainsi, suite à son clivage par PC1/3, un substrat présente une nouvelle extrémité N-terminale identifiable après le site de clivage consensus spécifique de l'enzyme. En absence de PC1/3, seule l'extrémité N-terminale native sera observée. La comparaison entre macrophages NR8383 NT et PC1/3 KD permettra ainsi d'identifier de possibles substrats de PC1/3. Bien entendu, cette étude pourra être réalisée suite à une cinétique de stimulation des cellules par du LPS ou du CpG-ODN. Ceci permettra de suivre de façon dynamique l'action de PC1/3. Ces expériences de N-terminome pourront également être menées sur des extraits protéiques des différents organites. Ceux-ci seront obtenus par des fractionnements cellulaires effectués suite à cette cinétique de stimulation. Ceci permettra de déterminer où et quand PC1/3 clive ses différents substrats.





**Figure 45 : Recherche des cibles potentielles de PC1/3 par une approche de N-terminome.** Des extraits protéiques sont réalisés à partir de macrophages NR8383 NT et PC1/3 KD stimulés à différents temps par du LPS ou du CpG-ODN. L'extrémité N-terminale des protéines extraites est alors modifiée par propionylation afin d'être détectable par spectrométrie de masse. Suite à son clivage par PC1/3, un substrat présente une nouvelle extrémité N-terminale identifiable après le site de clivage consensus spécifique de l'enzyme. En absence de PC1/3, seule l'extrémité N-terminale native sera observée.

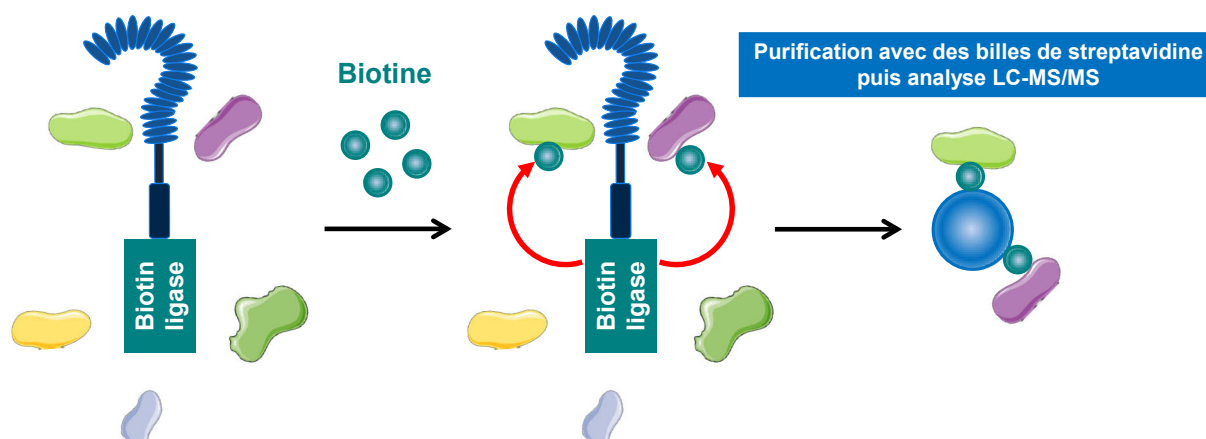
Outre la recherche non ciblée des substrats et / ou interacteurs de PC1/3, l'étude du clivage potentiel des candidats que nous avons identifiés par des analyses bioinformatiques pourra également être menée. Ainsi, des western blots seront réalisés pour estimer le clivable potentiel de TRPM7, ABCA1, ORAI1, LRRC59, de la sous-unité beta-2 du complexe AP-3 et d'ADAM17. S'ils sont des substrats de PC1/3 alors ils seront clivés dans les cellules NT et ce clivage sera altéré dans les cellules PC1/3 KD. En outre, cette méthodologie pourra également être appliquée pour déterminer si une forme soluble de la néprilysine est différemment produite par les macrophages NT et PC1/3 KD.

Par ailleurs, lors des western blots réalisés pour détecter GRAMD4, nous avons observé une bande de 42 kDa. Celle-ci pourrait correspondre à une forme courte de GRAMD4 que nous avons appelée S-GRAMD4. Nos résultats suggèrent que S-GRAMD4 puisse réguler le trafic du TLR9. Il est donc désormais indispensable de vérifier par spectrométrie de masse que la protéine détectée à 42 kDa correspond bien à une forme tronquée de GRAMD4. En outre, la surexpression de S-GRAMD4 en fusion avec une protéine fluorescente révélera sa localisation intracellulaire.

De plus, nous étudierons plus précisément le trafic du TLR4 et du TLR9 par microscopie confocale avec acquisition dans le temps ou après immunofluorescence. Pour ce faire, cette étude sera réalisée sur des cellules NT et PC1/3 KD pour lesquelles les différents organites seront identifiés à l'aide de marqueurs qui leurs sont spécifiques. Cela permettra de déterminer si en absence de PC1/3, le cheminement intracellulaire des deux récepteurs reste qualitativement normal mais accru ou s'il est fondamentalement altéré. Par ailleurs, cela nous permettra de préciser à partir de quel compartiment provient le TLR4 qui est réexprimé à la surface cellulaire.

En outre, le trafic intracellulaire du TLR9 avec UNC93B1 ou GRAMD4 ou S-GRAMD4 ou NOGO-B2 pourra également être suivi. Ceci démontrera tout d'abord si GRAMD4, S-GRAMD4 et NOGO-B2 cheminent avec le TLR9 afin de réguler son adressage vers les endosomes. Par ailleurs, nous avons observé que le trafic du TLR9 est accru dans les cellules PC1/3 KD. Ainsi, ces expériences permettront également de déterminer si en absence de PC1/3, la vitesse et la durée d'association entre le TLR9 et ces protéines sont altérées.

Nous envisageons également de caractériser les interactomes du TLR4 et du TLR9 au cours d'une cinétique de stimulation. Ceci sera entrepris sur les macrophages NT et PC1/3 KD à l'aide de la technique de BioID (**Figure 46**). En effet, celle-ci permet d'identifier des interactions proximales entre protéines. Pour ce faire, la surexpression du TLR4 ou du TLR9 en fusion avec la biotin ligase sera réalisée dans les macrophages. De la biotine sera alors ajoutée au milieu de culture de ces cellules. La biotin ligase en fusion avec le TLR4 ou le TLR9 sera activée par cette biotine, qu'elle liera aux protéines présentes à proximité de ces récepteurs. Les interacteurs ainsi biotinylés seront isolés à l'aide de billes de streptavidine pour être ensuite identifiés par spectrométrie de masse.



**Figure 46 : Etude par BiOID de l'impact de l'inhibition de PC1/3 sur les interactomes du TLR4 et du TLR9.** La surexpression du TLR4 ou du TLR9 en fusion avec la biotin ligase est réalisée dans les macrophages NT et PC1/3 KD. Lors de la stimulation des cellules avec du LPS ou du CpG-ODN, de la biotine est ajoutée au milieu de culture. La biotin ligase en fusion avec le TLR4 ou le TLR9 est activée par cette biotine, qu'elle lie aux protéines présentes à proximité de ces récepteurs. Les interacteurs ainsi biotinylés sont isolés à l'aide de billes de streptavidine pour être ensuite identifiés par spectrométrie de masse.

Ceci permettra de déterminer si l'absence de PC1/3 impacte la nature des interactomes qui se forment lors du trafic du TLR4 et du TLR9. L'effet de son inhibition sur les complexes de signalisation qui s'établissent suite à l'activation des récepteurs sera aussi mis en évidence. Dans le cas des cellules NT, la présence de PC1/3 au sein de ces interactomes pourra également être vérifiée. Ces résultats seront corrélés avec les données obtenues lors de nos analyses de microscopie confocale. Ainsi, nous serons capables de définir où et quand PC1/3 intervient pour réguler le trafic et les voies de transduction du signal associées aux TLRs 4 et 9.

Les travaux réalisés sur les macrophages péritonéaux isolés de souris PC1/3 KO montrent que ceux-ci présentent, tout comme les macrophages PC1/3 KD, une désorganisation forte du système endolysosomal [61] ainsi qu'une altération de leur sécrétion cytokinique [59]. Ceci montre que les macrophages PC1/3 KD sont de bons modèles pour étudier le rôle de PC1/3 dans ce type cellulaire. Nous pourrions donc nous attendre à ce que PC1/3 contrôle de façon similaire le trafic des TLR4 et 9 dans des macrophages péritonéaux isolés de souris PC1/3 KO. Néanmoins, ceci reste également à être démontré.

Notons que les altérations cellulaires et physiologiques que présentent les macrophages PC1/3 KD et ceux isolés de souris PC1/3 KO sont importantes. C'est pourquoi, afin de préciser plus finement le rôle de PC1/3 dans ces macrophages,

nous pourrions réitérer ces travaux mais en remplaçant l'inactivation génique stable par une transitoire. Une stratégie de surexpression d'un dominant négatif touchant le site catalytique de PC1/3 dans des macrophages WT pourrait également être utilisée.

L'ensemble de cette étude permettra de déterminer comment PC1/3 régule la réponse immunitaire des macrophages suite notamment à l'activation du TLR4 et du TLR9. Cela révélera également si dans sa plasticité fonctionnelle, PC1/3 utilise ou non les mêmes mécanismes de régulation que dans le SNE à savoir le clivage de substrats protéiques. De plus, l'identification de ces mécanismes moléculaires pourra conduire à l'établissement de stratégies thérapeutiques efficaces dans le cadre de maladies autoimmunes ou de cancers.

## II.7- Références bibliographiques.

1. Day, R.; Salzet, M. The neuroendocrine phenotype, cellular plasticity, and the search for genetic switches: Redefining the diffuse neuroendocrine system. *Neuroendocrinol. Lett.* **2002**, *23*, 447–451.
2. Salzet, M. Immune Cells Express Endocrine Markers. *Neuroendocrinol. Lett.* **2002**, *23*, 8–9.
3. Gonzalez-Rey, E.; Delgado, M. Anti-inflammatory neuropeptide receptors : new therapeutic targets for immune disorders ? *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**, *28*, 482–491.
4. Tasiemski, A.; Hammad, H.; Vandenbulcke, F.; Breton, C.; Bilfinger, T.J.; Pestel, J.; Salzet, M. Presence of chromogranin-derived antimicrobial peptides in plasma during coronary artery bypass surgery and evidence of an immune origin of these peptides. *Blood* **2002**, *100*, 553–559.
5. Salzet, M.; Tasiemski, A. Involvement of pro-enkephalin-derived peptides in immunity. *Dev. Comp. Immunol.* **2001**, *25*, 177–185.
6. Tanriverdi, F.; Silveira, L.F.G.; Hu, Y.; Maccoll, G.S.; Travers, P.; Bouloux, P.M.G. Expression of Gonadotropin-Releasing Hormone Type-I ( GnRH-I ) and Type-II ( GnRH-II ) in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells ( PMBCs ) and Regulation of B-Lymphoblastoid Cell Proliferation by GnRH-I and GnRH-II. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **2004**, *112*, 587–594.
7. Chen, A; Ganor, Y; Rahimipour, S; Ben-Aroya, N; Koch, Y; Levite, M. The neuropeptides GnRH-II and GnRH-I are produced by human T cells and trigger laminin receptor gene expression , adhesion , chemotaxis and homing to specific organs. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 1421–1426.
8. Seidah, N.G.; Gaspar, L.; Mion, P.; Marcinkiewicz, M.; Mbikay, M.; Chrétien, M. cDNA Sequence of Two Distinct Pituitary Proteins Homologous to Kex2 and Furin Gene Products: Tissue -Specific mRNAs Encoding Candidates for Pro-Hormone Processing Proteinases. *DNA Cell Biol.* **1990**, *9*, 415–424.
9. Seidah, N.G.; Marcinkiewicz, M.; Benjannet, S.; Gaspar, L.; Beaubien, G.; Mattei, M.G.; Lazure, C.; Mbikay, M.; Chretien, M. Cloning and Primary Sequence of a Mouse Candidate Prohormone Convertase PC1 Homologous to PC2 , Furin , and Kex2 Distinct Chromosomal Localization and Messenger RNA Distribution in Brain and Pituitary Compared to PC2. *Mol. Endocrinol.* **1991**, *5*, 111–122.
10. Smeekens, S.P.; Avruch, A.S.; Lamendola, J.; Chan, S.J.; Steiner, D.F. Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 340–344.
11. Seidah, N.G.; Prat, A. The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*, 367–83.

12. Birch, N.P.; Hakes, D.J.; Dixon, J.E.; Mezeys, E. Distribution and Regulation of the Candidate Prohormone Processing Enzymes SPC2 and SPC3 in Adult Rat Brain. *Neuropeptides* **1994**, *27*, 307–322.
13. Day, R.; Schafer, M.K.-H.; Watson, S.J.; Chrétien, M.; Seidah, N.G. Distribution and Regulation of the Prohormone Convertases PC1 and PC2 in the Rat Pituitary. *Mol. Endocrinol.* **1992**, *6*, 485–497.
14. Hosaka, M.; Nagahama, M.; Kim, W.-S.; Watanabe, T.; Hatsuzawa, K.; Ikemizu, J.; Murakami, K.; Nakayama, K. Arg-X-Lys/Arg-Arg Motif as a Signal for Precursor Cleavage Catalyzed by Furin within the Constitutive Secretory Pathway. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 12127–12130.
15. Dey, A.; Norrbom, C.; Zhu, X.; Stein, J.; Zhang, C.; Ueda, K.; Steiner, D.F. Furin and Prohormone Convertase 1/3 Are Major Convertases in the Processing of Mouse Pro-GrowthHormone-Releasing Hormone. *Endocrinology* **2004**, *145*, 1961–1971.
16. Galanopoulou, A.S.; Kent, G.; Rabbani, S.N.; Seidah, N.G.; Pate, Y.C. Heterologous Processing of Prosomatostatin in Constitutive and Regulated Secretory Pathways. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 6041–6049.
17. Breslin, M.B.; Lindberg, I.; Benjannet, S.; Mathis, J.P.; Lazure, C.; Seidah, N.G. Differential Processing of Proenkephalin by Prohormone Convertases 1(3) and 2 and Furin. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 27084–27093.
18. Benjannet, S.; Rondeau, N.; Day, R.; Chrétien, M.; Seidah, N.G. PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 3564–3568.
19. Benjannet, S.; Reudelhuber, T.; Mercure, C.; Rondeau, N.; Chretien, M.; Seidah, N.G. Proprotein Conversion Is Determined by a Multiplicity of Factors Including Convertase Processing , Substrate Specificity , and Intracellular Environment. *J. Biol. Chem.* **1992**, *16*, 11417–11423.
20. Zhu, X.; Cao, Y.; Voodg, K.; Steiner, D.F. On the Processing of Proghrelin to Ghrelin. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 38867–38870.
21. Rehfeld, J.F.; Zhu, X.; Norrbom, C.; Bundgaard, J.R.; Johnsen, A.H.; Nielsen, J.E.; Vikesaa, J.; Stein, J.; Dey, A.; Steiner, D.F.; et al. Prohormone convertases 1/3 and 2 together orchestrate the site-specific cleavages of progastrin to release gastrin-34 and gastrin-17. *Biochem. J.* **2008**, *415*, 35–43.
22. Smeekens, S.P.; Montag, A.G.; Thomas, G.; Albiges-rizo, C.; Carroll, R.; Benig, M.; Phillips, L.A.; Martin, S.; Ohagi, S.; Gardner, P.; et al. Proinsulin processing by the subtilisin-related proprotein convertases furin , PC2 , and PC3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 8822–8826.
23. Rouillé, Y.; Kantengwa, S.; Irminger, J.; Halban, P.A. Role of the Prohormone Convertase PC3 in the Processing of Proglucagon to Glucagon-like Peptide 1 \*. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32810–32816.
24. Creemers, J.W.M.; Jackson, R.S.; Hutton, J.C. Molecular and cellular regulation of prohormone processing. *Semin. Cell Dev. Biol.* **1998**, *9*, 3–10.

25. Tangrea, M.A.; Alexander, P.; Bryan, P.N.; Eisenstein, E.; Toedt, J.; Orban, J. Stability and Global Fold of the Mouse Prohormone Convertase 1 Pro-Domain. *Biochemistry* **2001**, *40*, 5488–5495.
26. Zhou, A.; Martin, S.; Lipkind, G.; Lamendola, J.; Steiner, D.F. Regulatory Roles of the P Domain of the Subtilisin-like Prohormone Convertases. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 11107–11114.
27. Lusson, J.; Benjannet, S.; Hamelin, J.; Savaria, D.; Chrétien, M. The integrity of the RRGDL sequence of the proprotein convertase PC1 is critical for its zymogen and C-terminal processing and for its cellular trafficking. *Biochem. J.* **1997**, *326*, 737–744.
28. Rovère, C.; Luis, J.; Lissitzky, J.; Basak, A.; Marvaldi, J.; Chrétien, M.; Seidah, N.G. The RGD Motif and the C-terminal Segment of Proprotein Convertase 1 Are Critical for Its Cellular Trafficking but Not for Its Intracellular Binding to Integrin  $\alpha 5\beta 1$ . *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 12461–12467.
29. Vindrola, O.; Lindberg, I. Biosynthesis of the Prohormone Convertase mPC1 in AtT-20 Cells. *Mol. Endocrinol.* **1992**, *6*, 1088–1094.
30. Dikeakos, J.D.; Mercure, C.; Lacombe, M.-J.; Seidah, N.G.; Reudelhuber, T.L. PC1/3, PC2 and PC5/6A are targeted to dense core secretory granules by a common mechanism. *FEBS J.* **2007**, *274*, 4094–4102.
31. Lou, H.; Smith, A.M.; Coates, L.C.; Cawley, N.X.; Peng Loh, Y.; Birch, N.P. The transmembrane domain of the prohormone convertase PC3: A key motif for targeting to the regulated secretory pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2007**, *267*, 17–25.
32. Benjannet, S.; Rondeau, N.; Paquet, L.; Boudreault, A.; Lazure, C.; Chrétien, M.; Seidah, N.G. Comparative biosynthesis, covalent post-translational modifications and efficiency of prosegment cleavage of the prohormone convertases PC1 and PC2: glycosylation, sulphation and identification of the intracellular site of prosegment cleavage of PC1 and PC2. *Biochem. J.* **1993**, *294*, 735–743.
33. Zhou, Y.; Lindberg, I. Purification and Characterization of the Prohormone Convertase PC1(PC3). *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 5615–5623.
34. Lindberg, I. Evidence for Cleavage of the PC1/PC3 Pro-Segment in the Endoplasmic Reticulum. *Mol. Cell. Neurosci.* **1994**, *5*, 263–268.
35. Lindberg, I.; Ahn, S.C.; Breslin, M.B. Cellular Distributions of the Prohormone Processing Enzymes PC1 and PC2. *Mol. Cell. Neurosci.* **1994**, *5*, 614–622.
36. Boudreault, A.; Gauthier, D.; Lazure, C. Proprotein Convertase PC1/3-related Peptides Are Potent Slow Tight-binding Inhibitors of Murine PC1/3 and Hfurin. *Journal* **1998**, *273*, 31574–31580.
37. Hornby, P.; Rosenthal, S.; Mathis, J.; Vindrola, O.; Lindberg, I. Immunocytochemical Localization of the Neuropeptide-Synthesizing Enzyme PC1 in AtT-20 Cells. *Neuroendocrinology* **1993**, *58*, 555–563.

38. Zhou, Y.; Lindberg, I. Enzymatic Properties of Carboxyl-terminally Truncated Prohormone Convertase 1 ( PC1/ SPC3 ) and Evidence for Autocatalytic Conversion. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 18408–18413.
39. Tangrea, M.A.; Bryan, P.N.; Sari, N.; Orban, J. Solution Structure of the Prohormone Convertase 1 Pro-domain from *Mus musculus*. *J. Mol. Biol.* **2002**, *320*, 801–812.
40. Vindrola, O.; Lindberg, I. Release of the Prohormone Convertase PC1 from AtT-20 Cells. *Neuropeptides* **1993**, *25*, 151–160.
41. Zhou, Y.; Rovere, C.; Kitabgi, P.; Lindberg, I. Mutational Analysis of PC1 ( SPC3 ) in PC12 Cells. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 24702–24706.
42. Cameron, A.; Fortenberry, Y.; Lindberg, I. The SAAS granin exhibits structural and functional homology to 7B2 and contains a highly potent hexapeptide inhibitor of PC1. *FEBS Lett.* **2000**, *473*, 135–138.
43. Fricker, L.D.; Mckinzie, A.A.; Sun, J.; Curran, E.; Qian, Y.; Yan, L.; Patterson, S.D.; Courchesne, P.L.; Richards, B.; Levin, N.; et al. Identification and Characterization of proSAAS , a Granin-Like Neuroendocrine Peptide Precursor that Inhibits Prohormone Processing. *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 639–648.
44. Qian, Y.; Devi, L.A.; Mzhavia, N.; Munzer, S.; Seidah, N.G.; Fricker, L.D. The C-terminal Region of proSAAS Is a Potent Inhibitor of Prohormone Convertase 1. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 23596–23601.
45. Fortenberry, Y.; Hwang, J.; Apletalina, E. V; Lindberg, I. Functional Characterization of ProSAAS Similarities and differences with 7B2. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 5175–5186.
46. Lee, S.; Prodhomme, E.; Lindberg, I. Prohormone convertase 1 ( PC1 ) processing and sorting: effect of PC1 propeptide and proSAAS. *J. Endocrinol.* **2004**, *182*, 353–364.
47. Zhu, X.; Zhou, A.; Dey, A.; Norrbom, C.; Carroll, R.; Zhang, C.; Laurent, V.; Lindberg, I.; Ugleholdt, R.; Holst, J.J.; et al. Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and multiple neuroendocrine peptide processing defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 10293–10298.
48. O’Rahilly, S.; Gray, H.; Humphreys, P.J.; Krook, A.; Polonsky, K.S.; White, A.; Gibson, S.; Taylor, K.; Carr, C. Brief Report: Impaired processing of prohormones associated with abnormalities of glucose homeostasis and adrenal function. *N. Engl. J. Med.* **1995**, *333*, 1386–1390.
49. Jackson, R.; Creemers, J.; Ohagi, S.; Raffin-Sanson, M.; Sanders, L.; Montague, C.; Hutton, J.; O’Rahilly, S. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat. Genet.* **1997**, *16*, 303–306.
50. Lloyd, R. V; Jin, L.; Qian, X.; Davis, D.H. Analysis of the Chromogranin A Post-Translational Cleavage Product Pancreastatin and the Prohormone Convertases PC2 and PC3 in Normal and Neoplastic Human Pituitaries. *Am. J.*



- Pathol.* **1995**, *146*, 1188–1198.
51. Jin, L.; Kulig, E.; Qian, X.; Scheithauer, B.W.; Young, W.F.; Davis, D.H.; Seidah, N.G.; Chrétien, M.; Lloyd, R. V Distribution and Regulation of Proconvertases PC1 and PC2 in Human Pituitary Adenomas. *Pituitary* **1999**, *1*, 187–196.
  52. Creemers, J.W.M.; Roebroek, A.J.M.; Van de Ven, W.J.M. Expression in human lung tumor cells of the proprotein processing enzyme PC1 / PC3 Cloning and primary sequence of a 5 kb cDNA. *FEBS Lett.* **1992**, *300*, 82–88.
  53. Tomita, T. Immunocytochemical Localization of Prohormone Convertase 1/3 and 2 in Gastrointestinal Carcinoids. *Endocr. Pathol.* **2001**, *12*, 137–145.
  54. Cheng, M.; Watson, P.H.; Paterson, J.A.; Seidah, N.; Chrétien, M.; Shiu, R.P.C. Pro-protein convertase gene expression in human breast cancer. *Int. J. Cancer* **1997**, *71*, 966–971.
  55. LaMendola, J.; Martin, S.K.; Steiner, D.F. Expression of PC3, carboxypeptidase E and enkephalin in human monocyte-derived macrophages as a tool for genetic studies. *FEBS Lett.* **1997**, *404*, 19–22.
  56. Lansac, G.; Dong, W.; Dubois, C.M.; BenLarbi, N.; Afonso, C.; Fournier, I.; Salzet, M.; Day, R. Lipopolysaccharide mediated regulation of neuroendocrine associated proprotein convertases and neuropeptide precursor processing in the rat spleen. *J. Neuroimmunol.* **2006**, *171*, 57–71.
  57. Vindrola, O.; Mayer, A.M.S.; Citera, G.; Spitzer, J.A.; Espinozas, L.R. Prohormone Convertases PC2 and PC3 in Rat Neutrophils and Macrophages. *Neuropeptides* **1994**, *27*, 235–244.
  58. Mousa, S.A.; Shakibaei, M.; Sitte, N.; Schäfer, M.; Stein, C. Subcellular Pathways of  $\beta$ -Endorphin Synthesis, Processing, and Release from Immunocytes in Inflammatory Pain. *Endocrinology* **2004**, *145*, 1331–1341.
  59. Refaie, S.; Gagnon, S.; Gagnon, H.; Desjardins, R.; D'Anjou, F.; D'Orléans-Juste, P.; Zhu, X.; Steiner, D.F.; Seidah, N.G.; Lazure, C.; et al. Disruption of proprotein convertase 1/3 (PC1/3) expression in mice causes innate immune defects and uncontrolled cytokine secretion. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 14703–14717.
  60. Gagnon, H.; Refaie, S.; Gagnon, S.; Desjardins, R.; Salzet, M.; Day, R. Proprotein Convertase 1/3 (PC1/3) in the Rat Alveolar Macrophage Cell Line NR8383: Localization, Trafficking and Effects on Cytokine Secretion. *PLoS One* **2013**, *8*, 1–16.
  61. Duhamel, M.; Rodet, F.; Delhem, N.; Vanden Abeele, F.; Kobeissy, F.; Nataf, S.; Pays, L.; Desjardins, R.; Gagnon, H.; Wisztorski, M.; et al. Molecular Consequences of Proprotein Convertase 1/3 (PC1/3) Inhibition in Macrophages for Application to Cancer Immunotherapy: A Proteomic Study. *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, *14*, 2857–77.
  62. Takenawa, T.; Suetsugu, S. The WASP – WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8*, 37–48.

63. Patel, N.R.; Bole, M.; Chen, C.; Hardin, C.C.; Kho, A.T.; Mih, J.; Deng, L.; Butler, J.; Tschumperlin, D.; Fredberg, J.J.; et al. Cell Elasticity Determines Macrophage Function. *PLoS One* **2012**, *7*, 1–10.
64. Sun, H.Q.; Yamamoto, M.; Mejillano, M.; Yin, H.L. Gelsolin, a Multifunctional Actin Regulatory Protein. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33179–33182.
65. Bonnemaïson, M.L.; Eipper, B.A.; Mains, R.E. Role of adaptor proteins in secretory granule biogenesis and maturation. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2013**, *4*, 1–17.
66. Savina, A.; Furla, M.; Vidal, M.; Colombo, M.I. Exosome Release Is Regulated by a Calcium-dependent Mechanism in K562 Cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 20083–20090.
67. Hutagalung, A.H.; Novick, P.J. Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. *Physiol Rev* **2011**, *91*, 119–149.
68. Lee, K.H.; Jeong, J.; Yoo, C.G. Positive feedback regulation of heat shock protein 70 (Hsp70) is mediated through Toll-like receptor 4-PI3K/Akt-glycogen synthase kinase-3 beta pathway. *Exp. Cell Res.* **2013**, *319*, 88–95.
69. Panther, E.; Thorsten, D.; Ferrari, D.; Di Virgilio, F.; Grimm, M.; Sorichter, S.; Cicko, S.; Herouy, Y.; Norgauer, J.; Idzko, M.; et al. AMP Affects Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signaling, Migration, Cytokine Secretion and T Cell Priming Capacity of Dendritic Cells. *PLoS One* **2012**, *7*, 1–9.
70. Rodet, F.; Capuz, A.; Hara, T.; van Meel, R.; Duhamel, M.; Rose, M.; Raffo-Romero, A.; Fournier, I.; Salzet, M. Deciphering molecular consequences of the proprotein convertase 1/3 inhibition in macrophages for application in anti-tumour immunotherapy. *J. Biotechnol.* **2018**, *282*, 80–85.
71. Franciszkiewicz, K.; Boissonnas, A.; Boutet, M.; Combadière, C.; Mami-Chouaib, F. Role of chemokines and chemokine receptors in shaping the effector phase of the antitumor immune response. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 6325–32.
72. Akira, S.; Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 499–511.
73. Kumar, H.; Kawai, T.; Akira, S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *388*, 621–625.
74. Meng, J.; Lien, E.; Golenbock, D.T. MD-2-mediated Ionic Interactions between Lipid A and TLR4 Are Essential for Receptor Activation. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 8695–8702.
75. O'Neill, L.A.J.; Bowie, A.G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 353–64.
76. Burns, K.; Janssens, S.; Brissoni, B.; Olivos, N.; Beyaert, R.; Tschopp, J. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J. Exp. Med.* **2003**, *197*, 263–8.

77. Brikos, C.; O'Neill, L.A.J. Signalling of toll-like receptors. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2008**, *183*, 21–50.
78. Cole, J.E.; Kassiteridi, C.; Monaco, C. Toll-like receptors in atherosclerosis: a ' Pandora ' s box ' of advances and controversies. *Trends Pharmacol. Sci.* **2013**, *34*, 629–636.
79. Mifsud, E.J.; Tan, A.C.L.; Jackson, D.C. TLR agonists as modulators of the innate immune response and their potential as agents against infectious disease. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 1–10.
80. Husebye, H.; Halaas, Ø.; Stenmark, H.; Tunheim, G.; Sandanger, Ø.; Bogen, B.; Brech, A.; Latz, E.; Espevik, T. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J.* **2006**, *25*, 683–692.
81. Kagan, J.C.; Su, T.; Horng, T.; Chow, A.; Akira, S.; Medzhitov, R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 361–368.
82. Kawai, T.; Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 373–84.
83. Husebye, H.; Aune, M.H.; Stenvik, J.; Samstad, E.; Skjeldal, F.; Halaas, Ø.; Nilsen, N.J.; Stenmark, H.; Latz, E.; Lien, E.; et al. The Rab11a GTPase controls toll-like receptor 4-induced activation of interferon regulatory factor-3 on phagosomes. *Immunity* **2010**, *33*, 583–596.
84. Murtazina, D.A.; Chung, D.; Ulloa, A.; Bryan, E.; Galan, H.L.; Sanborn, B.M. TRPC1, STIM1, and ORAI Influence Signal-Regulated Intracellular and Endoplasmic Reticulum Calcium Dynamics in Human Myometrial Cells1. *Biol. Reprod.* **2011**, *85*, 315–326.
85. Joseph, N.; Reicher, B.; Barda-Saad, M. The calcium feedback loop and T cell activation: How cytoskeleton networks control intracellular calcium flux. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2014**, *1838*, 557–568.
86. Rodet, F.; Capuz, A.; Ozcan, B.-A.; Le Beillan, R.; Raffo-Romero, A.; Kobeissy, F.; Duhamel, M.; Salzet, M. PC1/3 KD Macrophages Exhibit Resistance to the Inhibitory Effect of IL-10 and a Higher TLR4 Activation Rate, Leading to an Anti-Tumoral Phenotype. *cells* **2019**, *8*, 1–19.
87. Bosisio, D.; Polentarutti, N.; Sironi, M.; Bernasconi, S.; Miyake, K.; Webb, G.R.; Martin, M.U.; Mantovani, A.; Muzio, M. Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-γ: A molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood* **2002**, *99*, 3427–3431.
88. Bonin, C.P.; Baccarin, R.Y.A.; Nostell, K.; Nahum, L.A.; Fossum, C.; De Camargo, M.M. Lipopolysaccharide-induced inhibition of transcription of tlr4 in vitro is reversed by dexamethasone and correlates with presence of conserved NFκB binding sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *432*, 256–261.
89. Liaunardy-Jopeace, A.; Gay, N.J. Molecular and cellular regulation of Toll-like

- receptor-4 activity induced by lipopolysaccharide ligands. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 1–5.
90. Ishizuka, E.K.; Filgueiras, L.R.; Rios, F.J.; Serezani, C.H.; Jancar, S. PAFR activation of NF- $\kappa$ B p65 or p105 precursor dictates pro- and anti-inflammatory responses during TLR activation in murine macrophages. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–11.
  91. Harroch, S.; Gothelf, Y.; Revel, M.; Chebath, J. Upstream sequences of MyD88, an IL-6 primary response gene in M1 cells: Detection of functional IRF-1 and stat factors binding sites. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 3539–3546.
  92. Hutchins, A.P.; Diez, D.; Miranda-saavedra, D. The IL-10 / STAT3-mediated anti-inflammatory response : recent developments and future challenges. *Brief. Funct. Genomics* **2013**, *12*, 489–498.
  93. Duhamel, M.; Rose, M.; Rodet, F.; Murgoci, A.-N.; Zografidou, L.; Régnier-Vigouroux, A.; Vanden Abeele, F.; Kobeissy, F.; Nataf, S.; Pays, L.; et al. Paclitaxel treatment and PC1/3 knockdown in macrophages is a promising anti-glioma strategy as revealed by proteomics and cytotoxicity studies. *Mol. Cell. Proteomics* **2018**, *17*, 1126–1143.
  94. Chang, C.-I.; Liao, J.C.; Kuo, L. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **1998**, *274*, 342–348.
  95. Yang, W.S.; Kim, J.J.; Lee, M.J.; Lee, E.K.; Park, S.K. ADAM17-Mediated Ectodomain Shedding of Toll-Like Receptor 4 as a Negative Feedback Regulation in Lipopolysaccharide-Activated Aortic Endothelial Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *45*, 1851–1862.
  96. Srour, N.; Lebel, A.; McMahon, S.; Fournier, I.; Fugère, M.; Day, R.; Dubois, C.M. TACE/ADAM-17 maturation and activation of sheddase activity require proprotein convertase activity. *FEBS Lett.* **2003**, *554*, 275–283.
  97. Duhamel, M.; Rodet, F.; Murgoci, A.N.; Desjardins, R.; Gagnon, H.; Wisztorski, M.; Fournier, I.; Day, R.; Salzet, M. The proprotein convertase PC1/3 regulates TLR9 trafficking and the associated signaling pathways. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–13.
  98. Ullrich, O.; Reinsch, S.; Urbé, S.; Zerial, M.; Parton, R.G. Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J. Cell Biol.* **1996**, *135*, 913–924.
  99. Woodman, P.G.; Futter, C.E. Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2008**, *20*, 408–414.
  100. Granucci, F. The Family of LPS Signal Transducers Increases : the Arrival of Chanzymes. *Immunity* **2018**, *48*, 4–6.
  101. Yvan-Charvet, L.; Welch, C.; Pagler, T.A.; Ranalletta, M.; Lamkanfi, M.; Han, S.; Ishibashi, M.; Li, R.; Wang, N.; Tall, A.R. Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: Free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil

- infiltration of atherosclerotic lesions. *Circulation* **2008**, *118*, 1837–1847.
102. Eylestein, A.; Schmidt, S.; Gu, S.; Yang, W.; Schmid, E.; Schmidt, E.; Alesutan, I.; Szteyn, K.; Regel, I.; Shumilina, E.; et al. Transcription Factor NF- $\kappa$ B Regulates Expression of Pore-forming Ca<sup>2+</sup> Channel Unit , Orai1 , and Its Activator , STIM1 , to Control Ca<sup>2+</sup> Entry and Affect Cellular Functions. **2012**, *287*, 2719–2730.
  103. Hemmi, H.; Takeuchi, O.; Kawai, T.; Kaisho, T.; Sato, S.; Sanjo, H.; Matsumoto, M.; Hoshino, K.; Wagner, H.; Takeda, K.; et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **2000**, *408*, 740–745.
  104. Manoury, B. TLR9 regulation by proteolysis: A friend or a foe. *Eur. J. Immunol.* **2011**, *41*, 2142–2144.
  105. Tabet, K.; Georgel, P.; Janssen, E.; Du, X.; Hoebe, K.; Crozat, K.; Mudd, S.; Shamel, L.; Sovath, S.; Goode, J.; et al. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 3516–3521.
  106. Ewald, S.E.; Barton, G.M. Nucleic acid sensing Toll-like receptors in autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* **2011**, *23*, 3–9.
  107. Lande, R.; Gregorio, J.; Facchinetti, V.; Chatterjee, B.; Wang, Y.; Homey, B.; Liu, Y.; Gilliet, M. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* **2007**, *449*, 564–571.
  108. Prinz, M.; Garbe, F.; Schmidt, H.; Mildner, A.; Gutcher, I.; Wolter, K.; Piesche, M.; Schroers, R.; Weiss, E.; Kirschning, C.J.; et al. Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 456–464.
  109. Franklin, B.S.; Ishizaka, S.T.; Lamphier, M.; Gusovsky, F.; Hansen, H.; Rose, J.; Zheng, W.; Ataíde, M.A.; de Oliveira, R.B.; Golenbock, D.T.; et al. Therapeutical targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 3689–3694.
  110. Ribes, S.; Ebert, S.; Czesnik, D.; Regen, T.; Zeug, A.; Bukowski, S.; Mildner, A.; Eiffert, H.; Hanisch, U.; Hammerschmidt, S.; et al. Toll-Like Receptor Prestimulation Increases Phagocytosis of Escherichia coli DH5a and Escherichia coli K1 Strains by Murine Microglial Cells. *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 557–564.
  111. Ribes, S.; Ebert, S.; Regen, T.; Agarwal, A.; Tauber, S.C.; Czesnik, D.; Spreer, A.; Bunkowski, S.; Eiffert, H.; Hanisch, U.; et al. Toll-Like Receptor Stimulation Enhances Phagocytosis and Intracellular Killing of Nonencapsulated and Encapsulated Streptococcus pneumoniae by Murine Microglia. *Infect. Immun.* **2010**, *78*, 865–871.
  112. Carpentier, A.F.; Xie, J.; Mokhtari, K.; Delattre, J.Y. Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 2469–2473.

113. El Andaloussi, A.; Sonabend, A.M.; Han, Y.; Lesniak, M. Stimulation of TLR9 with CpG ODN Enhances Apoptosis of Glioma and Prolongs the Survival of Mice with Experimental Brain Tumors. *Glia* **2006**, *54*, 526–535.
114. Doi, Y.; Mizuno, T.; Maki, Y.; Jin, S.; Mizoguchi, H.; Ikeyama, M.; Doi, M.; Michikawa, M.; Takeuchi, H.; Suzumura, A. Microglia activated with the toll-like receptor 9 ligand CpG attenuate oligomeric amyloid {beta} neurotoxicity in in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **2009**, *175*, 2121–2132.
115. Yoshizaki, M.; Tazawa, A.; Kasumi, E.; Sasawatari, S.; Itoh, K.; Dohi, T.; Sasazuki, T.; Inaba, K.; Makrigiannis, A.P.; Toyama-Sorimachi, N. Spatiotemporal regulation of intracellular trafficking of Toll-like receptor 9 by an inhibitory receptor, Ly49Q. *Blood* **2009**, *114*, 1518–1527.
116. Barton, G.M.; Kagan, J.C.; Medzhitov, R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat. Immunol.* **2006**, *7*, 49–56.
117. Latz, E.; Schoenemeyer, A.; Visintin, A.; Fitzgerald, K.A.; Monks, B.G.; Knetter, C.F.; Lien, E.; Nilsen, N.J.; Espevik, T.; Golenbock, D.T. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 190–198.
118. Kimura, T.; Endo, S.; Inui, M.; Saitoh, S.-I.; Miyake, K.; Takai, T. Endoplasmic Protein Nogo-B (RTN4-B) Interacts with GRAMD4 and Regulates TLR9-Mediated Innate Immune Responses. *J. Immunol.* **2015**, *194*, 5426–5436.
119. Takahashi, K.; Shibata, T.; Akashi-Takamura, S.; Kiyokawa, T.; Wakabayashi, Y.; Tanimura, N.; Kobayashi, T.; Matsumoto, F.; Fukui, R.; Kouro, T.; et al. A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses. *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 2963–2976.
120. Yang, Y.; Liu, B.; Dai, J.; Srivastava, P.K.; Zammit, D.J.; Lefrançois, L.; Li, Z. Heat Shock Protein gp96 Is a Master Chaperone for Toll-like Receptors and Is Important in the Innate Function of Macrophages. *Immunity* **2007**, *26*, 215–226.
121. Wu, J.; Kuo, C. Immunity ADP-Ribosylation Factor 3 Mediates Cytidine-Induced Responses by Regulating Toll-Like Receptor 9 Trafficking. *J. Innate Immun.* **2015**, *7*, 623–636.
122. Ivanov, S.; Dragoi, A.M.; Wang, X.; Dallacosta, C.; Louten, J.; Musco, G.; Sitia, G.; Yap, G.S.; Wan, Y.; Biron, C.A.; et al. A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood* **2007**, *110*, 1970–1981.
123. Khan, N.S.; Lukason, D.P.; Feliu, M.; Ward, R.A.; Lord, A.K.; Reedy, J.L.; Ramirez-ortiz, Z.G.; Tam, J.M.; Kasperkovitz, P. V.; Negoro, P.E.; et al. CD82 controls CpG-dependent TLR9 signaling. *FASEB J.* **2019**, *33*, 12500–12514.
124. Brinkmann, M.M.; Spooner, E.; Hoebe, K.; Beutler, B.; Ploegh, H.L.; Kim, Y. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J. Cell Biol.* **2007**, *177*, 265–275.
125. Kim, Y.-M.; Brinkmann, M.M.; Paquet, M.-E.; Ploegh, H.L. UNC93B1 delivers

- nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* **2008**, *452*, 234–239.
126. Pelka, K.; Bertheloot, D.; Reimer, E.; Phulphagar, K.; Schmidt, S. V; Christ, A.; Stahl, R.; Watson, N.; Miyake, K.; Hacoen, N.; et al. The chaperone UNC93B1 regulates toll-like receptor stability independent of endosomal TLR transport. *Immunity* **2018**, *48*, 911–922.
  127. Lee, B.L.; Moon, J.E.; Shu, J.H.; Yuan, L.; Newman, Z.R.; Schekman, R.; Barton, G.M. UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs. *Elife* **2013**, *2*, 1–22.
  128. Majer, O.; Liu, B.; Woo, B.J.; Kreuk, L.S.; Van Dis, E.; Barton, G.M. *Release from Unc93b1 reinforces the compartmentalized activation of select TLRs*; **2019**; 575(7782), 371-374.
  129. Sasai, M.; Linehan, M.M.; Iwasaki, A. Bifurcation of Toll-Like Receptor 9 Signaling by Adaptor Protein 3. *Science (80-. )*. **2010**, *329*, 1530–1534.
  130. Chockalingam, A.; Rose II, W.A.; Hasan, M.; Ju, C.; Leifer, C.A. Cutting Edge: A TLR9 Cytoplasmic Tyrosine Motif Is Selectively Required for Proinflammatory Cytokine Production. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 527–530.
  131. Leifer, C.A.; Brooks, J.C.; Hoelzer, K.; Lopez, J.; Kennedy, M.N.; Mazzoni, A.; Segal, D.M. Cytoplasmic targeting motifs control localization of Toll-like Receptor 9. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 35585–35592.
  132. Kortylewski, M.; Kujawski, M.; Herrmann, A.; Yang, C.; Wang, L.; Liu, Y.; Salcedo, R.; Yu, H. Toll-like receptor 9 activation of signal transducer and activator of transcription 3 constrains its agonist-based immunotherapy. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 2497–505.
  133. St Germain, C.; Croissandeau, G.; Mayne, J.; Baltz, J.M.; Chrétien, M.; Mbikay, M. Expression and Transient Nuclear Translocation of Proprotein Convertase 1 ( PC1 ) During Mouse Preimplantation Embryonic Development. *Mol. Reprod. Dev.* **2005**, *72*, 483–493.
  134. Hipp, M.M.; Shepherd, D.; Gileadi, U.; Aichinger, M.C.; Kessler, B.M.; Edelmann, M.J. Processing of Human Toll-like Receptor 7 by Furin-like Proprotein Convertases Is Required for Its Accumulation and Activity in Endosomes. *Immunity* **2013**, *39*, 711–721.
  135. Ishii, N.; Funami, K.; Tatematsu, M.; Seya, T.; Matsumoto, M. Endosomal Localization of TLR8 Confers Distinctive Proteolytic Processing on Human Myeloid Cells. *J. Immunol.* **2014**, *193*, 5118–5128.
  136. Kuruppu, S.; Rajapakse, N.W.; Minond, D.; Smith, A.I. Production of soluble Nephilysin by endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *446*, 423–427.
  137. Liu, Y.; Vidensky, S.; Ruggiero, A.M.; Maier, S.; Sitte, H.H.; Rothstein, J.D. Reticulon RTN2B Regulates Trafficking and Function of Neuronal Glutamate Transporter EAAC1. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 6561–6571.

138. Wakana, Y.; Koyama, S.; Nakajima, K.; Hatsuzawa, K.; Nagahama, M.; Tani, K.; Hauri, H.-P.; Melançon, P.; Tagaya, M. Reticulon 3 is involved in membrane trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *334*, 1198–1205.
139. Lee, H.Y.; Bowen, C.H.; Popescu, G.V.; Kang, H.-G.; Kato, N.; Ma, S.; Dineshkumar, S.; Snyder, M.; Popescu, S.C. Arabidopsis RTNLB1 and RTNLB2 Reticulon-Like Proteins Regulate Intracellular Trafficking and Activity of the FLS2 Immune Receptor. *Plant Cell* **2011**, *23*, 3374–3391.
140. Minciocchi, V.R.; Freeman, M.R.; Di Vizio, D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Sem. Cell Dev. Biol.* **2015**, *40*, 41–51.
141. Tatematsu, M.; Funami, K.; Ishii, N.; Seya, T.; Obuse, C.; Matsumoto, M. LRRC59 Regulates Trafficking of Nucleic Acid Sensing TLRs from the Endoplasmic Reticulum via Association with UNC93B1. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 4933–4942.
142. Prete, F.; Catucci, M.; Labrada, M.; Gobessi, S.; Castiello, M.C.; Bonomi, E.; Aiuti, A.; Vermi, W.; Cancrini, C.; Metin, A.; et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein – mediated actin dynamics control type-I interferon production in plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 355–374.
143. Combes, A.; Camosseto, V.; Guessan, P.N.; Argüello, R.J.; Mussard, J.; Caux, C.; Bendriss-vermare, N.; Pierre, P.; Gatti, E. BAD-LAMP controls TLR9 trafficking and signalling in human plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1–18.
144. Murray, R.Z.; Stow, J.L. Cytokine secretion in macrophages: SNAREs , Rabs , and membrane trafficking. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 1–9.



## *Partie III*

# *Activité d'encadrement développée*

## Co-encadrant de 3 Thèses.

### I- Doctorat de Madame Mélanie Rose.

**Thèse soutenue à Lille le 25/09/2020.**

Directeur de Thèse : Pr. Michel Salzet.

MACBETH : MACrophages BoostEd THERapy. Stratégie de réactivation des macrophages au sein de la tumeur via l'inhibition de proprotéines convertases et la stimulation de TLRs.

Au cours de ce doctorat, une stratégie thérapeutique permettant de réorienter les macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire et anti-tumoral a été testée. Pour ce faire, l'inhibition de proprotéines convertases a été entreprise à l'aide d'un inhibiteur commercial. Celle-ci réduit considérablement la viabilité et l'invasion de cellules de gliome cultivées en présence de macrophages. En plus de son activité anti-tumorale directe, cet inhibiteur diminue la capacité immunosuppressive des cellules cancéreuses ainsi que les fonctions pro-tumorales des macrophages. Par ailleurs, un traitement avec des ligands du TLR4 et du TLR3 complète l'effet de l'inhibition de proprotéines convertases. Cette stratégie est donc prometteuse pour la reprogrammation des macrophages dans le cadre d'une nouvelle stratégie thérapeutique contre les gliomes.

Ce travail a donné lieu à 3 publications et 2 revues :

**P1-** Rose M, Duhamel M, Aboulouard S, Kobeissy F, Tierny D, Fournier I, **Rodet F**, Salzet M. (2022) Therapeutic anti-glioma effect of the combined action of PCSK inhibitor with the anti-tumoral factors secreted by Poly (I:C)-stimulated macrophages. Cancer Gene Ther. 2021 Jan 5. doi: 10.1038/s41417-020-00286-1.

**P2-** Rose M, Duhamel M, Aboulouard S, Kobeissy F, Le Rhun E, Desmons A, Tierny D, Fournier I, **Rodet F**, Salzet M. (2020) The Role of a Proprotein Convertase

Inhibitor in Reactivation of Tumor-Associated Macrophages and Inhibition of Glioma Growth. *Mol Ther Oncolytics*. 2020 Mar 31;17:31-46.

**P3-** Duhamel M, Rose M, **Rodet F**, Murgoci AN, Zografidou L, Régnier-Vigouroux A, Vanden Abeele F, Kobeissy F, Nataf S, Pays L, Wisztorski M, Cizkova D, Fournier I, Salzet M. (2018) Paclitaxel treatment and PC1/3 knockdown in macrophages is a promising anti-glioma strategy as revealed by proteomics and cytotoxicity studies. *Mol Cell Proteomics*. 2018 Jun;17(6):1126-1143.

**R1-** Rose M, Duhamel M, **Rodet F**, Salzet M (2021) The Role of Proprotein Convertases in the Regulation of the Function of Immune Cells in the Oncoimmune Response. *frontiers in Immunology* Volume 12 – Article 667850.

**R2-** **Rodet F**, Capuz A, Hara T, van Meel R, Duhamel M, Rose M, Raffo Romero A, Fournier I, Salzet M (2018) Deciphering Molecular Consequences of the Proprotein Convertase 1/3 Inhibition in Macrophages for Application in Anti-tumour Immunotherapy. *Journal of Biotechnology* 282 :80-85.

## **II- Doctorat de Madame Alice Capuz.**

### **Actuellement en 3ème année de Thèse**

Directeur de Thèse : Pr. Michel Salzet.

Les cellules neurales produisent elles de véritables anticorps ? (NOBODY)

La capacité à produire des anticorps (Ac) était considérée comme l'apanage des lymphocytes B (LB). Cependant, de nos jours, de plus en plus d'études renforcent progressivement l'idée que d'autres types cellulaires pourraient également en produire. L'étude protéomique spatio-temporelle réalisée par le laboratoire chez le rat suite à une lésion de la moelle épinière soutient pleinement cette hypothèse. En effet, celle-ci a montré que les sécrétomes issus de cultures organotypiques de différents segments de moelle épinière lésée contiennent des immunoglobulines

Gamma (IgG), d'isotypes IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG2c et ce, dès 12h après lésion. Or, lors d'une réponse adaptative conventionnelle, la production d'IgG par les lymphocytes B nécessite 7 à 8 jours. Les expériences d'immunofluorescence et de transcriptomique réalisées ont permis de montrer que ces IgG sont produites par les astrocytes.

Ce projet est soutenu par un financement de l'I-SITE Sustain Université Lille Nord Europe.

### **III- Doctorat de Monsieur Sylvain Osien.**

**Actuellement en 3ème année de Thèse**

Directeur de Thèse : Pr. Michel Salzet.

Modification du phénotype cellulaire des astrocytes en neurones par inhibition de la protéine Heimdall dans un but thérapeutique de neurogenèse. (HEIMDALL).

Lors d'une étude protéomique spatio-temporelle réalisée chez le rat suite à une lésion de la moelle épinière, le laboratoire a identifié une protéine alternative qui est plus abondante à 12 h après la lésion au niveau du site de lésion. Cette protéine décrite par transcriptomique et identifiée par analyse Protéomique présente un domaine commun aux immunoglobulines. Celle-ci a été dénommée Heimdall. Par immunofluorescence et PCR, son origine astrocytaire a pu être démontrée. Par ailleurs, son inhibition dans ces cellules conduit à un changement de phénotype des astrocytes vers un phénotype présentant des caractéristiques neuronales.

Ce projet est soutenu par un financement Start-AIRR Région Hauts-De-France.

## **Encadrement de stagiaires de Master 2.**

### **I- Madame Fruit Malory. Co-encadrement avec le Pr. Christophe Lefebvre.**

Master 2<sup>ème</sup> année, Mention Biologie – Santé.

Année universitaire 2021-2022.

Influence of mammary tumor extracellular vesicles on the microglial response in the development of brain metastases.

### **II- Madame Pigache Justine. Co-encadrement avec le Pr. Christophe Lefebvre.**

Master « Bioinformatique », Parcours « Omics and Systems Biology ».

Année universitaire 2020-2021.

Quels sont les événements précoces associés aux métastases cérébrales ? Étude du dialogue entre les cellules tumorales du sein et la microglie.

### **III- Madame Capuz Alice. Co-encadrement avec le Pr. Michel Salzet.**

Master Biotechnologie-Protéomique. Université de Lille.

Année universitaire 2018-2019.

Mise en évidence de l'expression des gènes codant des immunoglobulines de type chaînes lourdes et légères dans les astrocytes.

### **IV- Madame Ozcan Bilgehan Aybike. Co-encadrement avec le Pr. Michel Salzet.**

Master Biotechnologie-Protéomique. Université de Lille.

Année universitaire 2018-2019.

Etude de la mémoire épigénétique des macrophages PC1/3 KD dans le cas du gliome.

Les travaux réalisés durant ce stage ont été publiés dans les articles :

**1-** Cardon T, **Ozcan B**, Aboulouard S, Kobeissy F, Duhamel M, **Rodet F**, Fournier I, Salzet M. (2020) Epigenetic Studies Revealed a Ghost Proteome in PC1/3 KD Macrophages under Antitumoral Resistance Induced by IL-10. ACS Omega. 2020, 5, 43, 27774-27782.

**2- Rodet F**, Capuz A, **Ozcan BA**, Le Beillan R, Raffo-Romero A, Kobeissy F, Duhamel M, Salzet M. (2019) PC1/3 KD Macrophages Exhibit Resistance to the Inhibitory Effect of IL-10 and a Higher TLR4 Activation Rate, Leading to an Anti-Tumoral Phenotype. Cells. 2019 Nov 22;8(12):1490.

#### **V- Monsieur Le Beillan Rémy.**

Master Recherche Biologie-Santé. Université de Lille.

Année universitaire 2017-2018.

Caractérisation des mécanismes moléculaires par lesquels PC1/3 régule la biologie du TLR4 et les voies de signalisation associées.

Les travaux réalisés durant ce stage ont été publiés dans l'article : **Rodet F**, Capuz A, Ozcan BA, **Le Beillan R**, Raffo-Romero A, Kobeissy F, Duhamel M, Salzet M. (2019) PC1/3 KD Macrophages Exhibit Resistance to the Inhibitory Effect of IL-10 and a Higher TLR4 Activation Rate, Leading to an Anti-Tumoral Phenotype. Cells. 2019 Nov 22;8(12):1490.

#### **VI- Madame Khamari Dela. Co-encadrement avec le Dr. Julien Franck.**

Master Biotechnologie-Protéomique. Université de Lille 1.

Année universitaire 2016-2017.

Projet TAG-MASS : Développement d'un nouvel outil pour le diagnostic permettant la détection de marqueurs biologiques de pathologies par spectrométrie de masse (MS).

#### **VII- Madame Azzi Houria. Co-encadrement avec le Dr. Julien Franck.**

Master Sciences & Technologies. Mention : Biologie moléculaire et cellulaire.  
Parcours : Biochimie et Biologie Moléculaire. Université P. & M. CURIE – PARIS 6.

Année universitaire 2016-2017.

Identification des cibles potentielles de PC1/3 impliquées dans la régulation du trafic du TLR9 par une approche de N-terminome (TAILS).

#### **VIII- Monsieur Hara Tsukasa.**

Double diplôme Master Biotechnologie-Protéomique. Université de Lille 1-Université de Tokyo. Programme EURON.

Année universitaire 2016-2017.

PC1/3 depletion in macrophages altered UNC93B1 and MYD88 biosynthesis: A potential way to control TLRs signalling and protect macrophages from apoptosis.

Les travaux réalisés durant ce stage ont été publiés comme des résultats originaux dans la revue : Rodet F, Capuz A, Hara T, van Meel R, Duhamel M, Rose M, Raffo Romero A, Fournier I, Salzet M (2018) Deciphering Molecular Consequences of the Proprotein Convertase 1/3 Inhibition in Macrophages for Application in Anti-tumour Immunotherapy. Journal of Biotechnology 282 :80-85.

#### **IX- Monsieur van Meel Rinaldo.**

Master of Science. Maastricht University. The Netherlands, Maastricht Faculty of Health, and Life Sciences. Biomedical Sciences.

Année universitaire 2016-2017.

Proprotein convertase 1/3 may regulate Toll-Like Receptor 9 trafficking through UNC93B1 and GRAMD4.

Les travaux réalisés durant ce stage ont été publiés comme des résultats originaux dans la revue : **Rodet F**, Capuz A, Hara T, **van Meel R**, Duhamel M, Rose M, Raffo Romero A, Fournier I, Salzet M (2018) Deciphering Molecular Consequences of the Proprotein Convertase 1/3 Inhibition in Macrophages for Application in Anti-tumour Immunotherapy. Journal of Biotechnology 282 :80-85.

### **X- Madame Murgoci Adriana-Natalia.**

Master 2 Génomique et Protéomique, parcours Protéomique. Université de Lille 1.

Année universitaire 2013-2014.

Caractérisation du récepteur TLR9 et de la prohormone convertase PC1/3 dans les cellules microgliales humaines CHME3. Etude de leur localisation intracellulaire.

### **XI- Madame Vuillaume Cassandre.**

Master 2 Génomique et Protéomique, parcours Protéomique. Université de Lille 1.

Année universitaire 2010-2011.

Implication de deux adaptateurs à domaine TIR, Hm-MyD88 et Hm-SARM, dans la réponse immunitaire et la régénération du système nerveux central de la sangsue médicinale.

Les travaux réalisés durant ce stage ont été publiés dans l'article : **Rodet F**, Tasiemski A, Boidin-Wichlacz C, Van Camp C, **Vuillaume C**, Slomianny C, Salzet M. (2015) Hm-MyD88 and Hm-SARM: two key regulators of the neuroimmune system and neural repair in the medicinal leech. Sci Rep. 2015 Apr 16;5:9624.



## Encadrement de stagiaires de Master 1.

### I- Madame Vizeneux Amélie. Co-encadrement avec le Pr. Christophe Lefebvre.

Master 1 Mention « Biotechnologies ». Université Lille 1.

Année universitaire 2016-2017.

Mise au point d'outils moléculaires permettant d'étudier le rôle de PC1/3 comme régulateur clé du trafic intracellulaire du TLR9 et des voies de signalisation associées.

### II- Madame Capuz Alice.

Master Biologie-Santé, Parcours Biologie Cellulaire. Université Lille 1.

Année universitaire 2016-2017.

La proprotéine convertase 1/3 contrôlerait le trafic intracellulaire du TLR9 et l'activation de la voie de signalisation associée en régulant la biosynthèse de GRAMD4 et MYD88.

Les travaux réalisés durant ce stage ont été publiés comme des résultats originaux dans la revue : Rodet F, Capuz A, Hara T, van Meel R, Duhamel M, Rose M, Raffo Romero A, Fournier I, Salzet M (2018) Deciphering Molecular Consequences of the Proprotein Convertase 1/3 Inhibition in Macrophages for Application in Anti-tumour Immunotherapy. Journal of Biotechnology 282 :80-85.

### **Encadrement d'une stagiaire de DUT.**

#### **Madame Meziani Anaïs.**

DUT Génie Biologique option Analyses Biochimiques et Biologiques. IUT Bobigny-  
Université Paris 13.

Année universitaire 2014-2015.

Mise au point d'outils moléculaires pour étudier le trafic intracellulaire du récepteur  
TLR4 dans les macrophages et les voies de signalisations associées.

### **Encadrement d'une étudiante en ostéopathie.**

#### **Madame Holtzmann Elodie.**

Collège Ostéopathique Sutherland IDF.

Année universitaire 2013-2014.

Apport des techniques de relaxation et de visualisation au traitement crânio-sacré.

*Partie IV*

*Liste et tirés à part des  
publications significatives*

## Articles dans des revues internationales à comité de lecture

**1- Rodet F**, Capuz A, Ozcan BA, Le Beillan R, Raffo-Romero A, Kobeissy F, Duhamel M, Salzet M. (2019) PC1/3 KD Macrophages Exhibit Resistance to the Inhibitory Effect of IL-10 and a Higher TLR4 Activation Rate, Leading to an Anti-Tumoral Phenotype. *Cells*. 2019 Nov 22;8(12):1490.

### Auteur Co-correspondant

**2- Duhamel M, Rose M, Rodet F**, Murgoci AN, Zografidou L, Régnier-Vigouroux A, Vanden Abeele F, Kobeissy F, Nataf S, Pays L, Wisztorski M, Cizkova D, Fournier I, Salzet M. (2018) Paclitaxel treatment and PC1/3 knockdown in macrophages is a promising anti-glioma strategy as revealed by proteomics and cytotoxicity studies. *Mol Cell Proteomics*. 2018 Jun;17(6):1126-1143.

**3- Rodet F\***, Duhamel M\*, Murgoci AN, Desjardins R, Gagnon H, Wisztorski M, Fournier I, Day R, Salzet M. (2016) The proprotein convertase PC1/3 regulates TLR9 trafficking and the associated signaling pathways. *Sci Rep*. 2016 Jan 18;6:19360. (\* co-premier)

**4- Duhamel M, Rodet F**, Delhem N, Vanden Abeele F, Kobeissy F, Nataf S, Pays L, Desjardins R, Gagnon H, Wisztorski M, Fournier I, Day R, Salzet M. (2015) Molecular Consequences of Proprotein Convertase 1/3 (PC1/3) Inhibition in Macrophages for Application to Cancer Immunotherapy: A Proteomic Study. *Mol Cell Proteomics*. 2015 Nov;14(11):2857-77.

## Revue dans des revues internationales à comité de lecture

**Rodet F**, Capuz A, Hara T, van Meel R, Duhamel M, Rose M, Raffo Romero A, Fournier I, Salzet M (2018) Deciphering Molecular Consequences of the Proprotein Convertase 1/3 Inhibition in Macrophages for Application in Anti-tumour Immunotherapy. *Journal of Biotechnology* 282 :80-85.

### Auteur Correspondant

## Résumé

Alors que des cellules comme les cellules immunitaires étaient auparavant considérées comme différenciées de façon irrévocable, celles-ci peuvent en réalité présenter une plasticité phénotypique. En effet, elles peuvent présenter un phénotype neuroendocrinien partiel ou complet caractérisé par l'expression de marqueurs spécifiques tels que la proprotéine convertase 1/3 (PC1/3). Ainsi, cette enzyme clé du système neuroendocrinien s'avère également être un régulateur majeur de la réponse immunitaire. Au sein du système immunitaire, PC1/3 est exprimée dans les macrophages et elle inhibe la réponse immunitaire afin d'éviter un choc septique. Nous avons donc décidé de décrypter les mécanismes moléculaires qu'elle régule au sein des macrophages. Nous avons pu montrer que les macrophages pour lesquels l'inactivation génique de PC1/3 (PC1/3 KD) a été réalisée présentent des réarrangements du cytosquelette. Ceux-ci sont corrélés à une dérégulation de l'homéostasie calcique. En absence de PC1/3, ces cellules présentent également un remodelage du compartiment endosomal. Il en résulte une sécrétion spontanée plus importante de cytokines pro-inflammatoires. Ceci indique que l'inhibition de PC1/3 dans les macrophages les oriente vers un phénotype pro-inflammatoire. Notons qu'un traitement par du LPS, le ligand du TLR4, intensifie ces changements moléculaires. Suite à cette stimulation, les macrophages PC1/3 KD libèrent des chimiokines capables d'attirer les lymphocytes T CD4+ naïfs humains. Ils sécrètent également des facteurs anti-tumoraux actifs contre des lignées de cellules cancéreuses humaines du sein (SKBR3) et de l'ovaire (SKOV3). Compte tenu de cet effet du LPS, nous avons ensuite cherché à déterminer comment l'absence de PC1/3 impacte la biologie du TLR4. Nous avons pu montrer que dans les macrophages PC1/3 KD, le trafic du TLR4 est altéré. De ce fait, suite à son internalisation, le TLR4 est plus rapidement réexprimé à la surface cellulaire de ces cellules. Il en résulte une activation prolongée de la voie dépendante de MYD88 et ainsi de la voie pro-inflammatoire NFκB. En revanche, les macrophages PC1/3 KD résistent à l'effet inhibiteur de l'IL-10 et présentent une inhibition de la voie anti-inflammatoire associée STAT3. En outre, l'impact de l'inhibition de PC1/3 dans les macrophages ne se limite pas au TLR4 puisque la biologie du récepteur endosomal TLR9 est également altérée dans ces macrophages. En effet, dans les macrophages PC1/3 KD, le trafic du TLR9 est accru et celui-ci s'agrège dans les corps multi-vésiculaires. Il en résulte une activation plus précoce de la voie pro-inflammatoire NFκB et ainsi une libération plus importante de cytokines pro-inflammatoires. Cette altération du trafic du TLR9 pourrait être liée à une diminution des taux protéiques de GRAMD4, protéine connue pour inhiber le cheminement intracellulaire de ce récepteur. Ainsi, PC1/3 inhibe la réponse immunitaire en régulant le trafic intracellulaire du TLR4 et du TLR9. Son activation pourrait donc être favorable dans le cas des maladies autoimmunes dans lesquelles le TLR9 est impliqué. Au contraire, son inhibition combinée à l'activation de TLRs pourrait être une stratégie anti-tumorale efficace en permettant l'orientation des macrophages ayant infiltré la tumeur vers un phénotype pro-inflammatoire et anti-tumoral.

## Abstract

Cells such as immune cells were previously considered to be irrevocably differentiated. However, their phenotypic plasticity has already been observed. Indeed, when appropriately stimulated, they can display a partial or full neuroendocrine phenotype characterized by the expression of specific markers such as proprotein convertase 1/3 (PC1/3). This key enzyme of the neuroendocrine system has also been found to be a major regulator of the immune response. Within the immune system, PC1/3 is expressed in macrophages and inhibits the immune response to prevent septic shock. Therefore, we decided to decipher the molecular mechanisms regulated by PC1/3 in macrophages. Down-regulation of PC1/3 (PC1/3 KD) in these cells impacted cytoskeleton organization. This perturbation was correlated with a deregulation of calcium homeostasis. In the absence of PC1/3, these cells also displayed a remodelling of the endosomal compartment. As a result, PC1/3 KD macrophages spontaneously released pro-inflammatory cytokines. This indicated that inhibition of PC1/3 in macrophages oriented them towards a pro-inflammatory phenotype. It is noteworthy that a treatment with LPS, the TLR4 ligand, intensified these molecular changes. Following this stimulation, PC1/3 KD macrophages released chemokines recruiting naïve T helper lymphocytes (CD4+). They also secreted anti-tumor factors active against human breast (SKBR3) and ovarian (SKOV3) cancer cell lines. Since stronger effects were registered in PC1/3-KD cells after LPS challenge, we suspected that PC1/3 may regulate the biology of TLR4. We demonstrated that intracellular trafficking of TLR4 was altered in PC1/3 KD cells. As a result, these macrophages treated with LPS showed a quicker re-expression of TLR4 at the cell surface. This led to prolonged activation of the MYD88-dependent pathway and thus the NFκB pro-inflammatory pathway. In contrast, PC1/3 KD macrophages exhibited resistance to inhibitory effect of IL-10 and the anti-inflammatory STAT3 pathway was downregulated. Furthermore, we found that the regulation exerted by PC1/3 on TLR biology was not restricted to TLR4. In PC1/3 KD macrophages, intracellular trafficking of endosomal TLR9 was also altered and TLR9 aggregated in multivesicular bodies. Consequently, the pro-inflammatory NFκB pathway was more rapidly activated and PC1/3 KD cells secreted more pro-inflammatory cytokines than normal macrophages. This alteration may be related to a decrease of GRAMD4 level, a protein known to inhibit intracellular trafficking of TLR9. Altogether, our results demonstrate that PC1/3 regulates the intracellular trafficking of TLR4 and TLR9 to inhibit the immune response. In the case of autoimmune diseases, PC1/3 activation could be therefore a relevant therapeutic strategy since TLR9 is involved. On the contrary, PC1/3 inhibition combined with TLR activation could be a promising strategy to reorient tumour-associated macrophages towards a pro-inflammatory and anti-tumor phenotype.