



**HAL**  
open science

# Etude de la voie de signalisation de l'interleukine-6 dans le cerveau de souris : - Implication des microdomaines rafts - Modulation par les acides gras polyinsaturés

Fabrice Casenave

## ► To cite this version:

Fabrice Casenave. Etude de la voie de signalisation de l'interleukine-6 dans le cerveau de souris : - Implication des microdomaines rafts - Modulation par les acides gras polyinsaturés. Alimentation et Nutrition. 2012. hal-01520559

**HAL Id: hal-01520559**

**<https://ephe.hal.science/hal-01520559>**

Submitted on 10 May 2017

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

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

Copyright

**Laboratoire Nutrition et Neurobiologie Intégrée : NutriNeuro**  
**(Direction : Dr Sophie Layé)**

**Université Bordeaux II-CNRS UMR 5226-INRA UMR 1286**



**Etude de la voie de signalisation de l'interleukine-6 dans le  
cerveau de souris :**

- **Implication des microdomaines rafts**
- **Modulation par les acides gras polyinsaturés**

Tuteur scientifique : Dr Véronique De Smedt-Peyrusse

Tuteur pédagogique : Dr Gwenaëlle Catheline

CASENAVE Fabrice



Diplôme EPHE SVT  
3<sup>ème</sup> année (2012- 2013)

# Table des Matières

<b>Liste des abréviations</b>	<b>4</b>
<b>Liste des figures et annexes</b>	<b>6</b>
<b>Résumé</b>	<b>8</b>
<b>Contexte général</b>	<b>9</b>
<b>Contexte de l'étude</b>	<b>10</b>
<b>Projet de recherche</b>	<b>11</b>
<b>I- Introduction</b>	<b>14</b>
L'immunité innée	14
L'immunité innée cérébrale	14
Les cellules microgliales	15
Les cytokines cérébrales	16
Induction de la synthèse de cytokines par le LPS	16
L'IL-6	18
Les récepteurs de l'IL-6	18
La voie de signalisation de l'IL-6	19
Les rafts	21
Les acides gras polyinsaturés (AGPI)	22
Le ratio $\omega 6/\omega 3$	23
<b>II- Matériel et Méthodes</b>	<b>26</b>
a) <b>Modèle d'études</b>	<b>26</b>
<i>in vitro</i> : Lignée cellulaire BV2	26
<i>In vivo</i> : souris C57/BL6J	27
<i>ex vivo</i> : Cellules microgliales	28
b) <b>Méthodes de biologie cellulaire</b>	<b>30</b>
Compartimentation cellulaire	30
Immunoprécipitation	31
Isolation des rafts sur hippocampe	32
c) <b>Méthodes d'analyse</b>	<b>35</b>
Western Blot	35
Le dot Blot	38
Cytométrie de flux	38
Analyse des acides gras dans les lipides membranaires des cellules BV2	41
Analyse statistique	41
<b>III- Etude 1 – Caractérisation de l'activation de la voie Jak2/STAT3</b>	<b>43</b>
a) <b>Objectifs</b>	<b>43</b>
b) <b>Résultats</b>	<b>43</b>
Etude <i>in vivo</i> : Hippocampe de souris	43
Cinétique d'activation de STAT3 induite par le LPS dans l'hippocampe de souris	43

Localisation subcellulaire de STAT3 et effet du LPS _____	44
Localisation subcellulaire de Jak2 et effet du LPS _____	46
Mise en évidence d'un complexe Jak2-STAT3 dans l'hippocampe _____	47
Le pré-complexe Jak2 est phosphorylé à l'état basal et le LPS induit la déphosphorylation de Jak2 _____	48
Etude de l'association Jak2 et STAT3 aux microdomaines de type raft et effet du LPS _____	49
<u>Etude <i>in vitro</i> : cellules BV2</u> _____	50
Caractérisation de la voie de signalisation de l'IL-6 dans la lignée BV2 _____	50
L'activation de la voie de signalisation de l'IL-6 dépend de l'intégrité des rafts _____	52
Le pré-complexe Jak2-STAT3 dépend de l'intégrité des rafts à l'état basal _____	53
<b>c) Discussion</b> _____	<b>53</b>
<b>IV- Etude 2 - Effet des AGPIs sur l'activation de la voie de signalisation de l'IL-6</b> _____	<b>58</b>
<b>a) Objectifs</b> _____	<b>58</b>
<b>b) Résultats</b> _____	<b>58</b>
Incorporation de DHA, AA et DPA dans les acides gras totaux <i>in vitro</i> _____	58
Mesure de la concentration de cholestérol après incorporation des AGPI et traitement des cellules BV2 par $\beta$ -MCD _____	60
L'enrichissement en DHA et le traitement à la $\beta$ -MCD affecte l'expression des gangliosides GM1 _____	60
Le DHA et l'AA induisent une réduction de la présentation des récepteurs GP130 et GP80 _____	62
Effet différentiel des AGPI sur l'activation de la voie Jak2-STAT3 _____	63
Caractérisation phénotypique des cellules microgliales <i>ex vivo</i> par cytométrie de flux. _____	66
La présentation des récepteurs GP130 et GP80 dans les microglies n'est pas affectée par un régime carencé en $\omega$ 3 _____	66
La réponse des microglies <i>ex vivo</i> à l'IL-6 n'est pas modulée par la carence en $\omega$ 3 _____	67
<b>c) Discussion</b> _____	<b>68</b>
<b>V- Conclusions et Perspectives</b> _____	<b>73</b>
<b>Bibliographie</b> _____	<b>76</b>

## Liste des abréviations

AA : Acide Arachidonique

AGPI : Acides Gras Poly Insaturés

ALA : Acide  $\alpha$ -Linoléique

APC : Allophycocyanine

BCA : BC Assay

$\beta$ -MCD :  $\beta$ -Methyl Cyclodextrine

BHE : Barrière Hémato Encéphalique

BSA : *Bovine Serum Albumine*

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CNTF: *Ciliary NeuroTrophic Factor*

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DHA: Docosa Hexa Enoïque

DMSO : Di Méthyl SulfOxide

EPA : Eïcosa Penta Enoïque

FABP : *Fatty Acid Binding Protein*

GP130 : Glycoprotéine 130

GPI : Glycosyl PhosphatidylInositol

HBSS : *Hank's Balanced Salt Solution*

HC : Hippocampe

HRP : *Horse raddish peroxydase*

IL-6 : InterLeukine-6

ip : intra-péritonéal

IP : Immuno-Précipitation

JaK : *Janus Kinase*

LA : Acide Linoléique

LBP : *Lipopolysaccharide Binding Protein*

LIF : *Leukaemia inhibitory factor*

LPS : Lipopolysaccharide

NFκB : *Nuclear Factor kappa B*

OCV : Organe Circum Ventriculaire

PAMP : *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PE : Phycoerythrine

PIC : *Protease Inhibitor Cocktail*

PPAR : *Peroxisome Proliferator Activated Receptor*

PVDF : Fluorure De PolyVinyle

RE : Réticulum Endoplasmique

SNC : Système Nerveux Central

STAT : *Signal Transducer and Activator of Transcription*

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SVF : Sérum de Veau Foetal

TBS : *Tris Buffer Saline*

TGF : *Transforming Growth Factor*

TLR : *Toll like receptor*

## Liste des figures et annexes

Figure 1 : Représentation du spectre d'excitation et d'émission d'un fluorochrome

Figure 2 : Représentation du spectre d'excitation et d'émission de l'APC et de la PE

Figure 3 : Représentation des valeurs numériques en cytométrie de flux

Figure 4 : Identification des rafts à partir d'hippocampes de souris le long d'un gradient de sucrose discontinu de 15 à 48%

Figure 5 : Cinétique d'activation de STAT3 par le LPS dans l'hippocampe

Figure 6 : Localisation subcellulaire de STAT3 et activation de STAT3 par le LPS dans l'hippocampe

Figure 7 : Localisation subcellulaire de Jak2 et déphosphorylation de P-Jak2 induite par le LPS dans l'hippocampe

Figure 8 : Mise en évidence d'un complexe STAT3/Jak2 par immunoprécipitation de Jak2 dans l'hippocampe

Figure 9 : Le LPS induit la déphosphorylation de Jak2

Figure 10 : Localisation de STAT3 et Jak2 dans les fractions rafts et non raft. Effet du LPS

Figure 11 : Les cellules BV2 expriment les récepteurs de l'IL-6, GP80 et GP130

Figure 12 : Cinétique d'activation des cellules BV2 par induite par l'interleukine-6

Figure 13 : Effet de la  $\beta$ -méthylcyclodextrine sur l'activation de la voie de signalisation de l'IL-6

Figure 14 : Effet de la  $\beta$ -méthylcyclodextrine sur l'intégrité du complexe Jak2-STAT3

Figure 15 : Incorporation de DHA, AA, DPA dans les acides gras totaux des cellules BV2

Figure 16 : Effet des AGPI et de  $\beta$ -MCD sur la concentration de cholestérol dans les BV2

Figure 17 : Effet des AGPI et de la  $\beta$ -MCD sur l'expression des GM1

Figure 18 : Présentation des récepteurs GP130 et GP80 à la surface cellulaire après supplémentation en DHA, AA, DPA ou Ethanol 0.1%

Figure 19 : Cinétique d'activation de STAT3 sur BV2 après supplémentation en DHA, AA, DPA ou Ethanol 0.1%

Figure 20 : Quantification de STAT3 sur BV2 après supplémentation en DHA, AA, DPA ou Ethanol 0.1%

Figure 21 : Présentation des protéines de surface CD11b et CD45 sur des microglies isolées *ex vivo*

Figure 22 : Evaluation de l'activation de STAT3 par l'IL-6 dans les microglies *ex vivo*

Schéma 1 : Représentation du lipopolysaccharide

Schéma 2 : Voie de signalisation du Lipopolysaccharide

Schéma 3 : Représentation du schéma classique d'activation de la voie Jak2/STAT3

Schéma 4 : Représentation des microdomaines lipidiques « rafts »

Schéma 5 : Voie de biosynthèse des acides gras poly insaturés de la famille des  $\omega$ 3 et  $\omega$ 6

Schéma 6 : Représentation d'une microglie et ses protéines de surface CD11b et CD45

Schéma 7 : Protocole expérimental de la compartimentation cellulaire

Schéma 8 : Protocole expérimental de l'immunoprécipitation

Schéma 9 : Protocole d'isolation des lipides rafts

Schéma 10 : Composantes d'un cytomètre de flux

Schéma 11 : Proposition d'un modèle pour la voie de signalisation Jak2/STAT3

Photo 1 : Appareil de transfert dot blot (Biorad)

## Résumé

L'interleukine-6 (IL-6) est produite par les cellules microgliales dans le système nerveux central lors d'une inflammation. L'IL-6 synthétisée se fixe sur ses récepteurs spécifiques, la glycoprotéine 80 (GP80) et la glycoprotéine 130 (GP130) pour activer la voie Jak2/STAT3. Les cibles de l'IL-6 dans le cerveau sont majoritairement les cellules gliales (microglies et astrocytes). Les rafts sont des microdomaines lipidiques jouant un rôle de plateforme signalisante qui pourraient intervenir dans la transduction de l'IL-6. Les acides gras polyinsaturés (AGPI), principaux composants du cerveau, sont dotés de propriétés immunomodulatrices en agissant directement sur la structure membranaire des cellules et/ou via les médiateurs lipidiques qu'ils produisent. L'objectif de ce travail a été d'étudier 1) l'implication des rafts dans l'activation de la voie de signalisation de l'IL-6, Jak2/STAT3 dans le cerveau et les cellules microgliales *in vitro* et 2) l'impact des AGPI sur la voie de signalisation de l'IL-6 dans les cellules microgliales *in vitro* et *ex vivo*. Nos résultats montrent, en condition basale, que STAT3 est complexé à Jak2. Ce pré-complexe est localisé dans les lipides rafts de la membrane plasmique. *In vivo*, le LPS, dont l'action est sous-tendue par l'IL-6, induit l'activation de STAT3 initiée au niveau membranaire dans les rafts, suivie de la translocation nucléaire de STAT3 phosphorylé. *In vitro*, le  $\beta$ -MCD (inhibiteur des rafts) induit la dissociation du pré-complexe Jak2/STAT3 et altère l'activation de STAT3 par l'IL-6. L'intégrité des lipides rafts est donc une condition nécessaire à l'activation totale de la voie de signalisation de l'IL-6. Nous avons ensuite démontré que les AGPI, en particulier l'acide docosahéxaénoïque (DHA) et l'acide arachidonique (AA) diminuent la présentation des récepteurs GP80 et GP130 à la surface des cellules microgliales BV2. L'AA réduit la phosphorylation de STAT3 par l'IL-6 alors que le DHA l'inhibe. Le DHA est donc un puissant modulateur de la voie de signalisation de l'IL-6. La carence alimentaire en AGPI de type  $\omega$ 3 n'affecte pas l'activation de la voie de l'IL-6 dans des microglies isolées *ex vivo*. Cette étude apporte de nouvelles données sur la régulation de la voie de signalisation de l'IL-6 et sa modulation par les AGPI.

Mots clés : interleukine-6 ; Jak/STAT ; rafts ; microglie ; acides gras poly insaturés

## **Contexte général**

Les changements de mode de vie liés au développement économique de nos sociétés industrialisées contribuent à l'allongement de la durée de vie mais aussi à l'installation d'habitudes alimentaires délétères pour la santé. La société moderne est donc face à de nouveaux problèmes de santé publique que sont entre autres, le vieillissement et le développement de pathologies liées à l'obésité. Une des priorités de l'INRA est de répondre à cette demande sociétale par une analyse de ces « transitions alimentaires » et leurs conséquences sur la santé, pour mieux maîtriser et adapter les apports alimentaires aux besoins du consommateur dans le respect de sa santé.

Depuis le siècle dernier, les acides gras polyinsaturés (AGPI) de type oméga 3 ( $\omega 3$  ou n-3) provenant du poisson et des plantes ont été remplacés par des AGPI de type oméga 6 ( $\omega 6$  ou n-6) et par des acides gras saturés issus d'huiles végétales et de graisses animales. L'apport en AGPI ne dépend que de l'alimentation et aujourd'hui, le ratio oméga6/oméga3 est de 20:1 alors que le ratio optimal est de 5:1. Le cerveau, dont la composition est riche en lipides (50-60%), est sensible aux variations des apports alimentaires particulièrement au moment du développement périnatal et lors du vieillissement, deux périodes de vulnérabilité pour l'individu. Il est maintenant bien établi qu'un ratio déséquilibré en AGPI a des conséquences sur le développement de maladies psychiatriques et qu'une supplémentation en omega3 améliore certains symptômes liés à ces pathologies.

Dans ce contexte, les modèles développés au laboratoire NutriNeuro, mon laboratoire d'accueil, qui visent à étudier l'impact des régimes déséquilibrés ou supplémentés en lipides sur la fonction cérébrale, vont contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes qui lient l'alimentation et la prévalence des maladies chroniques d'un point de vue clinique et expérimental. Dans ce cadre, les principaux objectifs de l'équipe Psychoneuroimmunologie et Nutrition dans laquelle j'ai effectué mon stage sont de répondre aux questions suivantes : 1- Comment les cytokines, facteurs immuns produits par les cellules gliales, agissent sur le cerveau pour altérer les composantes cognitives et affectives de l'état de bien-être (troubles de l'humeur et de la cognition). 2- Comment la nutrition, plus particulièrement dans sa composante lipidique, module la production des cytokines cérébrales et leurs effets comportementaux. Les mécanismes d'action des micronutriments comme les acides gras poly insaturés sur le cerveau sont mal connus et il est nécessaire d'étudier les mécanismes qui régissent leurs actions au niveau cérébral. Ces recherches permettent de générer des allégations fiables par les spécialistes de la santé et de développer des stratégies thérapeutiques alimentaires pour limiter certaines pathologies chroniques.

## Contexte de l'étude

Le projet de recherche dans lequel j'ai été impliqué au cours de mon stage, vise à déterminer par quels mécanismes les AGPI  $\omega$ 3 apportés par l'alimentation modulent la synthèse et l'action des cytokines inflammatoires et en particulier l'Interleukine-6 (IL-6) dans le cerveau. La neuroinflammation est un phénomène caractérisé par la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages résidents du cerveau, les cellules microgliales, en réponse à une stimulation immunitaire innée, le vieillissement ou une lésion cérébrale. Parce que les AGPI  $\omega$ 3, acides gras essentiels dont les teneurs sont particulièrement élevées dans le cerveau présentent également des propriétés anti-inflammatoires, nous recherchons si leur consommation influence la neuroinflammation et les troubles comportementaux associés (étudiés par les comportementalistes).

Au laboratoire, il a été montré qu'*in vitro*, les AGPI  $\omega$ 3 limitent la production de cytokines par les macrophages cérébraux en régulant les récepteurs et les voies de signalisations associées (De Smedt-Peyrusse, et al. 2008). Chez la souris, un régime carencé en AGPI  $\omega$ 3 provoque la surexpression périphérique et centrale d'une cytokine inflammatoire, l'IL-6 et l'altération de sa voie de signalisation du *Signal Transducer and Activator of Transcription* STAT3 (Mingam, et al. 2008). La voie de signalisation de l'IL-6, particulièrement activée au cours du développement postnatal du cerveau (Gautron, et al. 2006), joue un rôle clé dans l'action de l'IL-6 cérébrale notamment dans l'hippocampe, structure cérébrale impliquée dans la cognition (Mingam, et al. 2008). Ces données suggèrent que les AGPIs de la diète régulent la voie de signalisation de l'IL-6 dans le cerveau et particulièrement dans les cellules gliales, principales sources d'IL-6 dans le cerveau et exprimant les récepteurs de l'IL-6 (GP80 et GP130). Les rafts (radeaux lipidiques) sont des microdomaines membranaires constituant des plateformes de signalisation de nature lipidique dont la fonctionnalité est sensible aux variations de teneur en AGPI dans les membranes. Nous avons émis l'hypothèse que la teneur membranaire en AGPI des phospholipides pouvait influencer la fonctionnalité des rafts et par conséquent pourrait modifier le couplage récepteur/voie de signalisation de l'IL-6. L'implication des rafts dans ce processus n'est pas connue *in vivo*.

Lorsque j'ai débuté mon travail, la mise au point l'isolement de domaines rafts à partir d'extraits membranaires issus d'hippocampes de souris (C57/BL6J) avait déjà été réalisé au laboratoire. Cette étude a mis en évidence une colocalisation de Jak2 et STAT3, protéines signalisantes de l'IL-6, avec les rafts dans des extraits hippocampiques d'animaux témoins. Deux heures après l'administration de lipopolysaccharide (LPS) induisant une réaction inflammatoire, STAT3 est exclus des rafts. La question de l'implication fonctionnelle des rafts dans l'activation de STAT3 restait posée.

Pour mener à bien cette étude, nous avons développé des approches combinées de biologie cellulaire et de biochimie en utilisant de nouveaux procédés technologiques (ex : modèles expérimentaux *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* complémentaires, purification de microdomaines membranaires de type raft, fractionnement subcellulaire, cytométrie de flux, immunoprécipitation). Je me suis investi dans l'étude d'interactions protéine-lipide, notamment celles qui associent les récepteurs des cytokines de type raft dont la fonctionnalité est sensible aux variations de teneur en AGPI des membranes.

## **Projet de recherche**

### **Première partie : Implication des rafts dans l'activation de la voie de signalisation JaK2/STAT3**

La première partie de mon travail a été consacrée à approfondir la caractérisation de la voie JaK2/STAT3 induite par le LPS via l'action de l'IL-6 dans l'hippocampe de souris. Nous avons établi la cinétique d'activation de la voie JaK2/STAT3 par le LPS et étudié la localisation subcellulaire de JaK2 et STAT3 par fractionnement cellulaire. L'interaction JaK2/STAT3 a été révélée par immunoprécipitation. Pour établir un lien fonctionnel entre l'activation de la voie STAT3 et les rafts, nous avons réalisé des expériences *in vitro* en utilisant la lignée microgliale murine BV2, dans laquelle des rafts ont été caractérisés précédemment (De Smedt-Peyrusse, et al. 2008). Nous avons premièrement vérifié que les BV2 possédaient la machinerie nécessaire à la réponse à l'IL-6. L'expression des récepteurs de l'IL-6 a été analysée par cytométrie de flux et la cinétique d'activation de STAT3 par l'IL-6 a été définie par Western Blot. Sur cette base, nous avons étudié l'effet de la Méthyl- $\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ -MCD), un chélateur du cholestérol connu pour déstabiliser les rafts sur l'activation de STAT3 induite par l'IL-6.

L'ensemble de ce travail de caractérisation a servi de socle à l'étude proprement dite des mécanismes impliqués dans la modulation de la synthèse et l'action des cytokines inflammatoires par les AGPIs faisant l'objet de la deuxième partie de mon travail.

### **Deuxième partie : Impact des AGPI sur la voie de signalisation de l'IL-6 dans les cellules microgliales.**

Pour mener cette étude de ciblage, nous avons utilisé la lignée BV2 dont la réponse à l'IL6 a été caractérisée dans la partie 1. En contrôlant la composition lipidique du milieu de culture, nous avons entrepris l'analyse de l'impact des AGPI  $\omega$ 3 (DHA) et  $\omega$ 6 (AA et DPA) sur l'expression des récepteurs de l'IL-6 en cytométrie de flux et sur l'activation de STAT3. Cette étude a été transposée à des cellules microgliales *ex vivo* isolées à partir de cerveaux de souris soumises à une diète carencée ou équilibrée en AGPI  $\omega$ 3. Les cellules isolées ont été stimulées par l'IL-6 *in vitro* et l'activité STAT3 a été évaluée.

Ce mémoire se décompose en trois grands chapitres. Dans le premier, j'introduis les concepts scientifiques sur lesquels est basée notre étude. Deuxièmement, je décris les procédés méthodologiques que j'ai utilisés ou mis au point pour réaliser ce travail. Un troisième chapitre est consacré à la présentation des résultats obtenus dans le cadre de mon étude dont une partie s'intègre dans un article en préparation.



## I- Introduction

### **L'immunité innée**

L'immunité innée constitue la réponse de l'organisme face à une agression pouvant être entre autre d'origine infectieuse, immunologique, tumorale ou traumatique. La détection d'un agent pathogène par les cellules de l'immunité innée se fait via la reconnaissance de leurs motifs moléculaires appelés PAMPs pour pathogen-associated molecular patterns (Medzhitov 2001). La fixation des PAMPs à leurs récepteurs spécifiques tels les toll-like receptors (TLR) active des voies de signalisation intracellulaires contrôlant la transcription de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. Ceci aboutit rapidement, au niveau local, à la libération par les phagocytes de nombreuses molécules, dont les cytokines inflammatoires, dans le milieu extracellulaire. Les cytokines diffusent ensuite dans l'organisme par voie sanguine (Fong, et al. 1989).

### **L'immunité innée cérébrale**

Le système nerveux central a longtemps été considéré comme dépourvu de cellules immunitaires du fait de la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et d'une faible expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II. Un épisode infectieux s'accompagne de modifications physiologiques et comportementales regroupées sous le terme de comportement de maladie (fièvre, diminution de la prise alimentaire, repli sur soi, fatigue) (Dantzer 2001) (Hart 1988). Ces modifications sont contrôlées par le système nerveux central (SNC), indiquant que le cerveau possède son propre système de dépense en réponse à un stimulus immunogène.

Il existe plusieurs voies de communication entre la périphérie et le système nerveux central. Les cytokines produites proches d'un site inflammatoire périphérique sont capables d'activer des nerfs afférents tels que le nerf vague et le nerf du trijumeau, le message est ainsi relayé au niveau central (Konsman, et al. 2004). La voie humorale permet la diffusion des PAMPs et des cytokines circulantes au niveau de l'organe circumventriculaire (OCV) qui ne possède pas de BHE mais qui est pourvu d'une vascularisation riche. Les macrophages périvasculaires et les cellules endothéliales des veinules du cerveau expriment les récepteurs TLR et des cytokines comme l'IL-1 $\beta$  (Lacroix, et al. 1998; Laflamme and Rivest 2001) et permettent ainsi d'amorcer la réaction immunitaire innée cérébrale. Au niveau de la BHE, les cytokines circulantes peuvent accéder au cerveau via un système de transport saturable (Banks 2006). L'engagement de l'ensemble de ces voies de communication aboutit à la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules de l'immunité innée cérébrale : les cellules microgliales qui sont les macrophages résidents du cerveau, et les astrocytes (Aloisi 2001; Dong and Benveniste

2001). En 1994, il a été mis en évidence la synthèse de cytokines par les cellules microgliales après injection péritonéale d'agent infectieux (Laye, et al. 1994). Ce sont les cytokines qui régulent les symptômes non spécifiques liés à l'inflammation. L'hippocampe, décrit comme une structure cérébrale riche en cellules microgliales, est ainsi une cible privilégiée de l'inflammation (revue Dantzer 2004). Cette structure appartient au système limbique et se compose de trois parties : le *subiculum*, la corne d'Ammon (CA) composée des aires CA1, CA2 et CA3 et le gyrus denté. L'hippocampe joue un rôle central dans la mémoire, l'apprentissage et la navigation spatiale. L'injection de LPS induit des déficits d'apprentissage et de mémoire chez les rongeurs (Goujon, et al. 1995). Une étude récente montre que ces déficits induits par le LPS sont corrélés à l'activation des microglies hippocampiques traduite par la production exacerbée d'IL-1 $\beta$  (Lee, et al. 2012; Williamson, et al. 2011). Du fait de ces caractéristiques, l'hippocampe est un modèle de choix pour l'étude *in vivo* de l'inflammation.

## Les cellules microgliales

Les cellules microgliales représentent environ 10% de la population cellulaire du cerveau adulte et sont les principales sources de cytokines cérébrales (Aloisi 2001). Elles sont considérées comme les macrophages résidents du cerveau. Les cellules microgliales possèdent de nombreux rôles dans le système nerveux central :

**1) Fonction physiologique au cours du développement.** Elles participent à l'apoptose de sous population spécifique de neurones en développement (Marin-Teva, et al. 2004) et orchestrent l'équilibre entre la synaptogenèse et l'apoptose neuronale associée au développement du SNC (Bessis, et al. 2007). Des études récentes montrent qu'elles participent à la maturation synaptique des circuits neuronaux dans les premiers stades de développement par des mécanismes d'« élagages » dendritiques (Paolicelli, et al. 2011).

**2) Rôle dans l'inflammation du SNC:** Dans le cerveau sain, les cellules microgliales sont dans un état « quiescent », elles ne présentant pas d'activité macrophagique et expriment faiblement les récepteurs induisant la fonction macrophagique (CD45<sup>-</sup>, CMHII<sup>-</sup>) (Kreutzberg 1996). Lors d'un stimulus inflammatoire, les microglies ont la capacité de répondre très rapidement en activant l'immunité innée cérébrale et la réparation tissulaire. Le phénotype dit « activé » des microglies induit la production de nombreuses cytokines dont l'IL-6 (Lee, et al. 1993) et l'expression de nombreux récepteurs membranaires (CD11b<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, récepteur 3 du complément, CMHII<sup>+</sup>) (Streit, et al. 1989). Les cellules microgliales ainsi que les astrocytes représentent à la fois les principales sources de cytokines et en sont les cibles puisqu'elles expriment leurs récepteurs. L'expression des récepteurs TLR permettent à ces cellules de l'immunité innée cérébrale de reconnaître les PAMPs comme le LPS couramment utilisé expérimentalement pour induire une réponse inflammatoire. *In vitro*, ce modèle

permet d'étudier la régulation de la synthèse des cytokines dans des cultures primaires de cellules gliales ou dans des lignées cellulaires microgliales comme la lignée BV2 (De Smedt-Peyrusse, et al. 2008) utilisée dans notre étude.

**3) Implication dans la physiopathologie de maladies neurodégénératives et vieillissement.** Lors d'une lésion cérébrale, les microglies prolifèrent massivement conduisant à une exacerbation de la réponse microgiale en réponse à un stimulus inflammatoire (Godbout, et al. 2005; Terao, et al. 2002). Par exemple, les microglies « activées » produisent le précurseur de la protéine amyloïde (APP), suggérant un rôle possible de l'activation de la microglie dans les maladies neurodégénératives (Banati, et al. 1993).

### **Les cytokines cérébrales**

Les cytokines regroupent l'ensemble des substances médiatrices impliquées dans divers aspects de la défense de l'hôte (Cohen and Livnat 1976). Elles agissent en cascade et forment un réseau de molécules interdépendantes qui influencent leur propre synthèse et la synthèse des autres cytokines du réseau par des boucles de rétroaction positives et négatives (Haeffner-Cavaillon, et al. 1989). Elles ont des propriétés pléiotropiques et redondantes en fonction de la structure de leurs récepteurs et de leur localisation tissulaire et cellulaire. Les cytokines sont classées en quatre familles : Les chémokines (migration des cellules sur le site d'inflammation ou de lésion), les interférons (lutte antivirale), les *colony stimulating factor* (CSF) (différenciation cellulaire de la lignée myéloïde) et les interleukines (IL) (communication inter cellulaire du système immunitaire).

Les cytokines se divisent en deux groupes : les cytokines inflammatoires et anti-inflammatoires. Les cytokines inflammatoires sont principalement, l'IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-12, TNF  $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) et les interférons. Les principales cytokines anti-inflammatoires sont l'IL-10, IL-4, IL-13 et IL-1Ra (antagoniste du récepteur de l'IL-1) et le TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ). Dans ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'IL-6 libérée en réponse au LPS.

### **Induction de la synthèse de cytokines par le LPS**

Le lipopolysaccharide ou LPS est une endotoxine classiquement utilisée pour induire la production de cytokines aussi bien *in vitro* par des cellules en culture qu'*in vivo* en tant que modèle expérimental d'inflammation périphérique. Le LPS est un des principaux composants de la paroi des bactéries à Gram négatif. Le LPS est transporté dans la circulation sanguine grâce à une protéine de liaison, la *LPS binding protein* ou LBP. Le complexe LPS/LBP ou le LPS seul se fixe au récepteur CD14 formant un complexe avec les *toll-like receptors* (TLRs), en particulier le TLR4. Le CD14 existe sous forme soluble ou ancré à la membrane plasmique et en particulier aux rafts grâce à son domaine

d'ancrage spécifique, le glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Olsson and Sundler 2006). Les voies de signalisations activées par le TLR4 induisent le recrutement de nombreuses molécules adaptatrices et aboutissent à l'activation de la voie de signalisation NFκB. Cette activation induit la translocation nucléaire de NFκB et son interaction avec l'ADN. NFκB régule la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation, en particulier les gènes codant pour les cytokines inflammatoires dont l'IL-6.

## Endotoxine bactérienne Gram-négative (lipopolysaccharide, LPS)

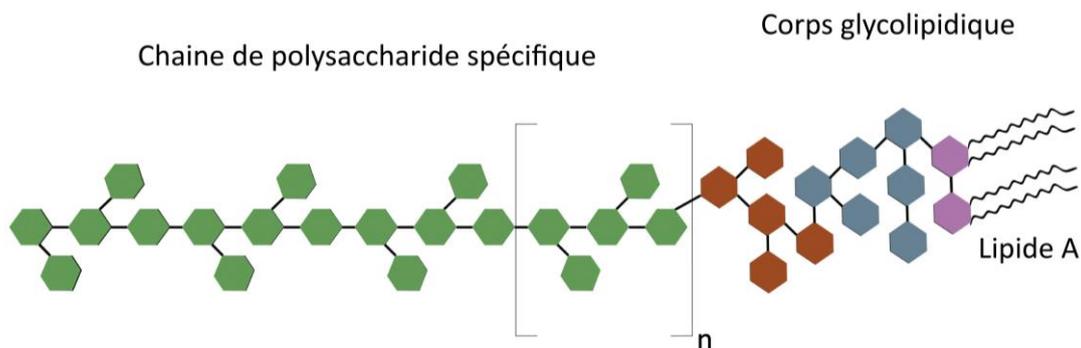


Schéma 1 : Représentation du lipopolysaccharide

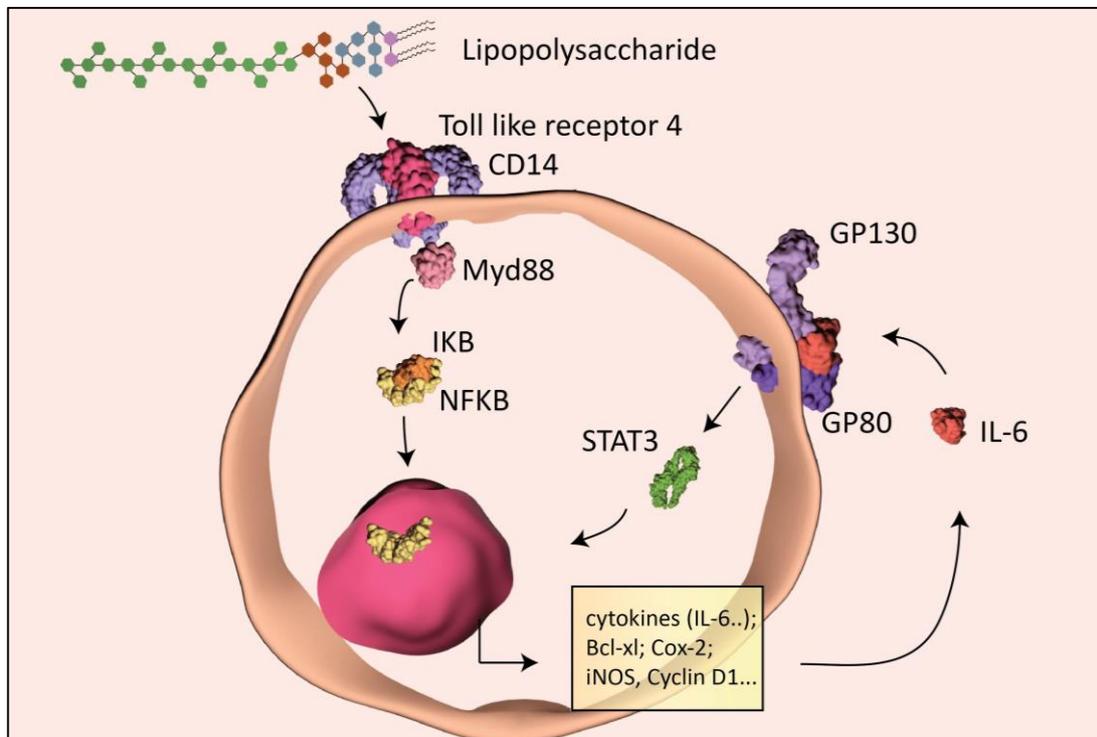


Schéma 2 : Voie de signalisation du Lipopolysaccharide

## L'IL-6

L'interleukine-6 (IL-6) est une glycoprotéine de 185 acides aminés dont le poids moléculaire avoisine les 21 à 30 kDa. La plupart des formes de l'IL-6 sont phosphorylées au niveau de résidus sérine (May, et al. 1991) mais ces modifications post-traductionnelles ont peu ou pas d'incidence sur son activité biologique. L'IL-6 fait partie d'une famille d'interleukines incluant le LIF (*leukemia inhibitory factor*), le CNTF (*ciliary neurotrophic factor*) et l'interleukine-11 (IL-11). Tous les membres de cette famille induisent l'expression de protéines de la phase aiguë de l'inflammation. Les gènes cibles de la famille de l'IL-6 sont impliqués dans la différenciation cellulaire, la survie, l'apoptose et la prolifération. Contrairement à l'IL-1 $\beta$  et au TNF $\alpha$ , l'administration périphérique ou centrale d'IL-6 n'induit pas des changements comportementaux mais déclenche de la fièvre. Cependant, l'administration de LPS à des souris invalidées pour le gène de IL-6 (KO pour knock out) n'induit pas de comportement de maladie comparé à des souris témoins (*wt*, wild type) (Sparkman, et al. 2006). Ceci signifie que l'IL-6 contribue à l'expression de TNF $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  dans le cerveau en réponse au LPS.

## Les récepteurs de l'IL-6

L'action de IL-6 requiert la présence d'un récepteur spécifique, GP80 (ou IL-6R $\alpha$  pour IL-6 *receptor*, ou CD126) et d'un récepteur adaptateur ubiquitaire GP130 (ou IL-6R $\beta$  ou CD130) (Hibi, et al. 1990). GP80 joue un rôle mineur dans la transduction du signal de l'IL-6, son domaine cytoplasmique ne possédant que 82 acides aminés. GP130 une glycoprotéine transmembranaire de 130kDa dont le domaine cytoplasmique contient plusieurs motifs impliqués dans la signalisation intracellulaire, notamment une séquence YSTV SHP-2 pour le recrutement de protéine tyrosine phosphatase-2 et une séquence YxxQ pour le recrutement des *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT). GP130 contient également des régions requises pour le recrutement de protéine tyrosine kinase appelées Janus Kinase (JaK). Après activation par une cytokine, le domaine FNIII du récepteur change de conformation et se met dans une position correcte de proximité et d'orientation qui autorise sa transphosphorylation par des JaKs.

Classiquement, l'IL-6 forme un complexe avec GP80. Ce complexe IL-6/GP80 s'associe à GP130 entraînant l'homodimérisation de GP130 et la formation du hexamère composé d'un dimère d'IL-6, un dimère de GP80 et un dimère de GP130 (Boulanger, et al. 2003). L'homodimérisation de GP130 conduit à l'activation de la voie de signalisation de l'IL-6 (Scheller and Rose-John 2006). De façon intéressante, GP80 peut être exprimée sous forme soluble (sGP80) et sa liaison avec l'IL-6 est capable d'induire une réponse à l'IL-6 par des cellules n'exprimant que GP130 (Taga, et al. 1989). Ce processus est appelé « trans-signaling ». Une étude récente montre que la voie de l'IL-6 via le GP80 soluble est le premier mode de signalisation induit après une stimulation au LPS (Greenhill, et al. 2011). La protéine GP130

existe également sous forme soluble interagissant spécifiquement avec le complexe IL-6/sGP80 (Jostock, et al. 2001) neutralisant ainsi le processus de « trans-signaling » (Burton, et al. 2011).

Dans le cerveau, des sites de fixation de l'IL-6 ont été mis en évidence dans l'antéhypophyse de rat (Ohmichi, et al. 1992). GP80 est détectée en condition basale dans les neurones pyramidaux de la corne d'Ammon et les cellules granulaires du DG, ainsi que dans l'hypothalamus, et certaines zones du cortex (Schobitz, et al. 1992; Vallieres and Rivest 1997). GP80 est principalement exprimée par les hépatocytes, les neutrophiles, les cellules gliales et dans les neurones (Sawada, et al. 1993). Une faible expression des transcrits de GP80 est détectée au niveau de l'OCV, celle-ci est rapidement augmentée après l'administration périphérique de LPS au niveau des vaisseaux sanguins (Vallieres and Rivest 1997). GP130 est exprimé dans les neurones et les cellules gliales de l'hippocampe, du cortex et de l'hypothalamus (Vallieres and Rivest 1997). Des études démontrent une association partielle de GP130 et de GP80 avec les lipides rafts, observée sur des cellules de foie de chiens (Buk, et al. 2005) ou dans les cellules hépatiques humaines (Sehgal, et al. 2002), voire même une association totale de GP80 (Kim, et al. 2004) dans des cellules cancéreuses de prostate.

### **La voie de signalisation de l'IL-6**

Il a été décrit que la formation du complexe IL-6/GP80/GP130 entraîne leur phosphorylation réciproque par l'activation de la kinase Jak2 (Duhe and Farrar 1998). Les JakS sont des protéines possédant une activité tyrosine kinase. Cette famille est composée de quatre membres (Jak1, Jak2, Jak3 et Tyrosine Kinase-2 (TyK2)). Les protéines JakS possèdent un domaine kinasique et un domaine catalytique pseudo-kinase inactif, elles se fixent sur GP130 via le domaine amino-terminal FERM. Après leur fixation sur le récepteur, les protéines JakS sont activées et phosphorylent GP130, créant ainsi un domaine d'ancrage permettant le recrutement et la phosphorylation de STAT1 et STAT3, protéines signalisantes de l'IL-6 (Sanz, et al. 2008). La phosphorylation de STAT3 sur le résidu Tyrosine (PSTAT Y705) induit la formation d'homodimères (STAT3-STAT3) ou d'hétérodimères (STAT3-STAT1) (Henry, et al. 2009) qui migrent du cytoplasme vers le noyau pour réguler la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et la différenciation. STAT3 possède plusieurs sites de phosphorylation, notamment le site Sérine 727. Cette phosphorylation est nécessaire à l'activation totale de STAT3. En effet, une mutation de cette sérine en alanine induit une réduction de 50% l'activation de la voie de signalisation de l'IL-6 dans les cellules d'hépatomes (Schuringa, et al. 2000). Dans certains cas, la phosphorylation de ce résidu sérine provoque l'augmentation de l'ancrage de STAT3 à l'ADN (Ng and Cantrell 1997). En revanche, il n'a pas été mis en évidence d'influence de cette phosphorylation sur la translocation nucléaire de STAT3 et sur sa capacité à être phosphorylée sur les résidus tyrosine.

STAT1 semble jouer un rôle mineur dans la transduction du signal de l'IL-6 dans le cerveau contrairement à STAT3 (Sanz, et al. 2008). Plusieurs études montrent que Jak2 est la protéine kinase prédominante dans l'activation de STAT3 (Oliva, et al. 2012; Satriotomo, et al. 2006). Cette voie de signalisation Jak2/STAT3 est fortement dépendante de l'IL-6. En effet, une stimulation au LPS chez des souris invalidées pour le gène de l'IL-6 ne déclenche pas l'activation de STAT3 (Mingam, et al. 2008).

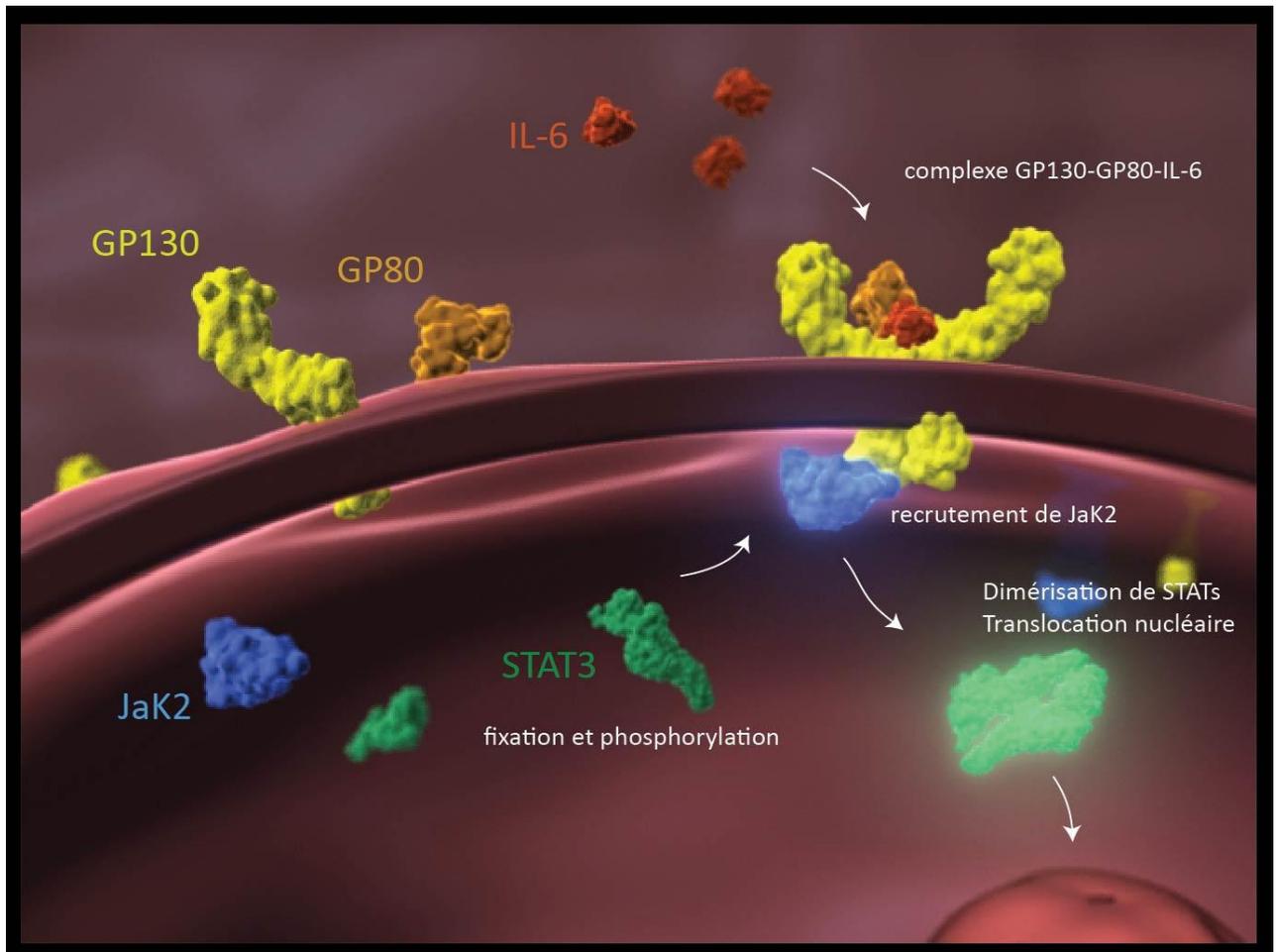


Schéma 3 : Représentation classique de l'activation de la voie Jak2/STAT3

Ce modèle a été remis en question récemment (revue Seghal, 2008) avec la mise en évidence 1) de la présence de dimères STAT non phosphorylés et de l'association de STAT à des complexes de haute poids moléculaire défini comme STATOSOME, 2) d'activité transcriptionnelle de STAT non phosphorylés 3) d'un pool de STAT3 localisé à la membrane plasmique en particulier au niveau de domaines lipidiques de type raft dans une lignée hépatocytaire (Shah, et al. 2002). Ces dernières données suggèrent une possible médiation du signal de transduction de STAT3 à partir de la membrane plasmique et des domaines rafts constituant des plateformes signalisantes.

## Les rafts

L'existence de domaines particuliers de types rafts (pour radeaux lipidiques) dans les membranes biologiques a été conceptualisée par Simons et van Meer (Simons and van Meer 1988) en s'appuyant sur des bases biophysiques liées aux propriétés des lipides membranaires. Une définition des rafts a été proposée par Pike en 2006 (Pike, 2006) : « les rafts membranaires sont des domaines de petite taille (10-200nm), hétérogènes, très dynamiques, enrichis en stérols et sphingolipides, qui compartimentalisent des processus cellulaires. Ces microdomaines peuvent être stabilisés pour former des plateformes plus grandes grâce à des interactions protéines-protéines et protéines-lipides ». Les rafts existent dans les membranes cellulaires dès lors qu'elles renferment des sphingolipides et du cholestérol en quantité suffisante. Il existe dans les cellules un gradient croissant de cholestérol à partir du réticulum endoplasmique jusqu'à la membrane plasmique. D'autre part la biosynthèse des sphingolipides n'est complète qu'au niveau de l'appareil de Golgi, c'est dans ce dernier compartiment intracellulaire que les rafts se formeraient (revue Simons and Toomre, 2000).

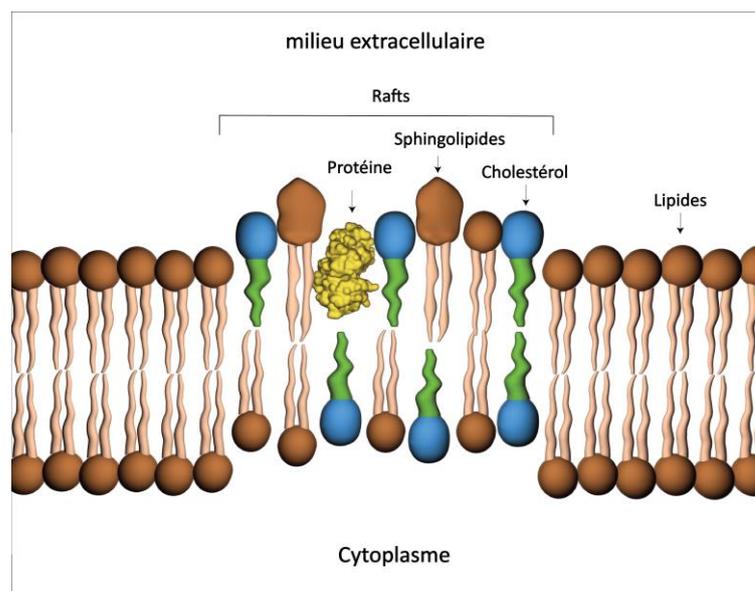


Schéma 4 : Représentation des microdomaines lipidiques « rafts »

Initialement proposés pour servir de plateforme pour le tri et le trafic intracellulaire des protéines, il est rapidement apparu que les rafts pouvaient être impliqués dans une grande variété de processus biologiques. Une des fonctions majeures des rafts est leur implication dans les processus de transduction de signal. Les rafts permettent en effet le recrutement de récepteurs activés par la liaison de leur ligand. Si l'activation du récepteur se trouve dans les rafts, le complexe de signalisation est alors protégé des enzymes localisées en dehors des rafts (« non-rafts ») comme des phosphatases qui pourraient affecter la signalisation. En règle générale, les rafts recrutent les protéines dans un microenvironnement où l'état de phosphorylation peut-être modifié par des kinases et des

phosphatases locales, permettant de moduler la signalisation. Plusieurs exemples sont déjà à citer de voies de signalisation impliquant les rafts : la signalisation des ImmunoglobulineE (Sheets, et al. 1999) ou encore le récepteur à l'*epidermal growth factor* (Waugh, et al. 1999). De manière intéressante, la voie de signalisation du LPS est dépendante des rafts. En effet, l'un de ces récepteurs spécifiques, le CD14, est ancré dans les lipides rafts (De Smedt-Peyrusse, et al. 2008; Triantafilou, et al. 2002) et il a été montré le complexe LPS/TLR4 était recruté dans les rafts pour se lier à CD14 initiant ainsi la transduction du signal du LPS. L'implication des rafts dans la régulation de la voie de signalisation de l'IL-6 n'est pas connue dans le cerveau. Seule une étude décrit une association de Jak2 aux rafts dans la lignée microgliale BV2 (Kim, et al. 2006).

Les lipides rafts sont dans un environnement lipidique susceptible de les influencer. Une forte teneur en AGPI  $\omega$ 3 dans les phospholipides de la bicouche lipidique est capable d'augmenter la taille des rafts (Shaikh, et al. 2009), de modifier la distribution spatiale des protéines (Shaikh and Teague 2012) et de moduler la mobilité des lipides. Ces propriétés n'ont pas été mises en évidence pour les AGPI  $\omega$ 6. Les rafts représentent donc une cible potentielle des AGPI pouvant moduler leur activité de signalisation.

## **Les acides gras polyinsaturés (AGPI)**

Un acide gras est un acide carboxylique dérivant de, ou contenu dans les graisses animales et végétales, les huiles ou les cires sous forme estérifiées. Les acides gras naturels possèdent une chaîne carbonée de 4 à 28 atomes de carbone. On parle d'acide gras à longue chaîne pour une longueur de 14 à 22 carbones et à très longues chaînes s'il y a plus de 22 carbones. Un acide gras insaturé est un acide gras qui comporte une ou plusieurs doubles liaisons carbone-carbone, on parle alors d'acides gras polyinsaturés (AGPI). Il existe deux principales classes d'AGPI, les AGPI de type  $\omega$ 3 et les AGPI de type  $\omega$ 6. Les AGPI sont essentiels (Holman 1998), ils sont apportés par l'alimentation soit sous forme longue soit sous forme de précurseurs métabolisés par l'organisme en acides gras à longue chaîne. Le précurseur métabolique pour les AGPI de la famille des  $\omega$ 6 est l'acide linoléique (18:2 n-6 ou LA) et pour les  $\omega$ 3, l'acide  $\alpha$ -linoléique (18:3 n-3 ou ALA). Les voies de biosynthèse des AGPI précurseurs consistent en des séries de désaturations et d'élongations par des systèmes enzymatiques comprenant des fatty acyl CoA synthétases, des  $\Delta$ 5 et  $\Delta$ 6 désaturases, des élongases, des acyltransférases et des transacétylases (Budowski 1988). Les principaux AGPI dérivés de ces voies de synthèse sont l'acide arachidonique (20:5 n-6 ou AA) pour la série des  $\omega$ 6 et les acides eicosapentaénoïque (20:5 n-3 ou EPA) et docosahexaénoïque (22:6 n-3 ou DHA) pour la série des  $\omega$ 3 (schéma 5). Les AGPI précurseurs se trouvent principalement dans les graines et les huiles végétales, le tournesol et l'arachide pour les  $\omega$ 6, le colza et la noix pour les  $\omega$ 3. L'alimentation fournit également des AGPI préformés, la viande est riche

en AGPI de la famille  $\omega 6$  alors que le poisson est une source d'AGPI de la famille des  $\omega 3$ . Parce que les deux séries d'AGPI sont en compétition pour l'utilisation des enzymes nécessaires à leur biosynthèse et qu'ils possèdent des propriétés physiologiques distinctes, le ratio  $\omega 6/\omega 3$  selon lequel ils sont apportés par l'alimentation revêt une importance primordiale.

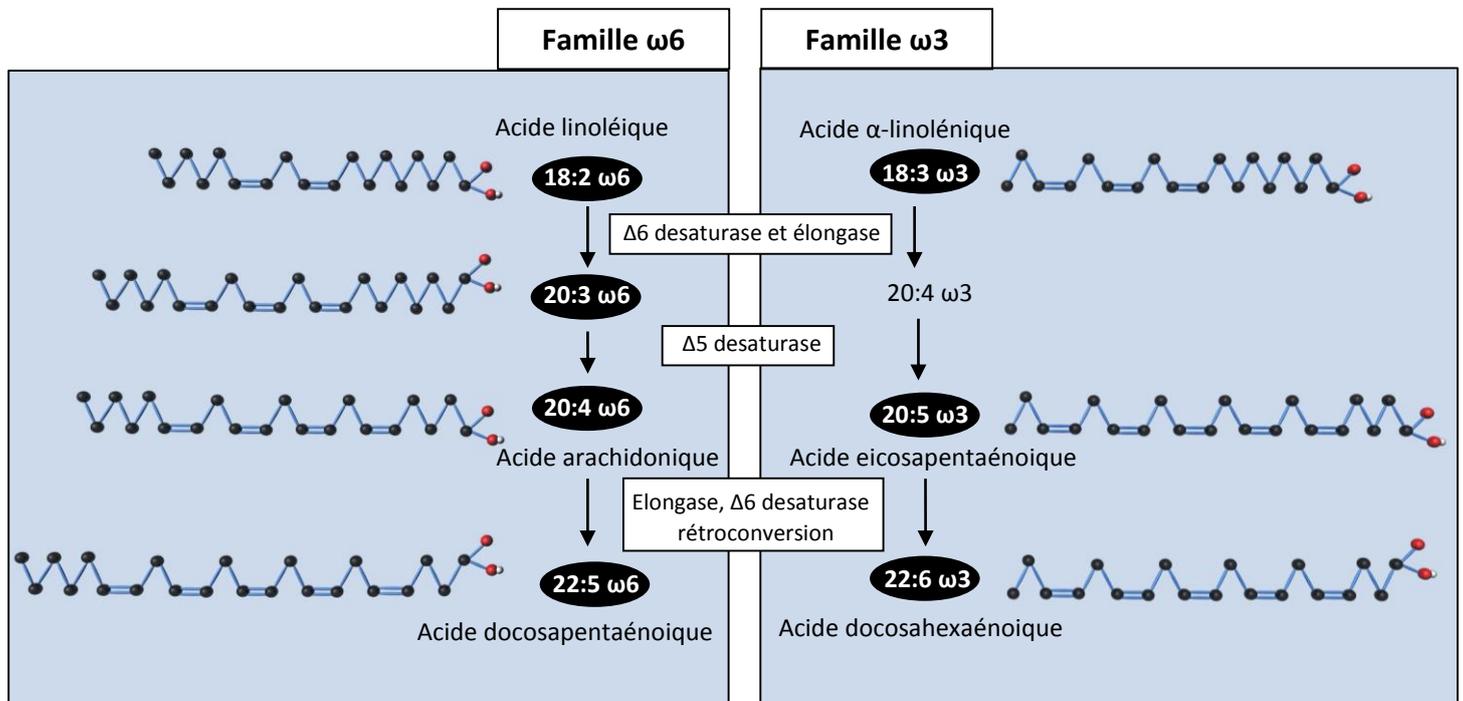


Schéma 5 : Voie de biosynthèse des acides gras poly insaturés de la famille des  $\omega 3$  et  $\omega 6$

## Le ratio $\omega 6/\omega 3$

Les AGPI  $\omega 3$  comme étant majoritairement anti-inflammatoires alors que les AGPI  $\omega 6$  sont décrits comme ayant des propriétés pro-inflammatoires (Calder 2006). Par conséquent, l'augmentation du rapport  $\omega 6/\omega 3$  dû à un accroissement des AGPI  $\omega 6$ , comme nous l'observons actuellement dans la diète des pays occidentaux (le ratio étant actuellement de 1/20 au lieu de 1/5) peut induire des effets néfastes sur la santé tels qu'une augmentation de l'incidence des maladies cardiovasculaires et des syndromes inflammatoires (Simopoulos 2002).

L'AGPI  $\omega 6$  AA est un précurseur de la famille des médiateurs eicosanoïdes (prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes et autres métabolites). Ils ont une activité inflammatoire propre et régulent aussi d'autres médiateurs comme les cytokines inflammatoires. La consommation d'AGPI  $\omega 3$  fait baisser le taux d'acide arachidonique dans les membranes cellulaires (Lafourcade, et al. 2011) donc le taux d'eicosanoïdes et de ses dérivés. Les AGPI  $\omega 3$  diminuent la production des cytokines pro-

inflammatoires comme le TNF $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-6 et l'expression des molécules d'adhésion impliquées dans l'interaction inflammatoire entre les leucocytes et les cellules endothéliales.

Le régime alimentaire influence la teneur en AGPI du cerveau. Au laboratoire, nous avons montré qu'un régime carencé en  $\omega$ 3 induit une diminution du taux de DHA et une augmentation de la teneur en AGPI  $\omega$ 6, AA et DPA (Lafourcade, et al. 2011) par rapport à un régime équilibré en  $\omega$ 3. Ces modifications de teneurs en AGPI dans un régime carencé  $\omega$ 3 s'accompagnent de déficits comportementaux et des troubles émotionnels corrélés à une désensibilisation des récepteurs aux cannabinoïdes de type 1 au niveau synaptique (Lafourcade, et al. 2011). D'autres études montrent que les AGPI  $\omega$ 3 régulent la synthèse des cytokines pro-inflammatoires. En effet, *in vitro*, les  $\omega$ 3 tels que le DHA et l'EPA peuvent inhiber la production d'IL-6 par les cellules endothéliales (De Caterina and Libby 1996). Le DHA inhibe la production d'IL-1 $\beta$  et de TNF $\alpha$  induite par le LPS dans des cellules microgliales (De Smedt-Peyrusse, et al. 2008). Chez la souris, un régime alimentaire enrichi en huile de poisson diminue la capacité des macrophages à produire de IL-6 sous l'effet du LPS (Sadeghi, et al. 1999). A l'inverse, un régime carencé en  $\omega$ 3 induit une surexpression d'IL-6 plasmatique et centrale (Mingam, et al. 2008). Les AGPI peuvent influencer les fonctions cellulaires de manière multiple. Ils peuvent modifier la structure et la fluidité membranaire (Stillwell and Wassall 2003) et ainsi médier l'activation des récepteurs membranaires par leur ligand comme c'est le cas pour les récepteurs du LPS (De Smedt-Peyrusse, et al. 2008) et le *T cell receptor* (Kim, et al. 2010).

La fluidité membranaire dépend du degré d'insaturation des AG incorporés dans les phospholipides (Stillwell and Wassall 2003). En changeant l'index de fluidité membranaire, les AGPI peuvent réguler les transmissions intracellulaires. De plus un des mécanismes d'action du DHA dépend du phospholipide dans lequel il est incorporé modulant son affinité pour le cholestérol. Le DHA estérifié dans une phosphatidyléthanolamine (PE) va repousser le cholestérol, l'effet inverse est observé lors d'une incorporation dans une phosphatidylcholine (PC) (Williams, et al. 2012). Le cholestérol étant l'un des composants majeurs des rafts, ils sont une cible privilégiée du DHA pouvant ainsi moduler leur composition et leur activité biologique.



## II- Matériel et Méthodes

### a) Modèle d'études

#### ***in vitro* : Lignée cellulaire BV2**

##### - Description

Les cellules BV2 sont une lignée cellulaire microgliale murine immortalisée par infection d'une culture primaire de microglies avec un rétrovirus oncogène J2 (Blasi, et al. 1990). Ces cellules possèdent les propriétés morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles de microglies (Henn, et al. 2009). Il a été montré au laboratoire, que les BV2 répondent à un traitement au LPS en produisant des cytokines. Les BV2 expriment le récepteurs du LPS (TLR4 et CD14) et la présence de microdomaines de type rafts au niveau membranaire ont été mis en évidence dans ces cellules (De Smedt-Peyrusse, et al. 2008).

##### - Utilisation

Nous avons utilisé les BV2 en tant que modèle *in vitro*. Cela nous a permis de tester des agents pharmacologiques comme la  $\beta$ -MCD et d'analyser l'influence des AGPI de type  $\omega$ 3 et  $\omega$ 6 sur la voie de signalisation de l'IL-6.

##### - Protocole

#### Entretien de la lignée

Les cellules sont maintenues en culture à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> dans un milieu RPMI 1640 glutamax (Invitrogen) supplémenté de 10% sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (Sigma) et dépourvu d'endotoxines et d'un cocktail d'antibiotiques contenant 0.1mg/ml de streptomycine et 100UI/ml de phenoxyenicilline (Sigma). A 80% de confluence, les cellules sont repiquées pour effectuer un passage. A ce stade, elles peuvent également être stockées dans de l'azote liquide. Dans ce cas, elles sont maintenues dans un milieu contenant 20% de SVF et 4% de diméthylsulfoxyde (DMSO) (cryoprotecteur) et congelées dans l'isopropanol à -80°C puis dans l'azote liquide pour préserver leur viabilité. Les cellules sont décongelées rapidement à 37°C, le DMSO est éliminé et remplacé du milieu RPMI enrichi en SVF (20%) puis elles sont cultivées dans le milieu de culture classique lorsque les cellules forment à nouveau un tapis.

#### Déprivation des cellules

Le traitement des cellules par différents agents nécessite une déprivation préalable du milieu de culture en SVF afin d'éliminer tous les facteurs qu'il contient de manière non maîtrisée (facteurs de croissance, dérivés lipidiques sériques...). Ces facteurs peuvent interagir avec les différents traitements. De plus, l'absence de SVF permet de bloquer les cellules en phase G0 du cycle cellulaire. Les BV2 sont cultivées en absence de SVF pendant 4 à 6 heures pour l'IL-6 et la  $\beta$ -MCD (partie n°1) ou pendant 24h pour les AGPI (partie n°2).

### Traitement cellulaire

- Traitement IL-6 et agent pharmacologique

Nous avons réalisé une dose réponse et une cinétique de l'effet de l'IL-6 et de la  $\beta$ -MCD sur l'activation de STAT3. Les conditions optimales déterminées sont les suivantes : après déprivation de 4 à 6h, les cellules sont traitées par l'IL-6 (10ng/mL) ou par la  $\beta$ -MCD (10mM) (partie n°1).

- Traitement aux AGPI

Des solutions mères d'AGPI (DHA, AA, DPA) ont été préparées à une concentration de 30mM après solubilisation dans une solution d'éthanol 100% bullée à l'azote. L'azote étant un gaz inerte, cette technique permet de chasser tous les gaz dissous dans la solution évitant l'oxydation des AGPI qui y sont sensibles en raison de leurs insaturations. Après détermination d'une dose réponse, les cellules BV2 ont été déprivées 24h puis cultivées 24h en présence de 30 $\mu$ M AGPI ou de 0.01% d'éthanol en conditions témoins dans du RPMI additionné de 50 $\mu$ M de BSA (AGPI free). Les cellules sont ensuite stimulées ou non par IL-6 (10ng/ml) pendant différentes périodes. L'analyse des protéines est réalisée en cytométrie de flux ou en Western Blot et l'analyse lipidique est réalisée par chromatographie gazeuse.

### ***In vivo* : souris C57/BL6J**

Partie n°1 : Nous avons utilisé des souris mâles C57/BL6J âgées de 9 semaines hébergées en cages collectives, en ayant un accès *ad libitum* à la nourriture et l'eau. Les souris ont reçu une injection intrapéritonéale (ip) de NaCl 9‰ (groupe Saline) ou de LPS (*escherichia coli*, sérotype 0127:B8; 100 $\mu$ g/kg ; groupe LPS). Elles ont été sacrifiées par décapitation après anesthésie à l'isoflurane à différents temps (0-30-60-120 minutes) post-injection pour établir la cinétique d'activation de la voie de signalisation de l'IL-6. Les cerveaux ont été rapidement isolés de la boîte crânienne, les hippocampes (HC) ont été prélevés par microdissection. Les échantillons ont été immédiatement congelés (carboglace) puis stockés à -80°C avant analyse.

Partie n°2 : Nous avons utilisé des souris mâles C57/BL6J âgées de 9 semaines ayant été soumis à un régime carencé ou équilibré en oméga 3 dès le 1<sup>er</sup> jour de leurs conceptions. Le régime carencé en  $\omega 3$  contient 6% de lipides provenant d'huile de tournesol (riche en acide linoléique, 18:2  $\omega 6$ ,) et le régime équilibré en  $\omega 3$  contient 6% de lipides provenant d'huile de colza (riche en acide  $\alpha$ -linoléique, 18:3  $\omega 3$ ). Elles ont été sacrifiées par décapitation après anesthésie à l'isoflurane puis les cerveaux ont été homogénéisés pour isoler les cellules microgliales *ex vivo*.

## **ex vivo : Cellules microgliales**

### - **Description**

Nous avons mis au point l'isolation des cellules microgliales issues de cerveaux d'animaux (souris C57BL6) à partir d'un protocole décrit par Wynne (Wynne, et al. 2010). Cette technique est basée sur la densité propre des cellules microgliales et permet de les isoler grâce à un gradient de Percoll. Ce traitement doux et isotonique isole les cellules tout en les maintenant en vie, ce qui représente un avantage pour étudier les réponses cellulaires.

### - **Utilisation**

Nous avons utilisé cette méthode afin d'évaluer la réponse microgliale à l'IL-6 de souris ayant reçu un régime soit équilibré soit carencé en AGPI  $\omega 3$ . Les cellules ont été analysées en cytométrie de flux pour visualiser les récepteurs spécifiques à l'IL-6 et par Western Blot pour évaluer le taux de phosphorylation de STAT3 après stimulation à l'IL-6.

### - **Protocole**

#### Broyage des cerveaux

Les cerveaux ont été isolés de la boîte crânienne et homogénéisés dans 20mL de milieu *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) par passage au travers d'un filtre sur nylon (70 $\mu$ m). Cette étape permet d'isoler les cellules et limiter les amas cellulaires.

#### Gradient de Percoll

Le filtrat a été centrifugé 6 minutes à 600g. Le culot cellulaire a été repris dans une solution de Percoll 70% isotonique à température ambiante. Un gradient discontinu a été obtenu par dépôts successifs de solutions de Percoll à des concentrations décroissantes (70%-50%-15%-0%) puis centrifugé 20minutes à 2000g. Les microglies forment un anneau à l'interface 70%-50% du gradient qui est collecté. Les cellules ont été lavées et reprises dans du HBSS stérile.

### Caractérisation et évaluation de la viabilité cellulaire

Ces cellules purifiées ont été identifiées en cytométrie de flux par l'expression de deux protéines spécifiques microgliales : deux protéines de surface (CD11b, CD45). La viabilité cellulaire a été évaluée par le 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) dans des cellules non perméabilisées et non fixées. Le DAPI est une molécule fluorescente se liant aux bases adénine (A) et thymine (T) de l'ADN. La mort cellulaire entraîne une fragmentation de l'ADN accessible au DAPI. Le DAPI absorbe la lumière UV (350 nm) et émet une fluorescence bleue brillante (450-490 nm), ce qui permet de détecter et quantifier l'ADN par cytométrie de flux. Le marquage d'une cellule par le DAPI indique que cette cellule est morte.

### Traitement cellulaire

Les cellules isolées ont été stimulées ou non avec de l'IL-6 (10ng/mL) pendant 30 minutes. Après extraction protéique, l'analyse de l'activation de STAT3 a été réalisée par Western Blot.

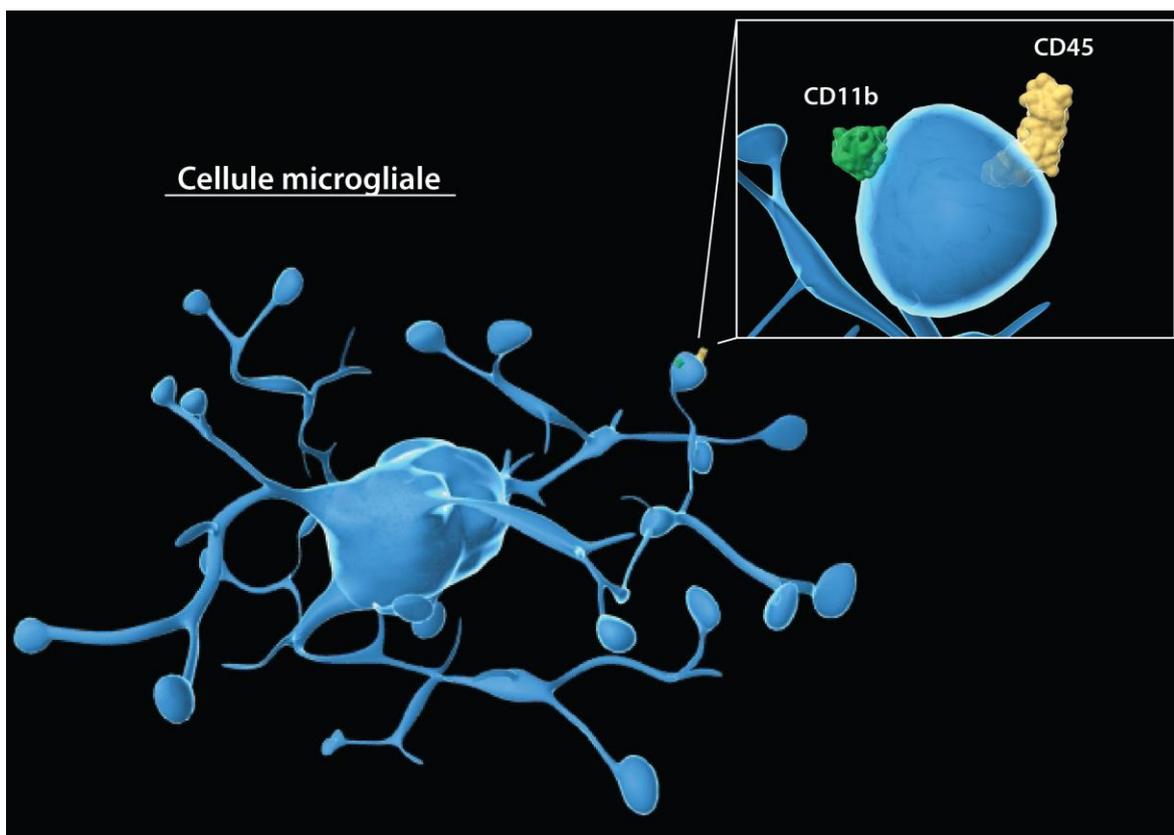


Schéma 6 : Représentation d'une microglie et ses protéines de surface CD11b et CD45

## **b) Méthodes de biologie cellulaire**

### **Compartmentation cellulaire**

#### **- Description**

Cette méthode permet, à l'aide des propriétés physiques des différents compartimentations cellulaires, d'obtenir des extraits enrichis en membranes plasmiques (MP), cytosol (C), microsomes (Mi) et noyaux (N), selon le protocole décrit par Sehgal (Sehgal, et al. 2002).

#### **- Utilisation**

Pour déterminer la cinétique d'activation de la voie JaK2/STAT3 et la localisation subcellulaire de JaK2 et STAT3, nous avons réalisé des fractionnements subcellulaires à partir d'hippocampes de souris sacrifiées à différents temps (0, 30, 60, 90 et 120 min) après injection de LPS.

#### **- Protocole**

Chaque hippocampe a été homogénéisé à l'aide d'un potter verre-verre dans 400µL de tampon d'extraction (MES NaCl 25mM pH 6,5, *protease inhibitor cocktail* (Sigma), cocktail anti-phosphatase (SeT3 Calbiochem)). Une première centrifugation à basse vitesse (2000g, 15minutes) permet d'isoler les noyaux dans le culot. Le surnageant est centrifugé 15min à 20000g pour obtenir la fraction microsomale dans le culot. Le surnageant est à nouveau centrifugé 2h à 100000g (ultracentrifugeuse) pour séparer le cytoplasme des membranes plasmiques contenues dans le culot final. La concentration protéique est déterminée par la méthode BCA et une quantité protéique égale de chaque fraction est déposée sur gel SDS PAGE (10%) pour analyse en Western Blot. La présence de Flotilline, GAPDH et d'histone H3 sont des marqueurs spécifiques de chaque fraction, respectivement les membranes, le cytoplasme et les noyaux.

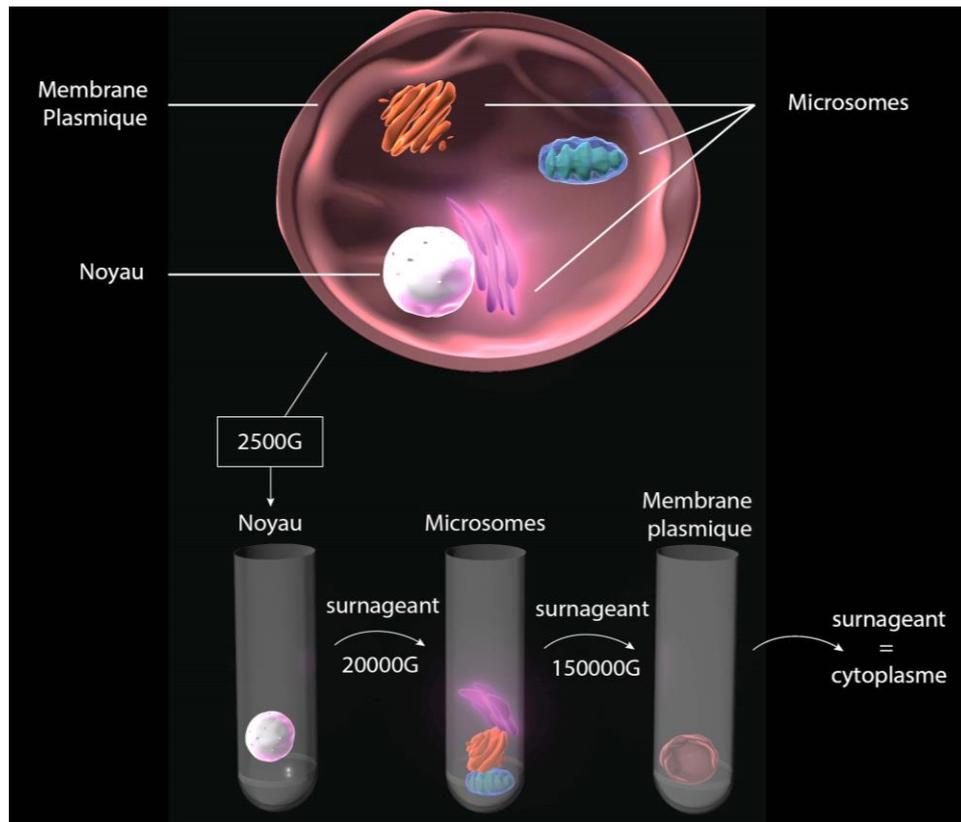


Schéma 7 : Protocole expérimental de la compartimentation cellulaire

## Immunoprécipitation

### - Description

L'immunoprécipitation (IP) permet d'isoler et de concentrer une protéine présente dans un extrait tissulaire par un anticorps s'associant spécifiquement à cette protéine cible. Les immunoglobulines du complexe anticorps-antigène se fixent par affinité sur des billes ou des colonnes couplées avec la protéine A et/ou G. Cette technique permet de mettre en évidence des interactions protéiques sous forme de complexes et de caractériser des formes post-traductionnelles (ex phosphorylations) faiblement exprimées.

### - Utilisation

Nous avons utilisé cette technique pour mettre en évidence les protéines complexées à JaK2 dans l'hippocampe et dans les cellules BV2 soumises à différents traitements.

### - Protocole

Les protéines sont extraites et dosées (voir §Western Blot). Les homogénats tissulaires contenant 250µg de protéines sont incubés en présence de 5µl d'anticorps anti-JaK2 16h à 4°C sous

agitation. Les billes d'agarose (Protein A/G PLUS Agarose) couplées avec des protéines A/G (50µl) sont ajoutées aux extraits pendant 4h. Le surnageant de l'IP est prélevé et les billes d'agarose sont lavées dans du tampon de lyse. L'extrait total initial (50µg), le surnageant IP (50µg) et le culot IP (total) ont été analysés en Western Blot afin d'identifier la phosphorylation de Jak2 sur les résidus Y1007/1008 et Y221 et l'association de Jak2 avec STAT3 et Phospho-STAT3.

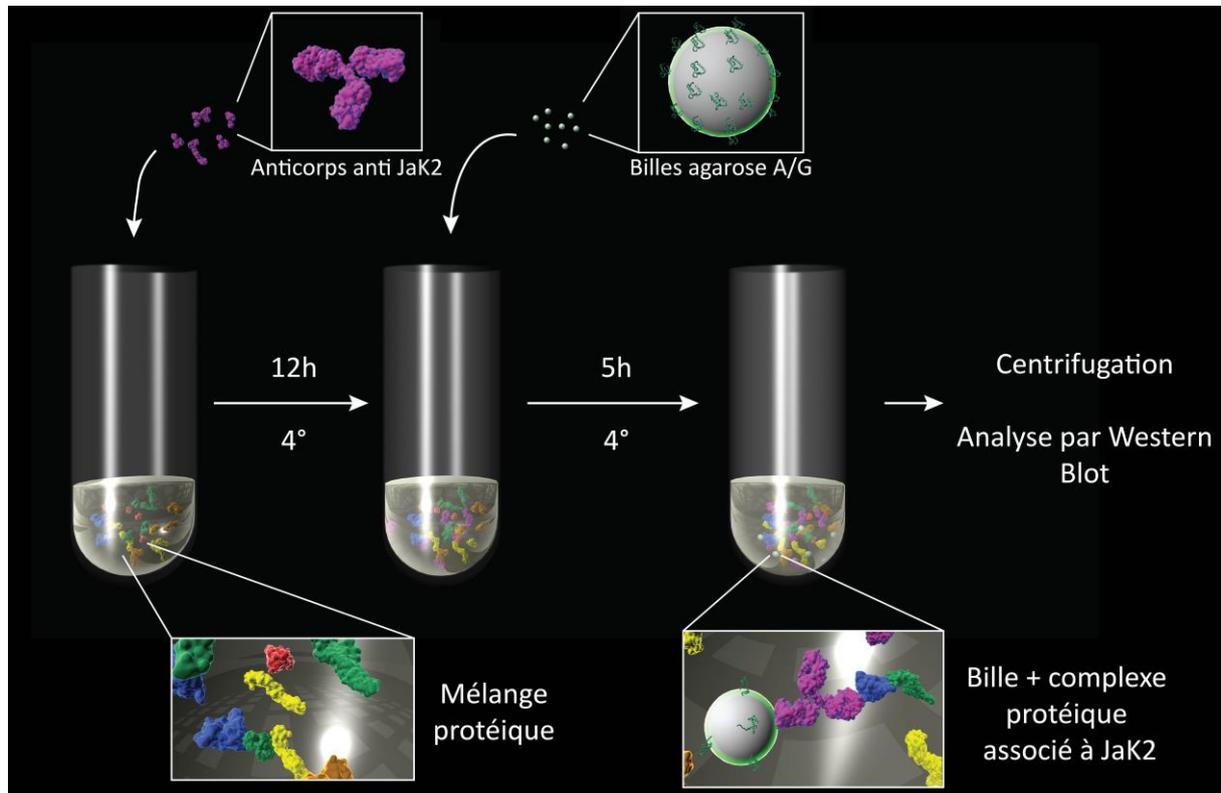


Schéma 8 : Protocole expérimental de l'immunoprécipitation

## Isolation des rafts sur hippocampe

### - Description

Le principe de cette méthode repose sur l'insolubilité des rafts aux détergents de type triton liée à leur forte teneur en cholestérol. Ces plateformes insolubles sont isolées grâce à un gradient de densité. La présence des rafts dans la fraction purifiée est validée par la présence de flotilline (Sawin, et al. 2008).

### - Utilisation

Nous avons mis au point cette technique de purification des rafts à partir d'hippocampes pour étudier la répartition membranaire des protéines de la voie Jak2/STAT3.

### - Protocole

### Extraction protéique et élimination de la myéline

La myéline doit être éliminée car elle modifie la densité des membranes et crée un artefact pour l'isolation des rafts. Pour cela, un pré-gradient est réalisé. Un hippocampe est homogénéisé dans un potter verre-verre dans 1 ml d'une solution de saccharose 0.85M/ MES NaCl en présence de 100µl de PIC (Sigma) et d'anti-phosphatase (SeT3 Calbiochem). Un volume de 2ml de MES est déposé avec précaution sur l'homogénat. Après centrifugation 15min à 55000 rpm, la phase supérieure du pré-gradient est éliminée et la couche de myéline flottant à l'interface tampon/0.85M est prélevée.

### Préparation des membranes totales

Pour éliminer le saccharose, le culot est repris dans 3mL de MES puis centrifugé 15 min, à 55000rpm. Le culot final est repris dans 200µL de MES. Ce culot contient l'ensemble des membranes (membranes plasmiques, golgienne et du réticulum endoplasmique).

### Dosage des protéines par BC Assay (voir §Western Blot)

### Traitement au détergent

Les lipides rafts, riches en cholestérol, sont insolubles aux détergents non-ioniques comme le Triton X-100. Pour chaque échantillon, 1mg de membranes totales est traité en présence de 1% de Triton X-100 (concentration finale) avec un rapport protéine/triton de 1/4 (w/w) dans les conditions suivantes :

<b>Volume protéique (µL)=1mg</b>	X
<b>MES qsp 240µL</b>	240 - X
<b>PIC</b>	40µL
<b>Triton X-100 10%</b>	40µL
<b>Total</b>	Y
<b>MES qsp 1%</b>	400 - Y
<b>Volume total</b>	400µL

### Préparation des gradients

Après 45 minutes d'incubation à 4°C, l'homogénat est complété avec 1600µL de saccharose 60% pour atteindre une concentration finale de 48% en saccharose. Le gradient suivant est monté :

<b>48%</b>	2000 µL
<b>35%</b>	3000 µL
<b>25%</b>	3000 µL
<b>15%</b>	3000 µL

Après l'équilibrage des tubes, une centrifugation à 4°C pendant 16h à la vitesse de 150000G est lancée. A la fin de la centrifugation, 8 fractions de 1500µl sont collectées, la fraction enrichie en rafts flottant à l'interface 35-25% de saccharose. Les protéines de chaque fraction ont été dosées, précipitées en acide trichloracétique TCA (15%) et analysées en Western Blot.

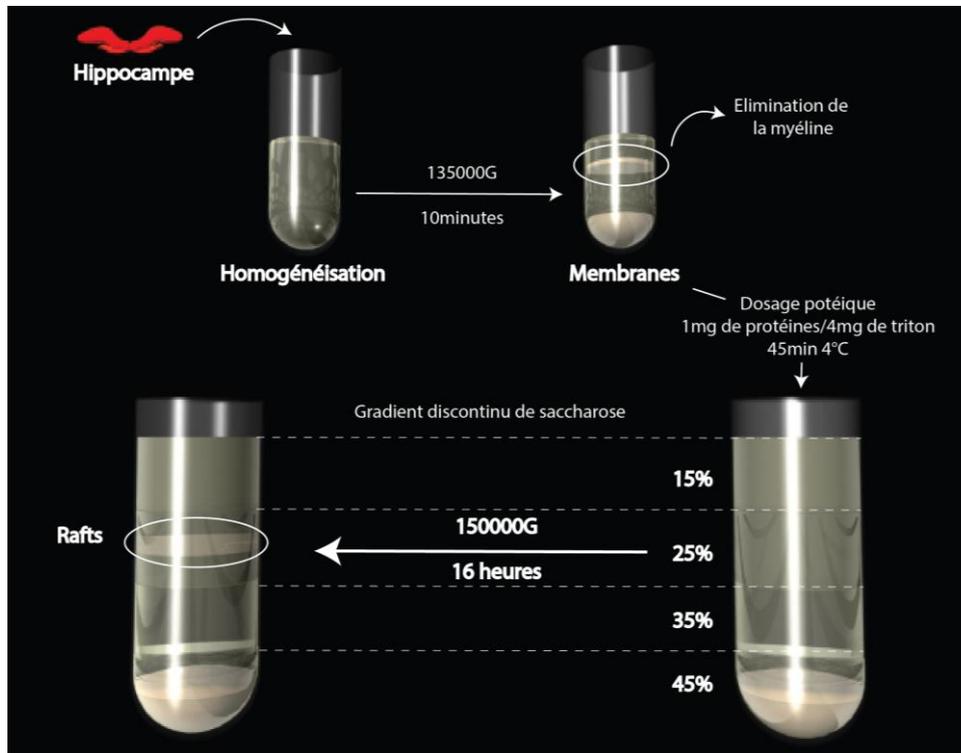
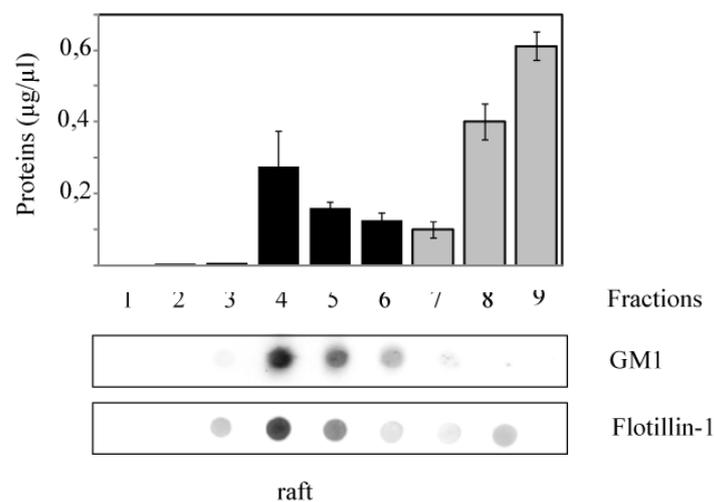


Schéma 9 : Protocole d'isolation des lipides rafts.

Les fractions contenant des rafts à partir d'extraits membranaires ont été caractérisées selon les critères suivant : Faible concentration protéique, présence de gangliosides M1 (GM1) et de flotilline-1, constituant spécifiques des domaines rafts comme illustré dans la figure 4.



**Figure 4 :** Identification des rafts à partir d'hippocampes de souris le long d'un gradient de sucrose discontinu de 15 à 48%.

Des fractions de 1.5ml ont été collectées le long du gradient A) Graphe représentant le profil protéique mesuré dans les fractions de 1 à 9 B) Dot blot révélé avec la toxine cholérique HRP et un anticorps anti-flotilline-1 pour la détection de GM1 et de la flotilline-1 respectivement. Les rafts sont identifiés dans les fractions 4 et 5 à l'interface 25-35% de concentration de sucrose.

### **c) Méthodes d'analyse**

#### **Western Blot**

##### **- Description**

La technique du Western Blot permet d'identifier spécifiquement une protéine donnée dans un échantillon biologique. C'est une technique qualitative (présence ou absence de protéine) et semi-quantitative car elle permet de mesurer des variations de quantité d'une protéine donnée par rapport à une protéine de référence dont l'expression ne varie pas quel que soit le traitement. Elle permet également d'évaluer la modification post-traductionnelle des protéines comme la phosphorylation.

##### **- Utilisation**

Nous avons utilisé cette technique pour évaluer l'expression des protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'IL-6 : GP130, GP80, Jak2, STAT3 et quantifier le taux de phosphorylation de STAT3 et Jak2. Cette méthode nous a permis de caractériser les fractions obtenues après fragmentations subcellulaires ou isolation des rafts, avec les protéines Flotilline-1, GAPDH, Histone H3.

##### **- Protocole**

#### **Extraction protéique**

- Hippocampe de souris

Chaque hippocampe est homogénéisé dans un potter verre-verre dans 400µL d'une solution de MES NaCl, additionné de 100µL d'un cocktail inhibiteur de protéases (PIC) et d'anti phosphatases (SeT3 Calbiochem).

- Cellules BV2

Les BV2 sont homogénéisées dans 100µL de tampon de lyse (20mM Tris HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM NaF, 10mM Na orthovanadate, et un cocktail inhibiteur de protéase). Les cellules sont ensuite broyées mécaniquement par 40 passages au travers une aiguille 26G ½.

#### **Dosage protéique par BC Assay**

Le dosage protéique est une étape indispensable à l'analyse semi-quantitative des protéines en Western blot quand il s'agit de comparer l'expression d'une protéine parmi une quantité fixe de protéines totales dans différentes conditions expérimentales. Les protéines sont dosées par une méthode colorimétrique dont le principe repose sur la réduction du  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  par les protéines,  $\text{Cu}^+$  formant un complexe avec l'acide bicinchonique de coloration violette proportionnel à la concentration protéique. La densité optique (DO) est mesurée grâce à un spectrophotomètre (VICTOR 3V Perkin Elmer) à une longueur d'onde  $\lambda=562\text{nm}$ . La DO est convertie en concentration de protéines grâce à une courbe étalon ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) réalisée à partir d'albumine bovine (kit Micro ABC Assay ; Uptima). La concentration protéique des extraits tissulaires est déterminée pour contrôler la quantité de protéines déposées en Western Blot.

### Electrophorèse

Les protéines extraites et quantifiées ( $50\mu\text{g}$ ) à partir des homogénats tissulaires sont dénaturées pendant 5 min à  $100^\circ\text{C}$  dans du tampon de charge 5x. Le tampon de charge contient du  $\beta$ -mercaptoéthanol, un agent réducteur dissociant les ponts dissulfures et du sodium dodecyl sulfate (SDS) imposant aux protéines une charge négative. Les échantillons et les marqueurs de poids moléculaires (Fermentas) sont déposés dans un gel d'acrylamide 10%. Les protéines soumises à un courant de 90 à 120V migrent sur un même front de migration dans un tampon de migration (Tableau 1) visualisé grâce au bleu de bromophénol contenu dans le tampon de charge. Les protéines migrent en fonction de leur poids moléculaire dans un gel de séparation dont le pourcentage en acrylamide est déterminé en fonction du poids moléculaire des protéines étudiées.

### Transfert

A la fin de la migration, le gel d'électrophorèse est placé sur une membrane de fluorure de polyvinyle (PVDF Immobilon, Millipore) préalablement activée dans du méthanol, dans un appareil de transfert liquide (Bio-Rad), en sandwich entre deux feuilles de papier Whatmann humidifiées dans du tampon de transfert (Tableau 1). Les protéines chargées négativement migrent vers l'anode grâce à l'application d'un courant électrique de 75V pendant 1h30 à  $4^\circ\text{C}$ .

Tableau 1: composition du tampon de migration et de Transfert

Composants	Tampon de migration	Tampon de transfert
Tris	3,03g/l	3,03g/l
Glycine	14,42g/l	14,42g/l
SDS (20%)	0,5%	
Ethanol		20%

## Immunodétection

Après le transfert, la membrane est incubée dans une solution de rouge Ponceau, qui colore les protéines, permettant d'apprécier la qualité du transfert. La membrane est ensuite lavée dans du TBS-T (Tris Buffer Salin : Tris 0.05mM ; NaCl 0.15M ; pH 7.5) additionnée de Tween à 0.1%), puis les sites non spécifiques des protéines ont été saturés avec une solution de lait écrémé 5%-TBS-T pendant 1h à température ambiante. La membrane est ensuite rincée dans du TBS-T et incubée en présence de l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt dilué dans 5% de BSA TBS-T + azide de sodium 0,01% pendant 16h à 4°C (*Tableau 2*).

Tableau 2: origine et dilution des anticorps primaires

Anticorps (PM kDa)	Source	Dilution	Anticorps (PM kDa)	Source	Dilution	Anticorps (PM kDa)	Source	Dilution
<b>P-JaK2 (135)</b>	Lapin	1/500	<b>Flotilline (47)</b>	Souris	1/1000	<b>GP130 (130)</b>	Lapin	1/500
<b>JaK2 (135)</b>	Lapin	1/1000	<b>GAPDH (40)</b>	Lapin	1/1000	<b>GP80 (80)</b>	Lapin	1/500
<b>P-STAT3 (95)</b>	Lapin	1/500	<b>Actine (42)</b>	Lapin	1/1000	<b>GFAP (50)</b>	Lapin	1/500
<b>STAT3 (95)</b>	Lapin	1/1000	<b>Histone (17)</b>	Lapin	1/1000			

Après plusieurs lavages dans du TBS-T, la membrane est incubée 1h à TA dans une solution de lait écrémé 5%-TBS-T contenant l'anticorps secondaire dirigé contre les immunoglobulines de l'espèce animale chez laquelle l'anticorps primaire a été produit. Ces anticorps secondaires sont couplés à la peroxydase du raifort (HRP : Horse Raddish Peroxydase) qui permet la détection immuno-enzymatique de la protéine d'intérêt par un procédé luminescent. La membrane est incubée 1min dans une solution *Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus* (PerkinElmer Life Science, Boston MA, USA) contenant un agent luminescent, le luminol, catalysé par la peroxydase (HRP) fixée sur l'anticorps secondaire couplé. Le produit de la réaction émet une luminescence proportionnelle à la concentration de la protéine. La lumière émise est captée par des caméras qui restituent une image numérique du signal (Syngene).

Après détection d'une protéine d'intérêt, les membranes peuvent être déshybridées 15 min dans un tampon de déshybridation (Reblot+, Millipore) et réutilisées pour analyser une autre protéine.

La densitométrie (logiciel Genetools) des immunoblots permet la quantification de la protéine recherchée par rapport à une protéine de référence dont l'expression est constante (Actine, Flotilline /extraits membranaires, GAPDH/cytosol, Histone/extraits nucléaires). Dans le cas de l'évaluation de la phosphorylation d'une protéine donnée, le ratio protéine phosphorylée/protéine totale est établi grâce à des anticorps dirigés spécifiquement contre un site phosphorylé de la protéine (PY705 STAT3, PY1007/1008 JaK2, PY221 JaK2).

## Le dot Blot

Le Dot blot permet de réaliser un criblage qualitatif de l'expression de protéines dans un homogénat. Les protéines sont déposées sur une plaque de 96 puits et transférées directement sur une membrane de PVDF par aspiration sous vide. La détection protéique est similaire à celle du Western Blot. Nous avons utilisé cette technique pour la mise en évidence de protéines associées aux lipides rafts (STAT3, Flotilline, GM1).



Photo 1 : appareil de transfert dot blot (Biorad)

## Cytométrie de flux

### - Description

La cytométrie en flux est une technique qui permet de mesurer dans une suspension cellulaire, les caractéristiques individuelles de chaque cellule telles comme la taille et la forme et un ou plusieurs composants comme des récepteurs ou des protéines (extra ou intracellulaires) marqués un composé fluorescent. Les cellules en suspension passent une à une devant un ou plusieurs faisceau(x) laser et des détecteurs captent des signaux émis par chaque cellule tels que : la lumière diffusée aux petits angles (Forward Scatter, FSC) qui renseigne sur la taille des particules ; la lumière diffusée à 90 degrés (Side Scatter, SSC) qui renseigne sur la forme, la structure interne et la granularité des particules ; les signaux de fluorescence émis par la cellule elle-même (autofluorescence) ; la fluorescence émise par un anticorps couplé à un fluorochrome et qui se lie spécifiquement à la cellule.

### Le cytomètre

Un cytomètre est un appareillage comprenant quatre composantes. 1) La partie fluidique intervient dans la séparation et l'alignement des particules, le tri et la vitesse d'analyse. 2) La composante optique représente l'ensemble des sources lumineuses, détecteurs, filtres et miroirs dichroïques. 3) L'électronique contient tous les collecteurs et analyseurs des signaux optiques, l'affichage des données, le contrôle des sources lumineuses et le contrôle des détecteurs. 4) l'analyse des données contient l'ensemble des affichages, identification des sous-populations, quantification des populations. Nous avons utilisé un cytomètre Fortessa (BD Bioscience). Ce cytomètre à haute vitesse peut analyser 40 000 évènements par seconde, un évènement correspondant à une particule,

bille ou cellule passant devant le rayon laser. Le volume d'échantillon minimum est de 100µL avec une vitesse de flux comprise entre 6 et 120µL/minute.

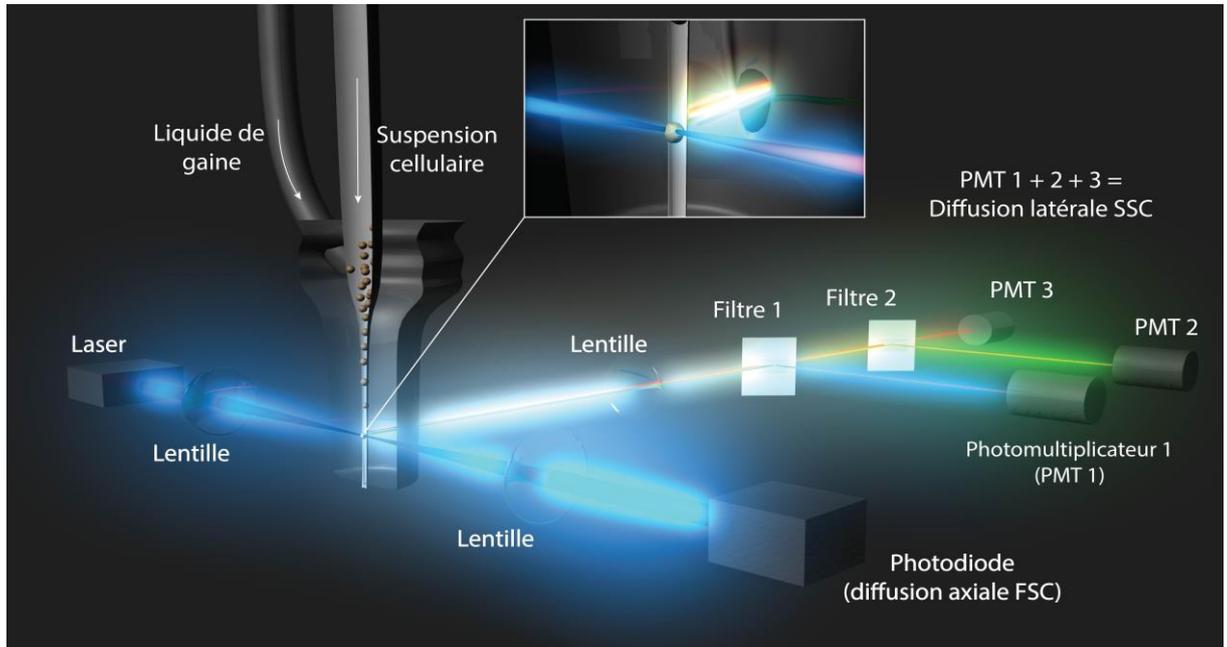


Schéma 10 : Composantes d'un cytomètre de flux

### Les fluorochromes

Un fluorochrome est une substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation. Couplé à un anticorps spécifique, le fluorochrome permet de détecter l'expression d'une protéine d'intérêt. Il se caractérise par une longueur d'onde d'excitation ( $\lambda_{ex}$ ) et par une longueur d'onde d'émission ( $\lambda_{em}$ ) spécifique du retour à un état stable du fluorochrome après excitation. (Figure 1). En cytométrie de flux, les fluorochromes sont excités par des lasers.

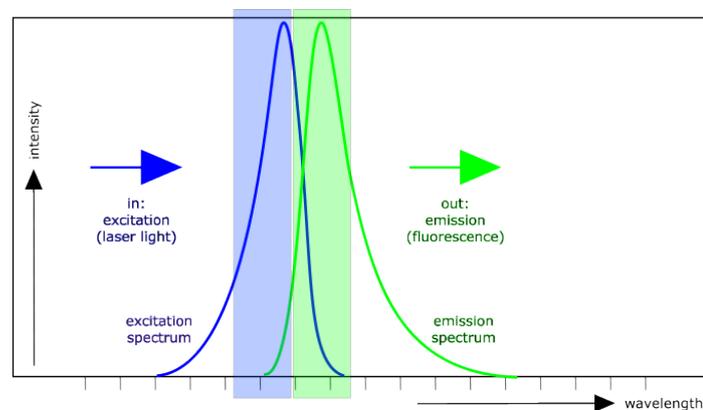


Figure 1 : Représentation du spectre d'excitation et d'émission d'un fluorochrome

Les marqueurs fluorescents les plus fréquemment utilisées sont la fluoresceine isothiocyanate (FITC) ( $\lambda_{\text{exc}}=495\text{nm}$  et  $\lambda_{\text{em}}=520\text{nm}$ ), la phycoérythrine (PE) ( $\lambda_{\text{exc}}=480\text{nm}$  et  $\lambda_{\text{em}}=580\text{nm}$ ) et l'allophycocyanin (APC) ( $\lambda_{\text{exc}}=650\text{nm}$  et  $\lambda_{\text{em}}=660\text{nm}$ ). Dans le cas d'utilisation simultanée de plusieurs anticorps marqués, le choix des marqueurs dépend de leurs longueurs d'ondes d'émission qui doivent être distinctes comme c'est le cas pour l'APC et la PE (figure 2).

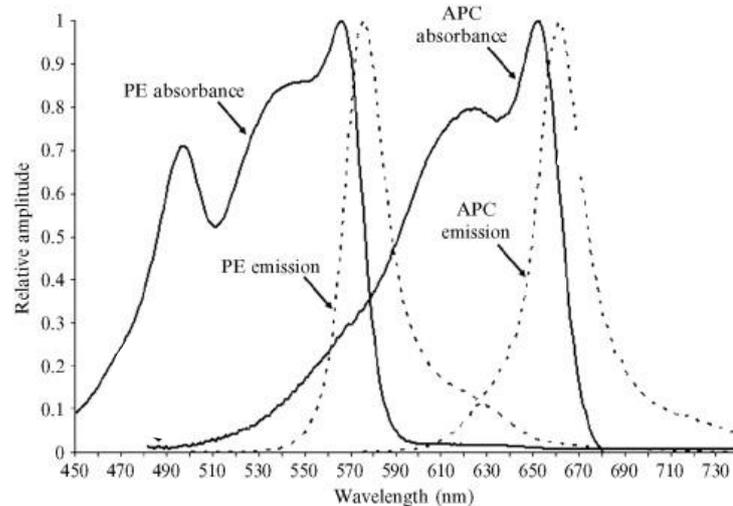


Figure 2 : Représentation du spectre d'excitation et d'émission de l'APC et de la PE

### Analyse des données

Les données se présentent sous forme de graphiques, d'histogrammes ou de dot plot auxquels s'ajoutent des statistiques concernant les populations cellulaires et les paramètres étudiés (% , CV, intensité de fluorescence, etc.). Les histogrammes représentent la fluorescence relative par rapport au nombre d'évènements (count). La représentation en « dot Plot », la taille de chaque cellule est analysée en fonction de sa granulosité (SSC en fonction de FSC), ceci permet de détecter un petit nombre d'évènements dans une population de cellules spécifiquement identifiés.

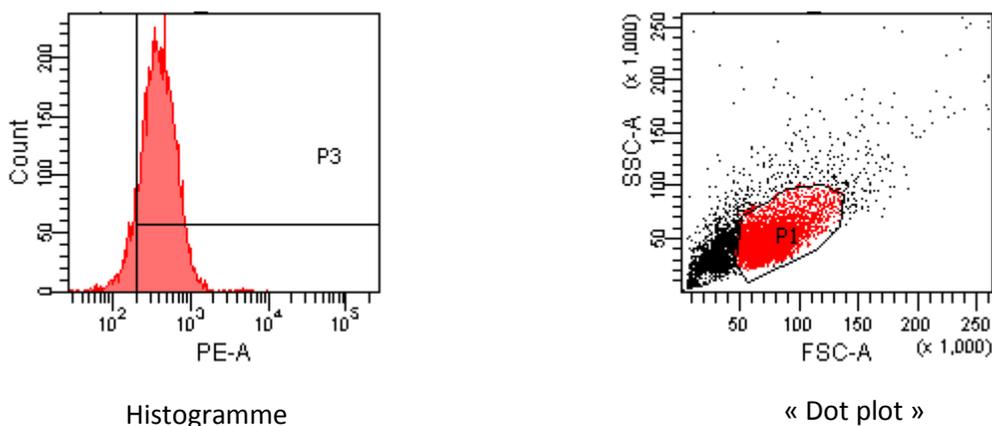


Figure 3 : Représentation des valeurs numériques en cytométrie de flux

- **Utilisation**

Nous avons utilisé cette technique pour quantifier les protéines de surfaces GP130 et GP80 des cellules BV2 (partie n°1) et des cellules microgliales purifiées *ex vivo* identifiées par CD11b (Henry, et al. 2009) et CD45 (partie n°2). Cette caractérisation nous a permis de comparer l'expression des récepteurs de l'IL-6 dans les cellules microgliales issues de souris soumises à une diète équilibrée ou carencée en omega3. Cette méthode n'était pas utilisée au laboratoire jusqu'à présent et a nécessité de nombreuses mises au point.

- **Protocole**

Entre 200000 et 500000 cellules BV2 (partie n°1) ou cellules microgliales isolées *ex vivo* (partie n°2) sont incubées en présence d'anticorps dirigés contre les récepteurs de surface CD16/CD32 (1µl dans 100µL de PBS contenant 0.1% de BSA) pendant 30 min à 4°C. Cette étape de saturation permet de neutraliser les récepteurs des fractions Fc des IgG (CD16/CD32) présents à la surface des cellules microgliales. Les cellules microgliales isolées *ex vivo* sont caractérisées par l'expression des récepteurs de surface CD11b et CD45. Un ou plusieurs anticorps primaires couplés à différents fluorochromes ou leurs isotypes correspondant (contrôles) sont ajoutés à la suspension cellulaire et incubés pendant 30 min à 4°C à l'abri de la lumière. Après deux rinçages dans du PBS 0.1% BSA, les cellules sont remises en suspension dans 250µL de PBS 0.1% BSA et analysées par le cytomètre.

## **Analyse des acides gras dans les lipides membranaires des cellules BV2**

Cette analyse a été réalisée en collaboration avec l'UMR 1324 INRA- 6265 CNRS équipe Flavic dirigée par Dr Brétilon à Dijon. Les lipides issus des membranes de cellules BV2 ont été extraits (Folch, et al. 1957) et les acides gras ont été transméthylés (Morrison and Smith 1964). Les acides gras méthyl esters ont été analysés par chromatographie à gaz et colonne à capillaire de silice. L'hydrogène a été utilisé comme transporteur. Les acides gras méthyl esters ont été identifiés en comparaison avec des standards commerciaux.

## **Analyse statistique**

Les données ont été analysées avec le logiciel GraphPad Prism et comparées en utilisant le Student's *t*-test par rapport au contrôle. Elles sont exprimées en moyenne ± SEM.,  $p < 0.05$  est considéré comme statistiquement significatif.



### III- Etude 1 – Caractérisation de l’activation de la voie JaK2/STAT3

#### a) Objectifs

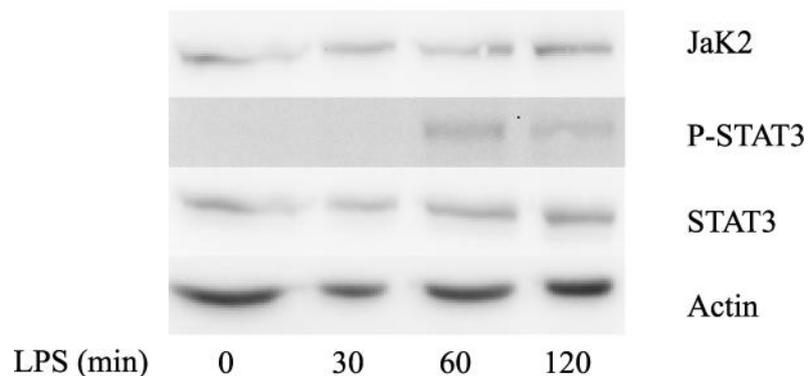
L’objectif de cette étude a été de caractériser l’activation de la voie de signalisation de l’IL-6 à la fois dans l’hippocampe de souris sous l’effet du LPS et dans la lignée microgliale murine BV2 pour répondre aux questions suivantes : Quelle est la dynamique d’activation de la voie de l’IL-6 induite par le LPS en relation avec la localisation subcellulaire des protéines signalisantes JaK2/STAT3 ? Les lipides rafts sont-ils impliqués dans ce processus ?

#### b) Résultats

##### Etude *in vivo* : Hippocampe de souris

##### **Cinétique d’activation de STAT3 induite par le LPS dans l’hippocampe de souris**

Nous avons précédemment montré que, 120 min après administration de LPS par voie intrapéritonéale (ip) (100µg/kg), STAT3 était activé dans l’hippocampe de souris (Mingam, et al. 2008). Cette activation se traduit par la phosphorylation du résidu tyrosine 705 (P-STAT3) de STAT3. Dans notre étude, nous avons analysé l’expression des protéines JaK2 et STAT3 et déterminé la cinétique précise d’activation de STAT3, 30, 60 et 120min post LPS dans des extraits hippocampiques totaux. Comme l’indique la Fig.5 représentant un western blot révélé par JaK2, P-STAT3 (Y705), STAT3 et l’actine comme contrôle protéique interne, nous avons déterminé que la phosphorylation de STAT3 était induite par le LPS dès 60 min.



**Figure 5 :** Cinétique d’activation de STAT3 par le LPS dans l’hippocampe

Des hippocampes de souris ont été isolés 0, 30, 60 et 120 minutes post injection de LPS ip. Western Blot représentant l’expression de JaK2, phospho STAT3 (P-Y705), STAT3 et de l’actine comme contrôle à partir d’extraits tissulaires contenant 50µg de protéines.

## **Localisation subcellulaire de STAT3 et effet du LPS**

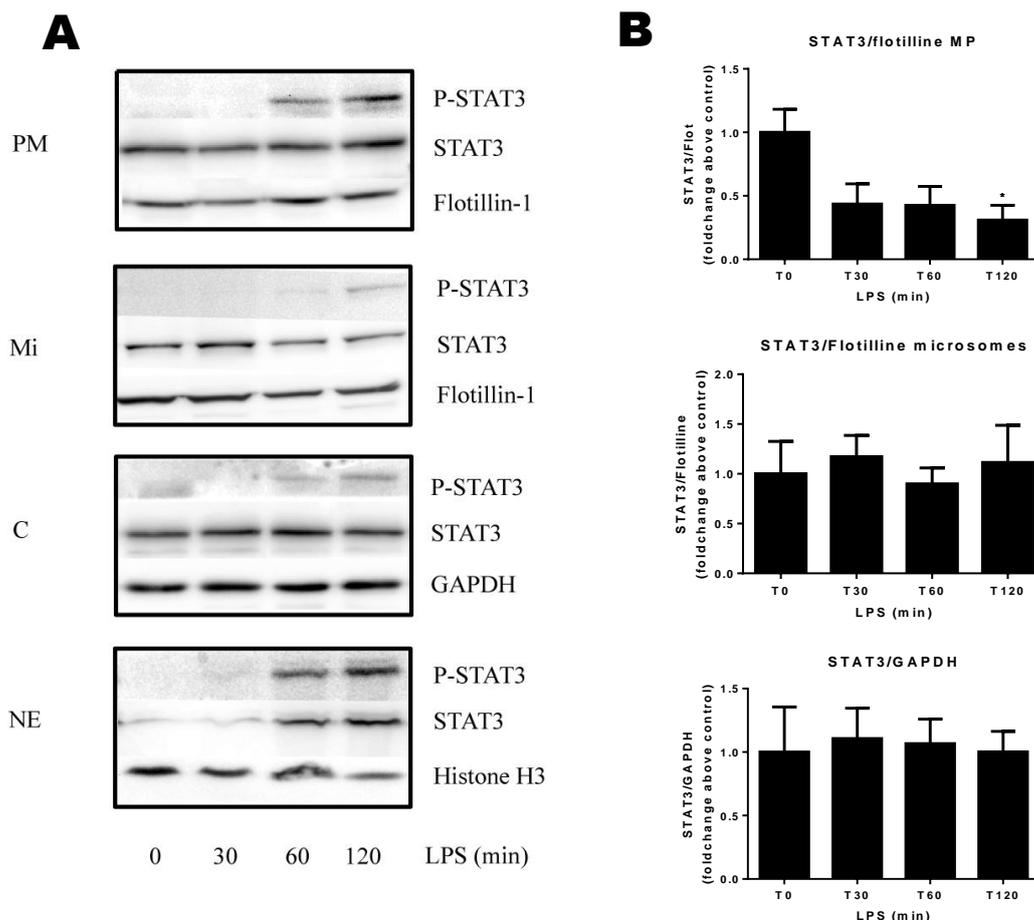
STAT3 a longtemps été considéré comme un facteur cytoplasmique soluble transloquant dans le noyau sous l'effet d'un signal de transduction dont celui de l'IL-6. Cependant, une association de STAT3 à la membrane plasmique dans une lignée hépatique humaine a été décrite (Sehgal, et al. 2002) (Ndubuisi, et al. 1999). Ces données nous ont conduits à analyser l'expression de STAT3 et son activation dans des fractions subcellulaires dans l'hippocampe de souris après LPS (ip) au cours de la cinétique établie précédemment (Fig.5). Dans l'expérience illustrée Fig.6, les hippocampes ont été fractionnés par centrifugations successives pour extraire les membranes plasmiques (PM), les microsomes (Mi), le cytosol (C) et les noyaux (N) identifiés par les marqueurs suivants : Flotillin-1 (MP et Mi), GAPDH (C) et Histone H3 (N).

### **a) Expression subcellulaire de STAT3**

En absence de stimulation, STAT3 est présent dans les extraits membranaires (membranes plasmiques et microsomes) et dans le cytoplasme mais pas dans les extraits nucléaires (Fig.6). Le LPS induit l'accumulation de STAT3 dans les noyaux en 60min. Parallèlement, la quantification de STAT3 associé à la membrane plasmique (MP) relative à l'expression de la flotilline-1 indique que le LPS induit une diminution de l'expression de STAT3 associé à la membrane plasmique (Fig.6B) significative à 120min. En revanche, Le LPS ne modifie pas l'expression cytoplasmique et microsomiale de STAT3 qui reste stable 120min après traitement.

### **b) Activation de STAT3**

Comme attendu, STAT3 n'est pas phosphorylé dans les conditions contrôles. Une faible activation de STAT3 est détectable dans les extraits membranaires dès 30 min et augmentent pour atteindre un plateau à 60min. Parallèlement, le pool de STAT3 nucléaire détecté 60min après LPS est fortement phosphorylé. Une faible phosphorylation de STAT3 est révélée dans les extraits cytoplasmiques et microsomiaux 60min après LPS.



**Figure 6 :** Localisation subcellulaire de STAT3 et activation de STAT3 par le LPS dans l'hippocampe. Compartimentations subcellulaires réalisées à partir d'hippocampes de souris isolés 0, 30, 60 et 120 minutes post injection de LPS ip. Des extraits protéiques (50µg) de membranes plasmiques (PM), microsomes (Mi), cytoplasme (C) et noyaux (NE) ont été analysés par Western Blot A). Western Blot représentatif de 3 expériences indépendantes révélés par anti-phospho STAT3 (P-Y705), anti-STAT3, anti-flotillin-1 (MP et Mi), anti GAPDH (C) et anti-histone H3 (NE) (B) Graphes représentant l'expression de STAT3 normalisée par rapport à celle des marqueurs des fractions subcellulaires (C) Graphes représentant le ratio de P-STAT3 normalisé par rapport à STAT3 (ratio P-STAT3/STAT3). L'expression de protéines est mesurée par densitométrie (genetools software). \* $p < 0.05$

***L'ensemble de ces résultats indiquent la présence de deux pools de STAT3 dans des conditions basales : un pool cytoplasmique et un pool associé aux membranes plasmiques et aux microsomes comme il a été décrit dans les cellules hépatiques (Guo, et al. 2002). Le LPS, dont l'action est sous tendue par l'IL-6, induit une redistribution de STAT3 de la membrane plasmique au noyau dans l'hippocampe de souris et la phosphorylation de STAT3 au niveau membranaire. Ainsi, STAT3 membranaire phosphorylé transiterait vers le noyau via le Reticulum Endoplasmique et l'appareil de Golgi (microsomes). Le STAT3 cytosolique pourrait servir de réservoir de STAT3 comme facteur de transcription latent.***

## **Localisation subcellulaire de JaK2 et effet du LPS**

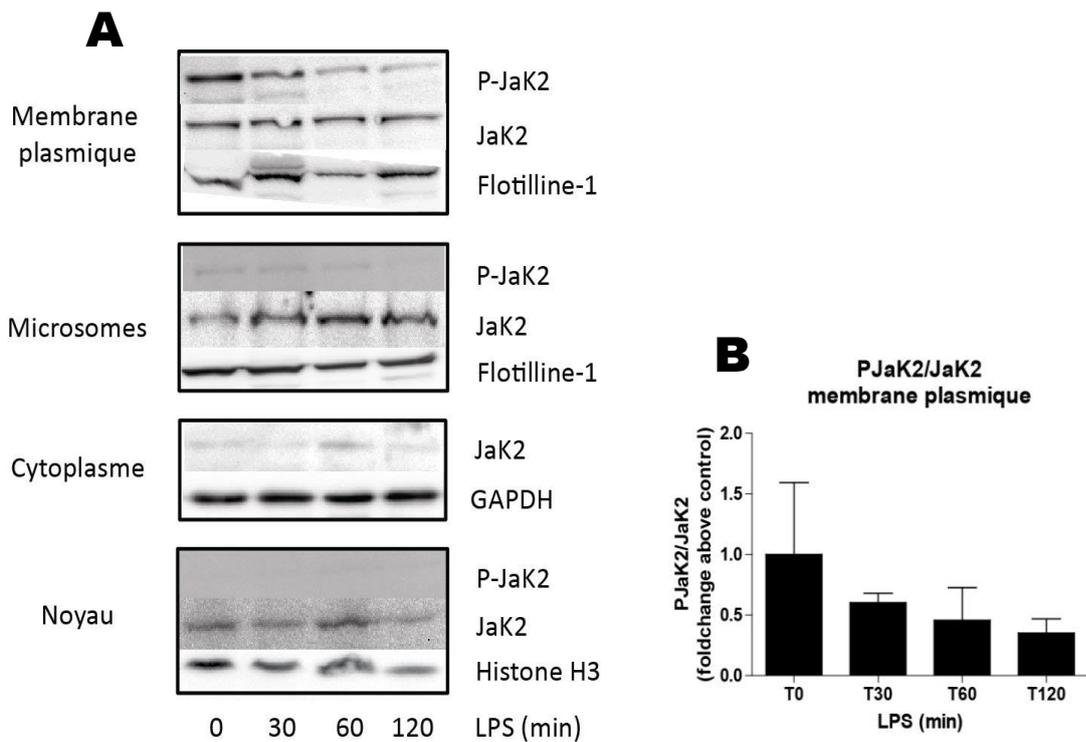
JaK2 est décrite comme étant la kinase phosphorylant STAT3 dans la voie d'activation de L'IL-6 (Satriotomo, et al. 2006). Cette kinase assure l'interface entre le domaine cytoplasmique du récepteur GP130 et l'activation de STAT3. La forme phosphorylée de JaK2 sur les résidus Y1007/1008 est généralement décrite comme l'état activé de la protéine JaK2 qui joue le rôle de protéine kinase et phosphoryle STAT3 (Satriotomo, et al. 2006). Cependant les protéines de la famille JaK possèdent de nombreux sites de phosphorylations permettant l'auto-régulation de leur activité kinasique. Comme précédemment, nous avons analysé l'effet du LPS, sous-tendu par l'IL-6, sur la distribution de JaK2 dans les différents compartiments subcellulaires et sur la phosphorylation de JaK2.

### **a) Expression subcellulaire de JaK2**

Comme l'indique la figure 7A, JaK2 est majoritairement présente dans les extraits membranaires au niveau plasmique et microsomal. Une faible expression de JaK2 est détectable dans les extraits nucléaires. En revanche, la protéine n'est pas exprimée dans le cytosol. Le LPS n'altère ni l'expression de JaK2 ni sa localisation dans les différents compartiments au cours du temps (non illustré).

### **b) Phosphorylation de JaK2**

La phosphorylation de JaK2 sur les résidus Y1007/1008 est exclusivement détectée au niveau de la membrane plasmique et non dans les microsomes. De manière intéressante, JaK2 est phosphorylée sur Y1007/1008 dans les extraits non stimulés par le LPS qui ne présentent pas d'activation de STAT3. D'autre part, le LPS induit une réduction de la phosphorylation de JaK2 au cours du temps comme l'indique le graphe de la figure 7B.



**Figure 7 :** Localisation subcellulaire de JaK2 et déphosphorylation de P-JaK2 induite par le LPS dans l'hippocampe

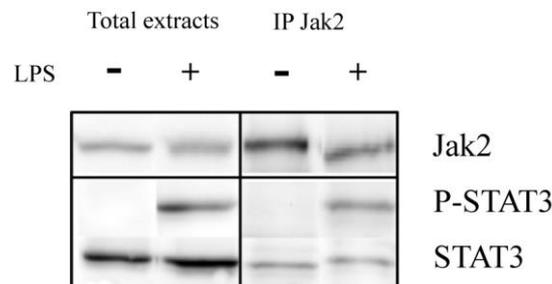
Compartimentations subcellulaires réalisées à partir d'hippocampes de souris isolés 0, 30, 60 et 120 minutes post injection de LPS ip. Des extraits protéiques (50µg) de membranes plasmiques (PM), microsomes (Mi), cytoplasme (C) et noyaux (NE) ont été analysés par westernblot (A) Westernblot représentatif de 3 expériences indépendantes, révélés par anti-phospho JaK2 (P-Y1007/1008), anti-JaK2, anti-flotillin-1 (PM et Mi), anti GAPDH (C) et anti-histone H3 (N). (B) Graphe représentant le ratio de P-JaK2 (PY 1007/1008) normalisé par rapport à JaK2 (P-JaK2/JaK2) dans les membranes plasmiques (PM). L'expression de protéines est mesurée par densitométrie (genetools software).

***Ces résultats indiquent la présence de deux pools de JaK2 membranaires: Un pool associé à la membrane plasmique phosphorylé sur le résidu Y1007/1008 à l'état basal et un pool présent dans les microsomes non phosphorylé. Le LPS induit une réduction de la phosphorylation de JaK2 associée aux membranes plasmiques.***

### Mise en évidence d'un complexe JaK2-STAT3 dans l'hippocampe

Il est possible que les phosphorylations de JaK2 sur Y1007/1008 et sur Y221 jouent un autre rôle que l'activité kinasique vis-à-vis de STAT3. La présence de STAT3 et de JaK2 à l'état basal nous a amené à poser l'hypothèse d'une association entre les deux protéines sous forme d'un précomplexe inactif au niveau de la membrane plasmique. Pour mettre en évidence une association entre STAT3 et JaK2, nous avons analysé l'expression de phospho-STAT3 et STAT3 dans des culots IP JaK2 obtenus à partir d'animaux non traités (contrôles véhicule, LPS-) ou traités au LPS (LPS+) pendant 60min (pic

d'activation de STAT3, voir Fig.5). Comme le montre la Fig.8 un signal STAT3 est détecté dans le culot IP indiquant que STAT3 est associé à Jak2 dans des conditions basales (LPS-). La préexistence d'un complexe STAT3/Jak2 n'avait pas été décrite jusqu'à présent. Après 60 min de traitement LPS, STAT3 complexé à Jak2 est phosphorylé sur le résidu Tyr 705 indépendamment de la phosphorylation de Jak2.

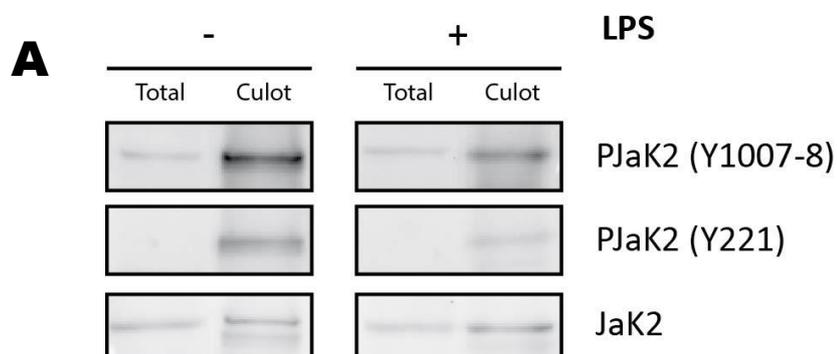


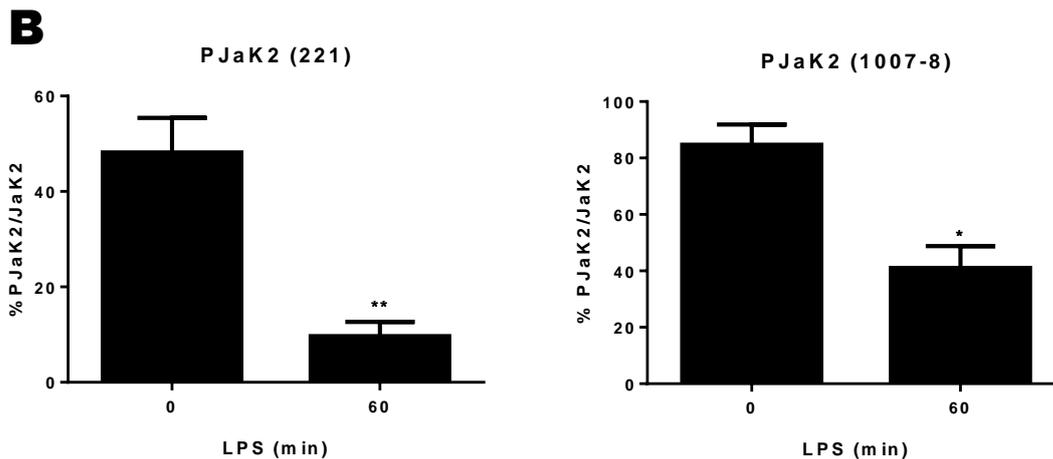
**Figure 8 :** Mise en évidence d'un pré-complexe STAT3/Jak2 par immunoprécipitation de Jak2 dans l'hippocampe

Immunoprécipitations (IP) de Jak2 à partir d'hippocampes de souris stimulées 60min par LPS (LPS+) ou non stimulées (LPS-). Le Western Blot a été révélé par anti Jak2, anti P-STAT3 et anti STAT3 dans les extraits totaux (total extracts) et dans les culots IP (IPJak2).

### **Le pré-complexe Jak2 est phosphorylé à l'état basal et le LPS induit la déphosphorylation de Jak2**

Nous avons étudié la phosphorylation de Jak2 sur les résidus Y1007/1008 et Y221 dans des culots IP Jak2 obtenus à partir d'animaux non traités (contrôles véhicule, LPS-) ou traités au LPS (LPS+) pendant 60min. Comme le montre la Fig.9, la protéine Jak2 immunoprécipité est phosphorylée à l'état basal à la fois sur les résidus Tyrosine 1007/1008 et Tyrosine 221. La phosphorylation de ces résidus décroît significativement 60min après LPS comme l'illustre le graphe Fig.9B, confirmant ainsi les résultats de la Fig.7 montrant une déphosphorylation de Jak2 dans les extraits membranaires sous l'effet du LPS.



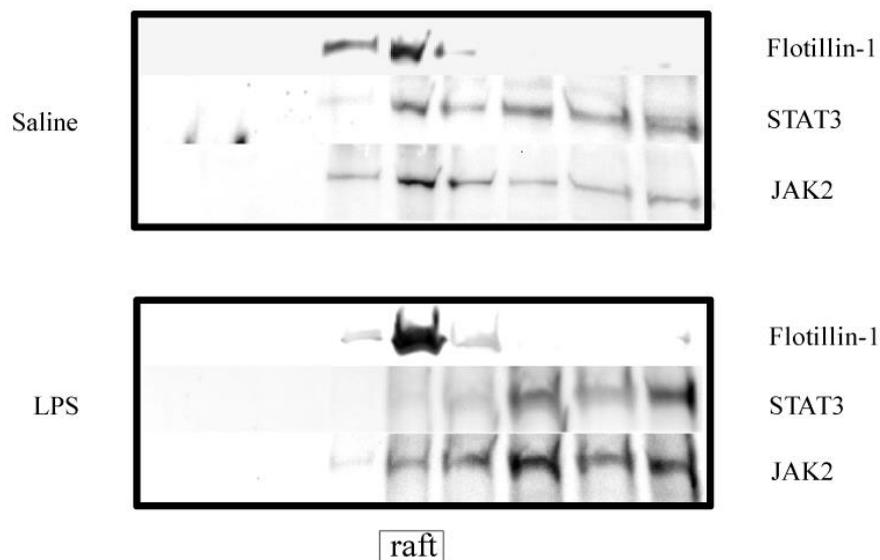


### Figure 9 : Le LPS induit la déphosphorylation de JaK2

Immunoprécipitations (IP) de JaK2 réalisées à partir d'extraits hippocampiques de souris (250µg de protéines) et analysées par Western Blot. A) IP de JaK2 à partir d'hippocampes de souris stimulées 60min par LPS (LPS+) ou non stimulées (LPS-). Le Western Blot a été révélé par anti JaK2, anti PY 1007/1008-JaK2 et anti PY221-JaK2. B) Graphes représentant le pourcentage de P-JaK2 (Y1007/1008) ou de P-JaK2 (Y221) par rapport à JaK2 dans les Culot IP. L'expression de protéines est mesurée par densitométrie (genetools software). Les résultats représentent la moyenne +/- SEM (n=3 ; \*, P<0.05 ; \*\*, P<0.005)

## Etude de l'association JaK2 et STAT3 aux microdomaines de type raft et effet du LPS

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus préalablement après isolation des domaines rafts dans des extraits membranaires d'hippocampes issus de souris traitées ou non par LPS pendant 120min. La figure 10 (De Smedt-Peyrusse V, Casenave F et al. en préparation) montre que JaK2 et STAT3 sont localisées dans les fractions membranaires enrichies en domaines rafts, identifiés par la présence de flotilline-1, ainsi que dans les fractions membranaires de type non raft à l'état basal (saline). Le LPS induit la délocalisation de STAT3 dans les fractions non raft 120min post administration alors que JaK2 reste partiellement associée aux rafts. Ces résultats suggèrent que le complexe membranaire JaK2/STAT3 précédemment mis en évidence est associé aux domaines rafts en conditions basales et que ce complexe est dissocié sous l'effet du LPS, permettant la translocation de STAT3 vers le noyau après activation. La question du rôle joué par les domaines rafts, en tant que plateforme signalisante, dans le maintien du complexe JaK2/STAT3 à l'état basal et dans l'activation de STAT3 par le LPS sous tendu par l'IL-6 reste posée.



**Figure 10 :** Localisation de STAT3 et Jak2 dans les fractions rafts et non raft. Effet du LPS. Des hippocampes de souris ont été isolés 120min après injection de saline (contrôle) ou de LPS. Un mg d'extraits membranaires ont été traités avec 1% de triton X100. Les fractions insolubles et solubles ont été séparées sur gradient de sucrose. Les fractions collectées (1.5ml) le long du gradient ont été analysées par Western Blot. Le Western Blot a été révélé par anti Jak2, anti STAT3 et anti-Flotilline-1.

***STAT3 et Jak2 sont associés aux rafts en conditions basales. Le LPS induit l'exclusion de STAT3 des rafts mais pas de Jak2.***

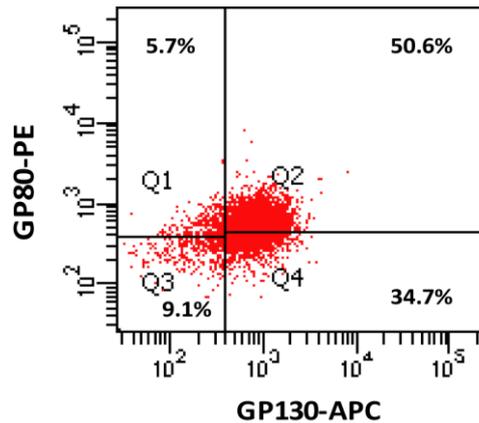
Le rôle joué par les rafts dans la signalisation du LPS et la synthèse des cytokines dans les cellules microgliales a été montré en utilisant des agents qui déstabilisent les rafts (Jou, et al. 2006). Nous avons utilisé cette stratégie pour étudier l'implication des domaines rafts dans l'activation de la voie de signalisation de Jak2/STAT3 induite par l'IL-6. Pour cela, nous avons utilisé la lignée microgliale murine BV2 capable de répondre au LPS (De Smedt-Peyrusse, et al. 2008). Ici, nous avons caractérisé la réponse de cette lignée à l'IL-6 puis nous avons analysé l'effet de la Methyl  $\beta$  Cyclodextrine ( $\beta$ -MCD), chélateur de cholestérol, perturbant la structure des rafts, sur cette réponse à l'IL-6. Le modèle BV2/IL-6 permet de s'affranchir de l'effet inhibiteur de la drogue sur la signalisation du LPS proprement dite.

### **Etude *in vitro* : cellules BV2**

#### **Caractérisation de la voie de signalisation de l'IL-6 dans la lignée BV2**

##### **a) Expression des récepteurs GP130 et GP80**

L'expression des récepteurs GP130 et GP80 a été analysée en cytométrie de flux. Comme le montre la figure 11, 85,3% et 56.3% des cellules BV2 expriment GP130 et GP80 respectivement et 50.6% d'entre elles expriment les deux récepteurs.

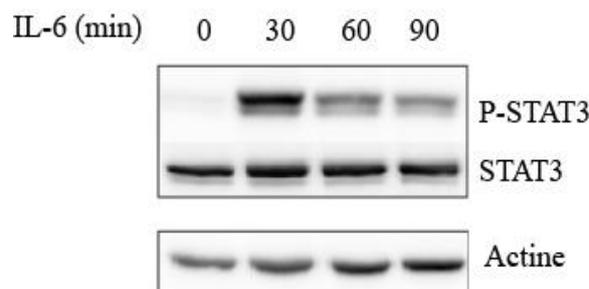


**Figure 11 :** Les cellules BV2 expriment les récepteurs de l'IL-6, GP80 et GP130.

Après blocage des récepteurs aspécifiques Fc avec l'anticorps anti CD16/CD32, les cellules BV2 ont été marquées avec un anti-GP80 PE et anti-GP130 APC ou avec leurs isotypes respectifs PE et APC et analysées en cytométrie de flux.

### **b) Cinétique d'activation de STAT3 par l'IL-6**

Les BV2 exprimant les récepteurs à l'IL-6, nous avons ensuite établi la dose réponse et la cinétique d'activation de STAT3 induite par l'IL-6. Nous avons déterminé que la dose d'IL-6 optimale requise pour induire l'activation de STAT3 était de 10ng/ml (non illustré). Nous avons déterminé la cinétique d'activation de STAT3 (P-STAT3), 30, 60 et 120min dans ces conditions. Comme l'indique la Fig.12, la phosphorylation de STAT3 traduisant l'activation de la protéine par l'IL-6, est détectable transitoirement 30 min après traitement. Ceci indique que la phosphorylation de STAT3 en réponse à l'IL-6 est hautement régulée par un système de feedback négatif.



**Figure 12 :** Cinétique d'activation des cellules BV2 par induite par l'interleukine-6.

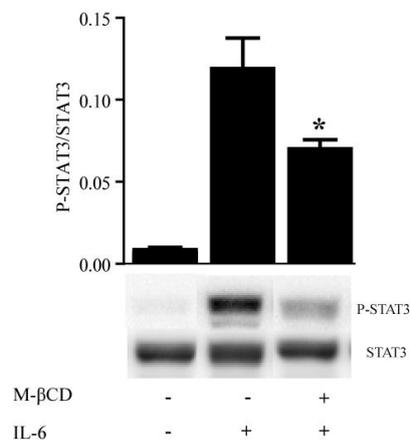
Des cellules BV2 ont été stimulées par l'IL-6 (10ng/mL) pendant t=0-30-60-90 et 120 minutes. Western Blot représentant l'expression de P-STAT3 (PY-705), STAT3 et de l'actine comme contrôle à partir d'extraits cellulaires contenant 50µg de protéines.

**Les cellules BV2 possèdent la machinerie nécessaire à la transduction du signal de l'IL-6.**

## L'activation de la voie de signalisation de l'IL-6 dépend de l'intégrité des rafts

La caractérisation de la réponse des cellules BV2 à l'IL-6 se traduisant par l'activation de STAT3 a servi de base pour explorer le rôle des rafts dans ce processus. Les cellules BV2 ont été traitées avec la  $\beta$ -MCD, inhibiteur de rafts connu pour chélater le cholestérol et par conséquent désorganiser cette plateforme signalisante (Larbi, et al. 2004). Dans une série d'expériences préliminaires, nous avons réalisé une dose réponse et une cinétique pour mesurer l'effet d'un prétraitement avec la  $\beta$ -MCD suivi d'une stimulation des cellules par l'IL-6 (10ng/ml, 30min) induisant l'activation de STAT3. Au-delà d'une concentration de 25mM, la morphologie des cellules est altérée et les cellules ne sont plus adhérentes. Nous avons déterminé qu'un prétraitement de 30min avec 10mM de  $\beta$ -MCD induisait une réduction significative (50%) du signal P-STAT3 par rapport au contrôle (IL-6 seule) (Figure 13). Nous avons contrôlé que ce traitement n'altérait pas le signal de STAT3 (non illustré) et que l'effet de la  $\beta$ -MCD était neutralisé et reversé par l'addition de sérum de veau foetal comme source de cholestérol.

Des expériences complémentaires, réalisées en immunohistochimie, montrent que la stimulation des BV2 par l'IL-6 induit un marquage spécifique de P-STAT3 au niveau de la membrane plasmique ; ce marquage est aboli après traitement des cellules par 10mM de  $\beta$ -MCD. L'ensemble de ces résultats indiquent le pool membranaire de STAT3 associé aux rafts est activé par l'IL-6 et que l'intégrité des rafts est une condition essentielle à l'activation de STAT3. Les rafts représenteraient ainsi le siège initial de la transduction du signal de la cytokine.

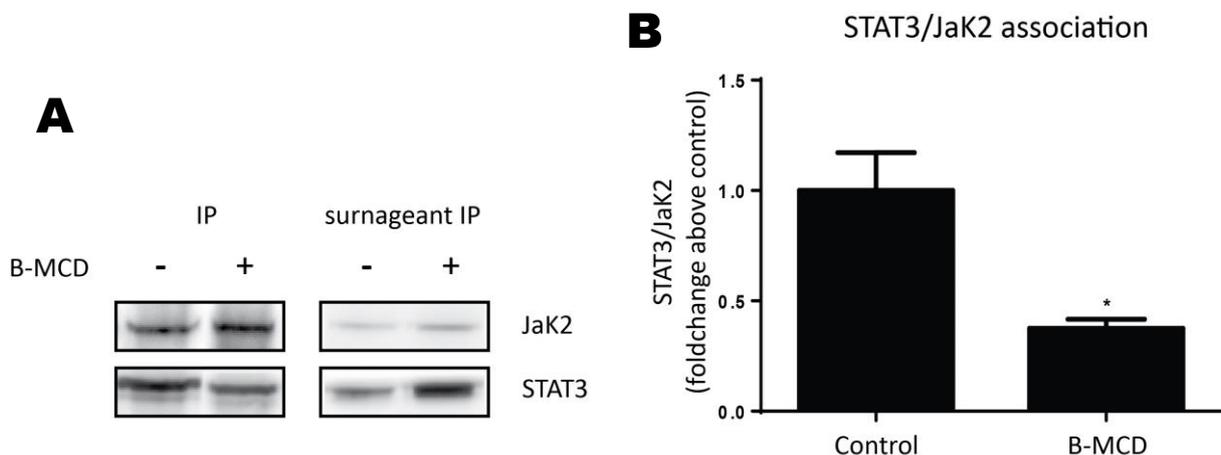


**Figure 13 :** Effet de la  $\beta$ -méthylcyclodextrine sur l'activation de la voie de signalisation de l'IL-6.

Les cellules BV2 ont été traitées ou non par  $\beta$ -MCD (10mM) pendant 30 minutes puis stimulées par l'IL-6 (10ng/ml) 30min. Western Blot représentant l'expression de phospho STAT3 (P-Y705), et STAT3 à partir d'extraits cellulaires contenant 50 $\mu$ g de protéines. Graphe représentant le rapport P-STAT3/STAT3 mesuré par densitométrie (genetools software). Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n=3 ; \*, P<0.05)

## Le pré-complexe JaK2-STAT3 dépend de l'intégrité des rafts à l'état basal

Pour établir un lien formel entre nos modèles *in vivo* (hippocampe) et *in vitro* (BV2) nous avons vérifié que STAT3 était complexé à JaK2 dans les cellules BV2 à l'état basal et analysé l'effet de la  $\beta$ -MCD sur l'intégrité de ce complexe. Nous avons immunoprécipité JaK2 dans des extraits de cellules BV2, traitées ou non à la  $\beta$ -MCD et analysé l'interaction entre JaK2 et STAT3 dans ces conditions. Comme l'illustre la figure 14, STAT3 forme un complexe avec JaK2 dans les cellules BV2 en conditions basales. Le traitement des cellules avec  $\beta$ -MCD, entraîne une réduction significative de la quantité de STAT3 associée à JaK2 et parallèlement une augmentation de STAT3 libre dans le surnageant de l'immunoprécipitation. Cette étude démontre l'existence d'un précomplexe JaK2/STAT3 dans les cellules microgliales en conditions basales et suggère que la stabilité de ce complexe dépend de l'intégrité des rafts.



**Figure 14:** Effet de la  $\beta$ -méthylcyclodextrine sur l'intégrité du complexe JaK2-STAT3.

Les cellules BV2 sont traitées à la  $\beta$ -MCD (10mM) pendant 30 minutes. Les cellules ont été lysées et immunoprécipitées avec JaK2. A) Les protéines sont analysées par Western Blot avec les anticorps anti-JaK2 et anti- STAT3. B) Graphe représentant la variation du rapport STAT3/JaK2 dans les Culot IP. L'expression de protéines est mesurée par densitométrie (genetools software). Les résultats représentent la moyenne +/- SEM (n=3 ; \*, P<0.05)

**Un prétraitement des BV2 à la  $\beta$ -MCD induit la dissociation du pré-complexe membranaire JaK2/STAT3 en condition basale et une inhibition de l'activation de STAT3 par l'IL-6. L'activation de la voie de signalisation de l'IL-6 est donc dépendante de l'intégrité des lipides rafts.**

### c) Discussion

Notre étude montre qu'une partie de STAT3 est localisée au niveau de la membrane plasmique isolée à partir de tissus hippocampiques en conditions basales. La purification de membranes résistantes aux détergents indique qu'une portion de ce STAT3 membranaire est associée aux domaines rafts identifiés par la présence de leurs composants spécifiques, la flotilline et les GM1. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Seghal en 2002 (Seghal, et al. 2002) indiquant que 10% des protéines STAT3 sont associées aux rafts dans une lignée hépatocytaire humaine. Ce pool

préexistant de STAT3 pourrait rapidement être activé par l'IL-6 générée par les cellules gliales lors d'une inflammation ou d'une injection systémique de LPS. Dans ce cas, la phosphorylation de STAT3 sur le résidu 705 dépend spécifiquement de l'IL-6 puisqu'elle ne se produit pas chez des souris invalidées pour l'IL-6 (Mingam, et al. 2008). Nos résultats mettent en évidence une initiation de la phosphorylation de STAT3 au niveau de la membrane plasmique à la fois dans des extraits hippocampiques après administration de LPS et dans des cellules BV2 stimulées par l'IL-6. La membrane plasmique représente donc le site initial de l'activation de STAT3 dans nos deux modèles complémentaires comme cela a été montré dans les cellules hépatocytaires (Sehgal, et al. 2002; Shah, et al. 2002). Nous avons montré que la désorganisation des lipides rafts induite par la  $\beta$ -MCD dans les cellules BV2, limitait l'activation de STAT3 par l'IL-6. Ceci indique une implication fonctionnelle des rafts dans l'activation de STAT3 comme il a été montré dans d'autres systèmes cellulaires (Buk, et al. 2005; Sehgal, et al. 2002). La population de STAT3 membranaire activée par l'IL-6 correspond donc à celle localisée dans les rafts.

La structure moléculaire de STAT3 ne comporte pas de site d'interaction lipidique, la localisation de STAT3 au niveau des rafts est donc relayée par son association à une autre protéine ou à un complexe protéique intermédiaire interagissant avec les lipides rafts. Nous avons montré que STAT3 et Jak2 forment un complexe inactif en conditions basales. Jak2 étant lui-même localisé dans les membranes et en particulier dans les fractions rafts (figure 6), il représente un lien possible entre STAT3 et les rafts. Jak2 comporte un domaine FERM capable de se lier à des phospholipides de manière transitoire pouvant participer à son recrutement à la membrane. Ce site est cependant majoritairement dédié à la liaison de Jak2 au domaine cytoplasmique des récepteurs membranaires aux cytokines (Behrmann, et al. 2004) tel que GP130. Il est possible que des homodimères de GP130, requis pour la liaison de Jak2 à GP130, soient préformés en absence de stimulus comme il a été décrit dans d'autres systèmes impliquant Jak2 (Woodcock, et al. 1997). Des études ont montré que GP130 était partiellement associé aux rafts (Buk, et al. 2005; Podar, et al. 2003; Sehgal, et al. 2002). Nous avons détecté la présence de GP130 dans les fractions rafts (non illustré), cependant, nos conditions expérimentales n'ont pas permis de mettre en évidence une association de GP130 avec Jak2 par immunoprécipitation *in vivo* et *in vitro*. L'intervention de protéines chaperones interagissant avec Jak2 et STAT3 pourraient également être impliquées dans le maintien du complexe Jak2/STAT3 inactif préformé au niveau membranaire. La protéine Tid1 se lie au complexe inactif Jak2/IFN alpha R et la stimulation par la cytokine IFN gamma entraîne la libération du complexe et son activation (Sarkar et al., 2011). HSP90 a été décrite comme étant associée à STAT3 dans les rafts de cellules hépatiques (Sato, et al. 2003). Il serait intéressant d'approfondir ce point dans notre système.

Nous avons mis en évidence une phosphorylation de Jak2 sur les sites tyrosine 1007/1008 et 221 dans les extraits hippocampiques et les cellules BV2, à l'état basal. Dans l'hippocampe, la phosphorylation de Jak2 n'est observée qu'au niveau de la membrane plasmique. De plus, nous montrons que Jak2 complexé à STAT3 est phosphorylé. Ces résultats sont surprenants dans la mesure où il est généralement décrit que la phosphorylation de Jak2 sur ces résidus tyrosines est impliquée dans l'activation kinasique de Jak2 entraînant la phosphorylation de STAT3 sur Y705. Or ceci n'est pas le cas en basal puisque STAT3 n'est pas activé. Il est possible que le recrutement de Jak2 à la membrane induise sa phosphorylation et le recrutement de STAT3. Jak2 contient de nombreux sites de phosphorylations qui peuvent autoréguler son activité kinasique et conférer à Jak2 différents niveaux de phosphorylation. La phosphorylation résiduelle de Jak2 observée pourrait représenter une forme d'autophosphorylation de Jak2 (Hann et al., 2012) suffisante pour recruter STAT3 mais pas pour induire son activation.

Nous avons observé une augmentation de la phosphorylation de Jak2, 5min après traitement des cellules BV2 par l'IL-6 (non illustré), puis une déphosphorylation totale de Jak2. De manière similaire, une étude a montré que le LPS entraînait la phosphorylation de Jak2 en une minute dans des cellules RAW (Okugawa, et al. 2003). L'activation complète de Jak2 après stimulation est donc un phénomène extrêmement rapide et transitoire qui explique que nous n'avons pas pu la détecter *in vivo* sous l'effet du LPS dans l'hippocampe. Dès 30min post LPS, nous observons une déphosphorylation progressive de Jak2 associée à la membrane plasmique parallèlement à l'activation de STAT3 et à l'apparition de STAT3 dans la fraction nucléaire (translocation de STAT3). Il est possible que la déphosphorylation de Jak2 et/ou l'activation de STAT3 s'accompagnent de modifications structurales des protéines, provoquant la dissociation du complexe Jak2/STAT3 et la libération de STAT3 activée. Nous montrons que 2h après LPS *in vivo*, STAT3 n'est plus présente dans la fraction rafts. Les rafts sont majoritairement abondants dans la membrane plasmique. Ils sont assemblés dans l'appareil de Golgi et trafiquent vers la membrane plasmique où ils sont endocytés en continu. Les endosomes sont redirigés vers le réticulum endoplasmique (Simmons et Toomre, 2000). Ce mécanisme participerait au transport de STAT3 activé vers le noyau comme le décrit une étude de Shah et al., 2006. Nous observons en effet une colocalisation de STAT3 avec les membranes golgiennes et du réticulum endoplasmique contenues dans les microsomes.

La stimulation des cellules par un ligand comme le LPS ou l'IL-6 pourrait provoquer des remaniements de la structure même des rafts et modifier les interactions protéiques associées à ces domaines lipidiques. Il a été décrit par exemple, que l'interféron était capable d'augmenter transitoirement la rigidité des rafts (Pfeffer, et al. 1981); review in Simmons and Toomre, 2000; Giabati et al., 2001). Expérimentalement, nous montrons qu'un traitement des cellules BV2 par la  $\beta$ -

MCD, déstabilisant l'intégrité des rafts, induit la dissociation du complexe JaK2/STAT3. La stabilité du complexe signalisant JaK2/STAT3 dépendrait donc en partie de l'intégrité des rafts.

En résumé, nos résultats indiquent de manière originale qu'une association de STAT3 avec JaK2 phosphorylée en conditions basales est requise pour l'initiation de l'activation de STAT3 dans le cerveau et les cellules microgliales. L'intégrité des domaines rafts est nécessaire au maintien de ce complexe inactivé à la membrane plasmique. L'activation de la voie de signalisation JaK2/STAT3 par le LPS sous tendue par l'action de l'IL-6 impliquerait une réorganisation des rafts induisant la dissociation du complexe STAT3/JaK2 et la libération de STAT3 activée. Ainsi, STAT3 phosphorylée trafiquerait de la membrane plasmique vers le noyau pour y jouer son rôle de facteur de transcription. Ces données mettent en évidence un nouveau paradigme du processus d'activation de STAT3. L'implication des rafts dans ce mécanisme représente une cible privilégiée pour moduler de la voie de signalisation de l'IL-6 particulièrement exacerbée dans une situation neuroinflammatoire. De nombreux arguments indiquent que les AGPI  $\omega$ 3 apportés par la diète modulent la composition et la fluidité membranaire des cellules, et interfèrent avec la fonctionnalité des rafts. La supplémentation en AGPI  $\omega$ 3 pourrait ainsi constituer une thérapie non invasive et adaptée pour limiter les effets délétères d'une inflammation du SNC.

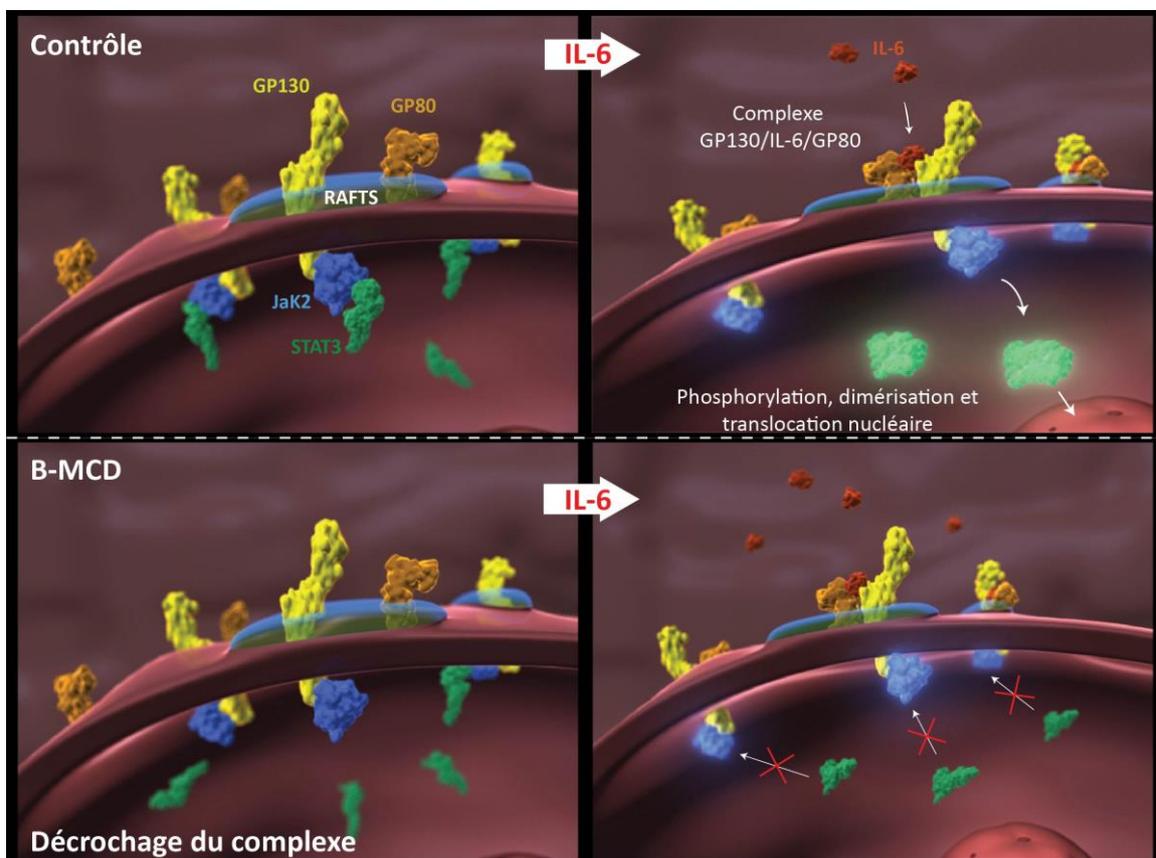


Schéma 11 : Proposition d'un modèle pour la voie de signalisation JaK2/STAT3



## IV- Etude 2 - Effet des AGPIs sur l'activation de la voie de signalisation de l'IL-6

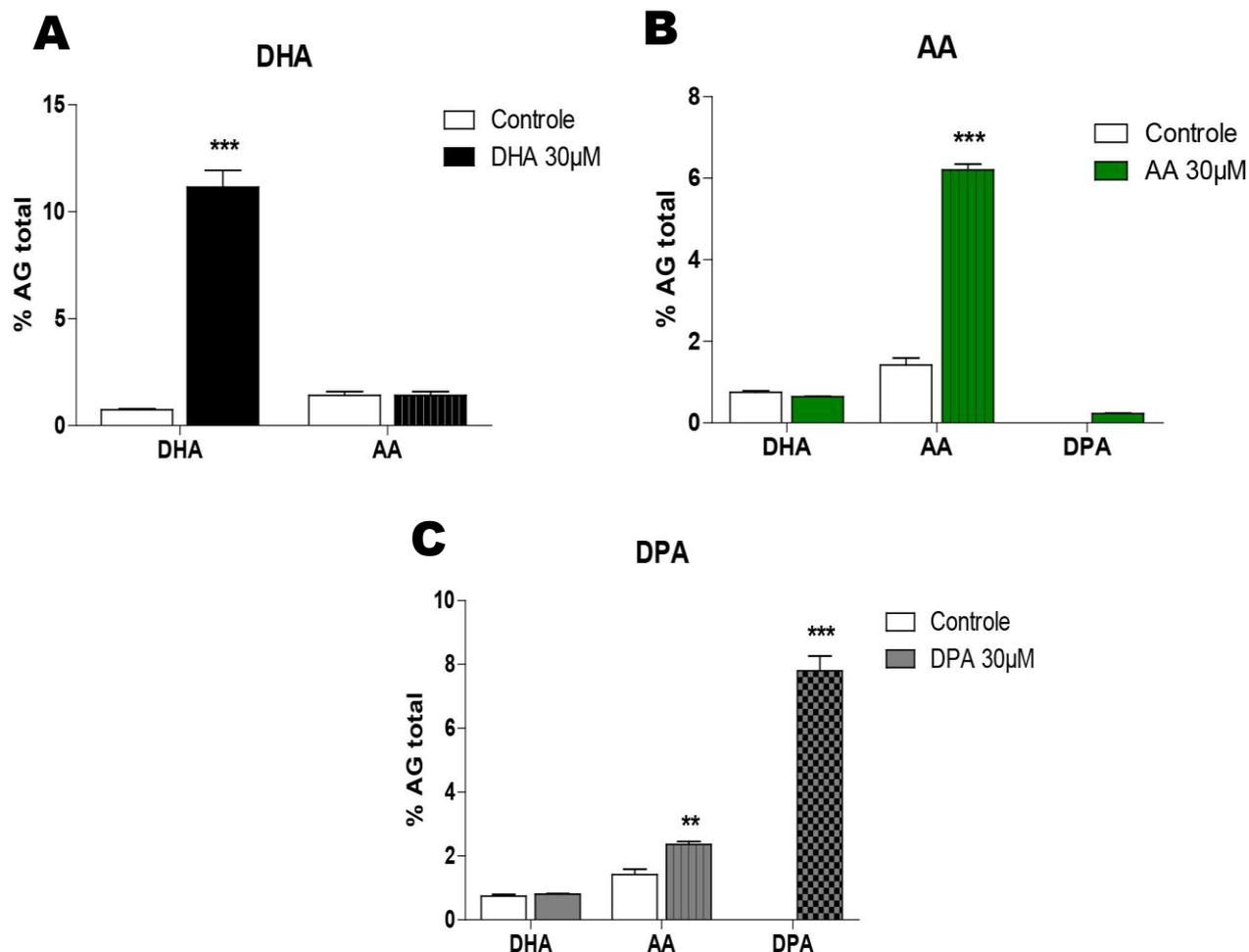
### a) Objectifs

Notre deuxième objectif a été d'étudier l'effet d'un changement de composition membranaire en AGPI sur l'activité de la voie de signalisation de l'IL-6 que nous avons caractérisée dans la partie 1. Il a été décrit dans la littérature que les lipides rafts peuvent être des cibles potentielles de l'action des AGPI, particulièrement le DHA et l'AA (Shaikh and Edidin 2007). Comme nous l'avons montré dans la partie 1 de notre étude, Jak2 et STAT3 sont associés aux lipides rafts. Ce complexe préformé en conditions basales est nécessaire à l'achèvement de la signalisation de l'IL-6. Les AGPI pourraient moduler l'association ou l'activation de cette voie de signalisation. Cette seconde étude va tenter de répondre aux questions suivantes : *In vitro*, l'enrichissement des membranes en AGPI de type  $\omega$ 3 ou  $\omega$ 6 peut-il moduler la voie de signalisation de l'IL-6 ? *In vivo*, une diète carencée en  $\omega$ 3 administrée à des souris depuis le premier jour de gestation peut-elle modifier la réponse cellulaire gliale après un stimulus inflammatoire ?

### b) Résultats

#### **Incorporation de DHA, AA et DPA dans les acides gras totaux *in vitro***

Nous avons incubé des cellules BV2 en présence de 30 $\mu$ m de DHA ( $\omega$ 3) et d'AA et de DPA ( $\omega$ 6) pendant 24h. La dose de 30 $\mu$ M d'AGPI a été précédemment définie dans une étude réalisée au laboratoire (De Smedt-Peyrusse, et al. 2008) montrant une incorporation lipidique optimale et l'absence de toxicité cellulaire. L'incorporation des AGPI a été mesurée dans les acides gras totaux par chromatographie gazeuse. Ce dosage a été réalisé par l'unité FLAVIC (INRA Dijon).



**Figure 15:** Incorporation de DHA, AA, DPA dans les acides gras totaux des cellules BV2

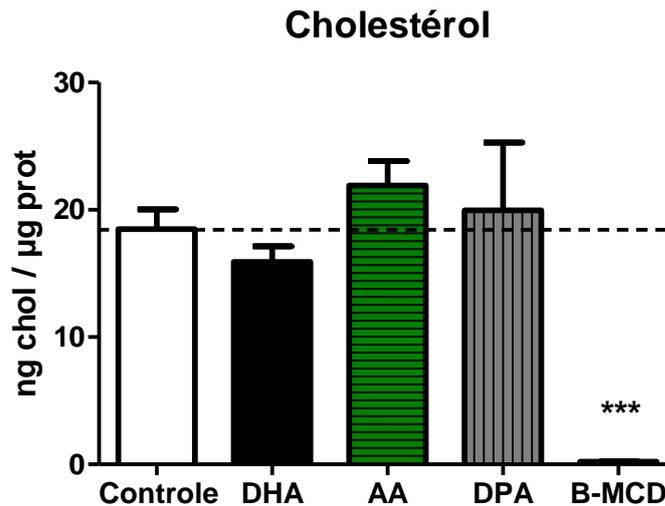
Les cellules ont été incubées en présence de 30 $\mu$ M de DHA, d'AA, de DPA n-6 ou d'éthanol 0.1% (contrôle) pendant 24h. Après extraction des lipides, le dosage des AGPI a été réalisé par chromatographie à gaz. (A) Graphe représentant l'incorporation lipidique après supplémentation en DHA, en % d'acides gras totaux. (B) après supplémentation en AA. (C) après supplémentation en DPA. Les résultats représentent la moyenne +/- SEM (n=3 ; \*, P<0.05 ; \*\*, P<0.005 ; \*\*\*, P<0.001)

Nous observons que dans les conditions contrôle que le DPA n'est pas détectable. En présence de DHA, le taux de DHA est augmenté 11% par rapport au contrôle sans modifier la quantité d'AA et de DPA (Fig.15A). En présence d'AA, nous observons une augmentation de 5.5% d'AA et détectons une faible quantité de DPA (0.23%) (Fig.15B). Le taux de DHA reste inchangé. Dans le milieu de culture enrichi en DPA, le DPA représente 8% des acides gras totaux. De manière intéressante, ce traitement a induit une augmentation significative du taux d'AA de 1% par rapport au contrôle (Fig.15C), suggérant qu'une partie du DPA a été rétroconverti en AA.

***L'enrichissement du milieu de culture en AGPI pendant 24h permet leur incorporation dans les acides gras des cellules BV2.***

## Mesure de la concentration de cholestérol après incorporation des AGPI et traitement des cellules BV2 par $\beta$ -MCD

Nous avons ensuite mesuré l'impact de l'incorporation des AGPI sur la quantité de cholestérol dans les cellules BV2. En effet, des études ont montré que le DHA modifiait la distribution spatiale du cholestérol (Rockett, et al. 2012; Shaikh, et al. 2009) mais peu de données existent sur l'influence des AGPI sur la teneur des membranes en cholestérol.



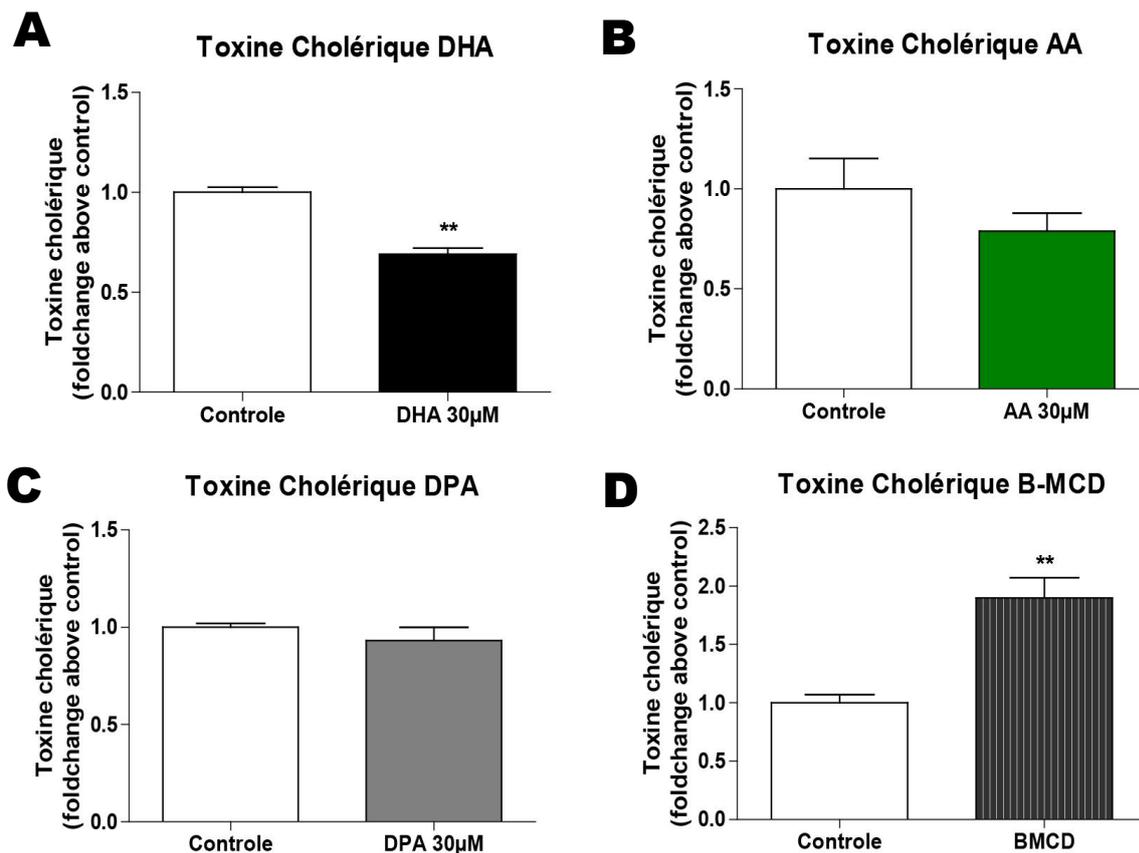
**Figure 16 :** Effet des AGPI et de  $\beta$ -MCD sur la concentration de cholestérol dans les BV2

Les cellules ont été incubées en présence de 30 $\mu$ M de DHA, d'AA, de DPA n-6 ou d'éthanol 0.1% (contrôle) pendant 24h et de 10mM  $\beta$ -MCD pendant 30min. Après extraction des lipides, le dosage du cholestérol a été réalisé par chromatographie à gaz et exprimé par rapport à la quantité de protéines totales. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n=3) \*\*\*, P<0.001)

En conditions contrôles, la concentration de cholestérol est de 18.5 ng/ $\mu$ g de protéines. Le DHA a tendance à réduire la concentration de cholestérol (15.9 ng/ $\mu$ g de protéines). A l'inverse, un enrichissement du milieu de culture en AA provoque une augmentation non significative du taux de cholestérol. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats. Comme attendu,  $\beta$ -MCD induit une déplétion totale des cellules en cholestérol.

## L'enrichissement en DHA et le traitement à la $\beta$ -MCD affecte l'expression des gangliosides GM1

Nous avons ensuite évalué l'expression des GM1 à la surface des cellules BV2 après un traitement aux AGPI ou à la  $\beta$ -MCD. Les GM1 sont un des constituants des lipides rafts et possèdent une affinité pour la toxine cholérique permettant les identifier. Après traitement avec les AGPI et la  $\beta$ -MCD, les cellules BV2 ont été marquées avec la toxine cholérique couplée à un fluorochrome FITC et son expression a été analysée en cytométrie de flux.



**Figure 17:** Effet des AGPI et de la  $\beta$ -MCD sur l'expression des GM1

Les cellules ont été incubées en présence de 30µM de DHA, d'AA, de DPA n-6 ou d'éthanol 0.1% (contrôle) pendant 24h et de 10mM  $\beta$ -MCD pendant 30min. Les cellules sont mises en présence de toxine cholérique FITC pendant 1heure. Les analyses sont réalisées en cytométrie de flux. (A) Graphe représentant le taux de variation (%) de l'intensité de fluorescence de la toxine cholérique-FITC en condition contrôle ou après supplémentation en DHA. (B) après supplémentation en AA. (C) après supplémentation en DPA (D) après traitement à la  $\beta$ -MCD. Les résultats représentent la moyenne +/- SEM (n=3 ; \*\*, P<0.005).

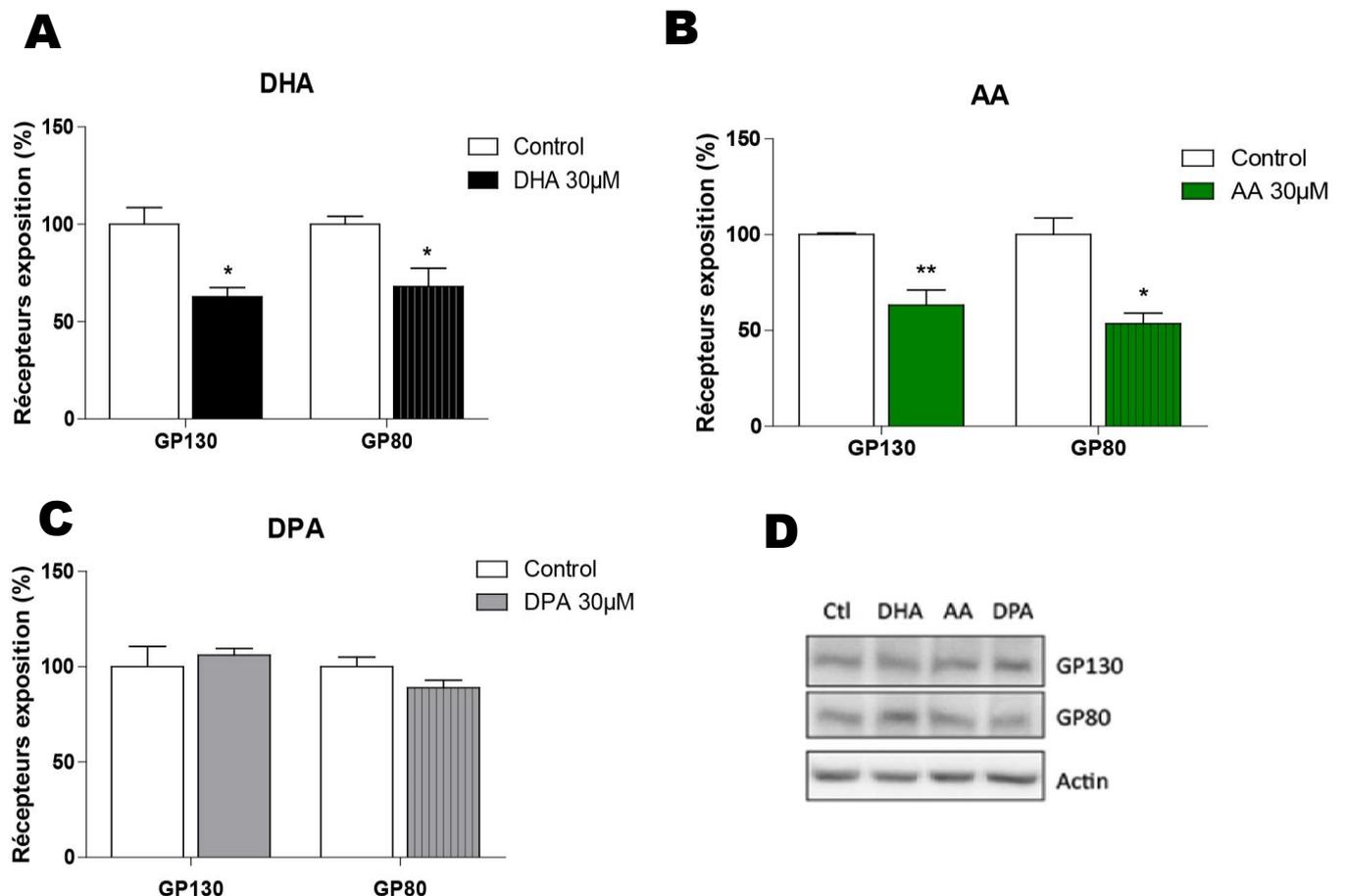
Le graphe (Fig.17A) montre le DHA a induit une diminution significative de l'expression des gangliosides GM1 d'environ 30% par rapport aux conditions contrôles. Le traitement à l'AA (Fig.17B) et au DPA (Fig.17C) n'ont pas d'effet sur l'expression des GM1. En revanche, le traitement à la  $\beta$ -MCD a induit une augmentation de 50% des GM1 détectable à la surface cellulaire (Fig.17D).

***Cette étude montre que le DHA, mais pas l'AA et le DPA, induit un remaniement lipidique réduisant l'expression des gangliosides GM1 à la surface des BV2. Le traitement à la  $\beta$ -MCD altérant l'intégrité des rafts, provoque une surexpression des GM1 à la surface cellulaire.***

L'ensemble de ces résultats suggère que l'incorporation du DHA dans les cellules BV2 influence la composition membranaire spécifique des lipides rafts (cholestérol, GM1) alors que l'incorporation de l'AA et du DPA, AGPI  $\omega$ 6 n'a pas d'effet sur ces constituants. Ces modèles de cellules enrichies vont nous permettre d'étudier l'influence des AGPI, qu'ils soient de type  $\omega$ 3 ou  $\omega$ 6, sur la voie de signalisation de l'IL-6.

## Le DHA et l'AA induisent une réduction de la présentation des récepteurs GP130 et GP80

Dans cette étude nous avons analysé l'effet de l'incorporation des AGPI sur l'expression des récepteurs GP80 et GP130 en cytométrie de flux. Comme précédemment après traitement avec les AGPI, les cellules BV2 ont été marquées avec des anticorps anti-GP80 couplé à la Phycoérythrine (PE) et anti-GP130 couplé à l'Allophycocyanine (APC). L'expression des récepteurs a été analysée en cytométrie de flux. L'expression totale des deux récepteurs a été évaluée par Western Blot.



**Figure 18:** Présentation des récepteurs GP130 et GP80 à la surface cellulaire après supplémentation en DHA, AA, DPA ou Ethanol 0.1%.

Après le traitement aux AGPI, les cellules sont mises en présence avec un double marquage anti GP130 (couplé au fluorochrome APC) et anti GP80 (couplé au fluorochrome PE) pendant 1heure. L'analyse a été réalisée par cytométrie de flux. (A) Graphe représentant le taux de variation (%) de l'intensité de fluorescence des anticorps spécifique de GP130 et GP80, en condition contrôle ou après supplémentation en DHA. (B) après supplémentation en AA. (C) après supplémentation en DPA (D) Analyse de la quantité protéique des récepteurs GP130 et GP80 par Western Blot. Les résultats représentent la moyenne +/- SEM (n=3 ; \*, P<0.05 ; \*\*, P<0.005).

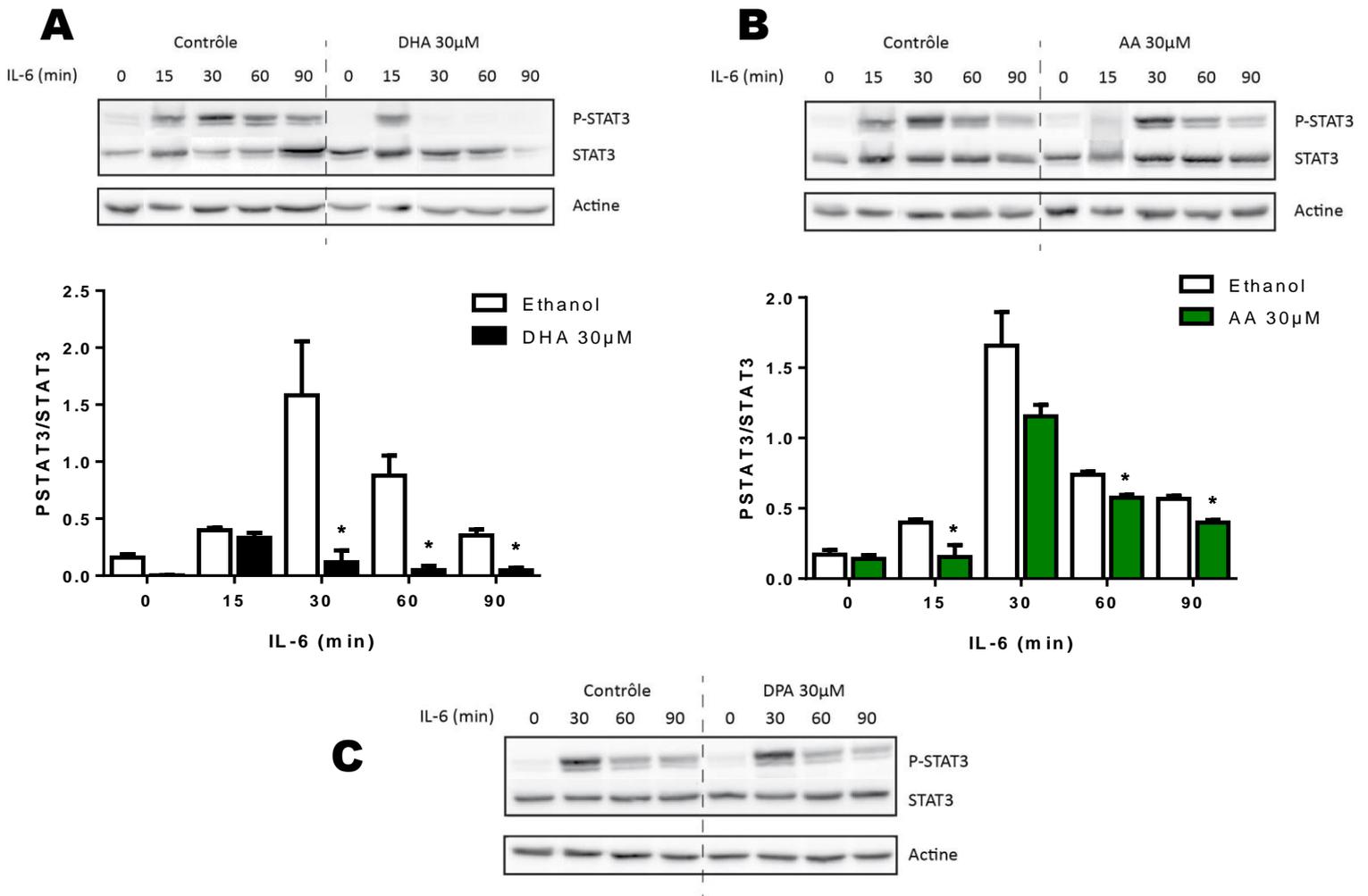
Cette étude montre que le DHA (Fig.18A) et l'AA (Fig.18B) induisent une réduction de la présentation des récepteurs GP130 et GP80, de 40% à 50%. En revanche, le DPA (Fig.18C) n'a pas

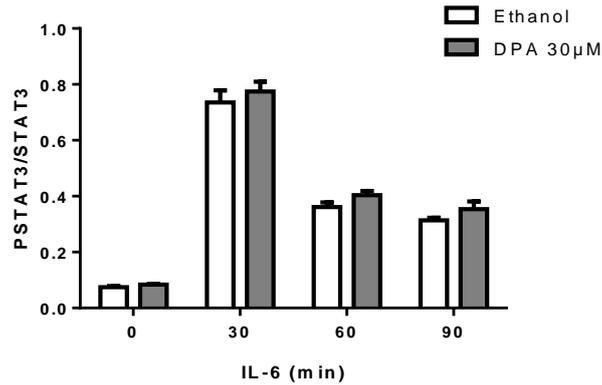
d'effet sur la présentation des récepteurs. L'expression totale des récepteurs n'est pas été altérée (Fig.18D) par le traitement aux AGPI.

*Ces résultats montrent que l'incorporation des AGPI dans les acides gras totaux provoque des effets différentiels en fonction du type d'acide gras. Le DHA et l'AA désorganisent la structure membranaire alors que le DPA ne l'affecte pas. Ces résultats suggèrent que le DHA et l'AA jouent un rôle structural au niveau membranaire. Cette modulation de la présentation des récepteurs par le DHA et l'AA pourrait altérer l'accession du ligand IL-6 à ses récepteurs spécifiques.*

### Effet différentiel des AGPI sur l'activation de la voie JaK2-STAT3

Nous avons stimulé les cellules BV2 enrichies en AGPI par l'IL-6 afin de vérifier l'effet des AGPI sur la transduction du signal. Après traitement AGPI, les BV2 ont été traitées par l'IL-6 pendant différentes périodes pour réaliser une cinétique d'activation de STAT3.



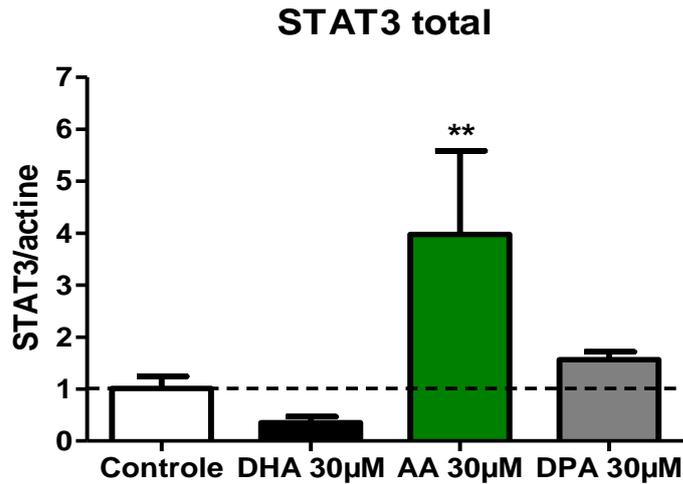


**Figure 19:** Cinétique d'activation de STAT3 sur BV2 après supplémentation en DHA, AA, DPA ou Ethanol 0.1%.

Après le traitement aux AGPI, les cellules sont stimulées pendant 0-15-30-60-90 minutes avec de l'IL-6 (10ng/mL). Les protéines extraites sont analysées en Western Blot avec les anticorps anti-phospho Y705 STAT3 (forme phosphorylée) et anti-STAT3 (forme totale). Les résultats représentent la moyenne +/- SEM (n=3 ; \*, P<0.05).

Dans les conditions contrôles, STAT3 est phosphorylé 15 minutes après l'administration d'IL-6 pour atteindre un pic 30 minutes post IL-6. La phosphorylation de STAT3 décroît linéairement à 60 et 90 minutes post-stimulation. Ces résultats sont conformes avec les données précédemment obtenues (Fig.12).

Trente minutes post IL-6, le DHA induit une faible activation de STAT3 (Fig.19A) sans modifier l'expression de la protéine totale au cours du temps. La supplémentation en AA (Fig.19B) induit une réduction du signal P-STAT3, de 20% par rapport aux conditions contrôles, significative à 15,60 et 90min. En revanche, le DPA (Fig.19C) n'a pas d'effet sur le taux de phosphorylation de STAT3, les valeurs sont comparables aux conditions contrôles. Nous avons vérifié si le DHA et l'AA pouvaient induire une activation précoce de STAT3. En effet, 15 minutes post IL-6, nous détectons déjà une faible phosphorylation de STAT3 en condition contrôle. Le DHA, 15 minutes post IL-6, n'induit pas d'activation précoce mais n'inhibe pas la réponse à l'IL-6 comme pour 30-60-90 minutes post traitement. L'AA, 15 minutes post IL-6, induit une réduction de la phosphorylation de STAT3 par rapport aux conditions contrôles.



**Figure 20:** Quantification de STAT3 sur BV2 après supplémentation en DHA, AA, DPA ou Ethanol 0.1%.

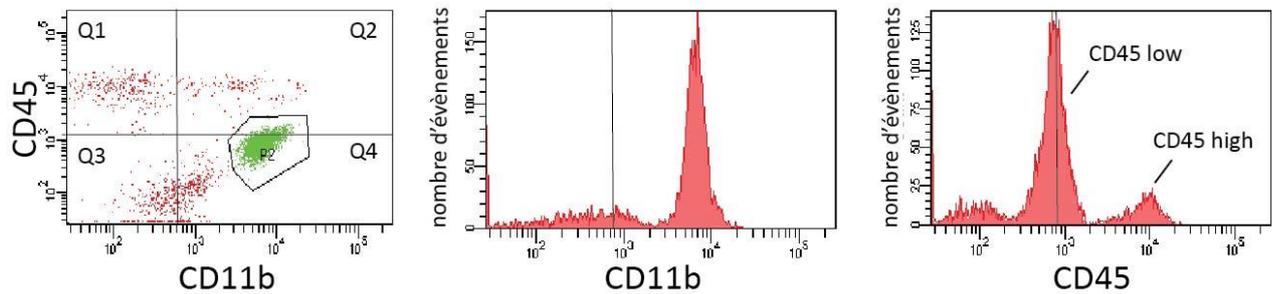
Après le traitement aux AGPI, les protéines extraites sont analysées en Western Blot avec les anticorps anti-STAT3 (forme totale) et anti-actine. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n=3 ; \*, P<0.05).

Nous avons mesuré l'expression totale de STAT3 à l'état basal par rapport à l'actine, marqueur interne dont l'expression est constante. Les résultats montrent une tendance du DHA à diminuer la quantité totale de STAT3 alors que le traitement à l'AA augmente d'un facteur de 4 l'expression de STAT3. Le traitement DPA n'a pas d'effet significatif sur l'expression de STAT3. Nous avons vérifié que ces valeurs n'étaient pas affectées par le traitement à l'IL-6 (non illustré)

***Ces résultats montrent que le traitement aux AGPI induit des réponses cellulaires différentes après stimulation à l'IL-6. Le DHA inhibe la phosphorylation de STAT3 après 30 minutes, l'AA atténue la réponse cellulaire à l'IL-6 alors que le DPA n'a pas d'effet. De plus, nous observons une régulation de la quantité totale de STAT3 en fonction du traitement lipidique. Celle-ci est significativement augmentée par l'AA.***

Ces résultats *in vitro* nous ont amené à explorer l'expression des récepteurs de l'IL-6 dans des cellules microgliales isolées ex vivo à partir de souris soumises à un régime équilibré en  $\omega$ 3 ( $\omega$ 3/6 :1/5) et à un régime carencé en  $\omega$ 3 ( $\omega$ 3/6 :1/100). Les cellules microgliales ont été isolées selon le protocole décrit par Wynne et al, 2011. Dans un premier temps nous avons caractérisé les cellules microgliales possédant le phénotype CD11b*high* + CD45*low* (Becher and Antel 1996; Ford, et al. 1995), tandis que d'autres macrophages périvasculaires du système nerveux central et périphériques présentent le phénotype CD11b*high* + CD45*high*.

## Caractérisation phénotypique des cellules microgliales *ex vivo* par cytométrie de flux.



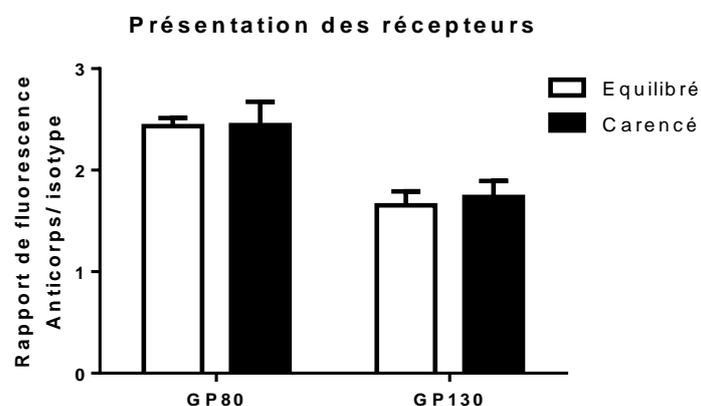
**Figure 21:** Présentation des protéines de surface CD11b et CD45 sur des microglies isolées *ex vivo*. Les microglies sont isolées par un gradient de Percoll (70-50-35-0%). Elles sont mises en présence d'un double marquage avec un anticorps anti CD11b (couplé au fluorochrome V405) et anti CD45 (couplé au fluorochrome Cy5.5) pendant 1heure. L'analyse a été réalisée par cytométrie de flux.

Cette étude révèle que nous avons extrait plusieurs populations cellulaires. La population en Q3 est CD11b*low* et CD45*low*, ce ne sont pas des cellules macrophagiques ni microgliales. En Q1, nous observons une population CD45*high* et CD11b-, décrite comme étant des cellules lymphoïdes. En Q2, la population CD11b*high* et CD45*high* correspond aux granulocytes et aux macrophages. Enfin, la population microgliale d'intérêt se situe en Q4 avec un signal CD11b*high* CD45*low*.

***Cette expérience confirme la présence de cellules microgliales caractérisées par le phénotype CD11b*high* et CD45*low* et valide ainsi le protocole d'isolation ex vivo de microglies.***

## La présentation des récepteurs GP130 et GP80 dans les microglies n'est pas affectée par un régime carencé en $\omega 3$

Des cellules microgliales dont le phénotype a été identifié CD11b*high* et CD45*low* en Q4 ont été marquées avec des anticorps anti-GP80 couplé à la Phycoérythrine (PE) et anti-GP130 couplé à l'allophycocyanine APC. L'expression des récepteurs a été analysée en cytométrie de flux.



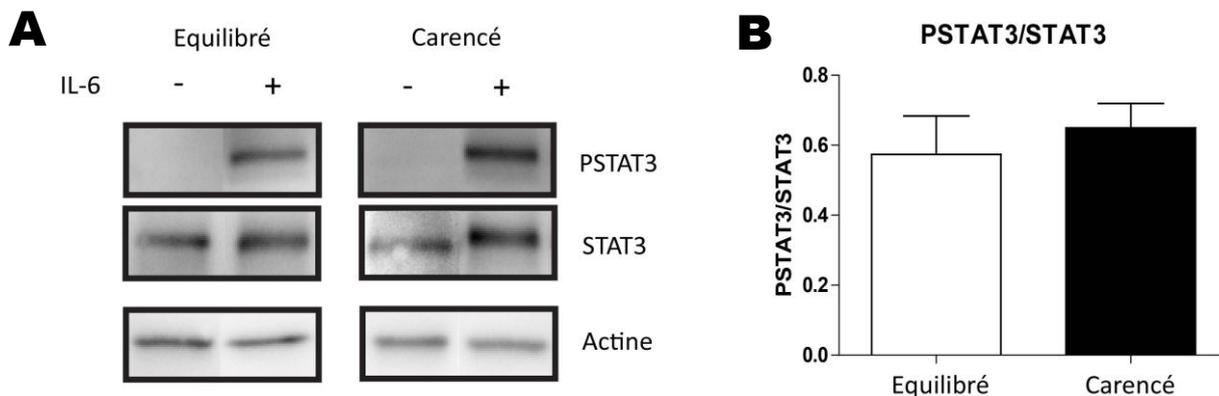
**Figure 22:** Présentation des récepteurs GP130 et GP80 dans les microglies CD11b<sup>high</sup> et CD45<sup>low</sup>. Les microglies sont isolées par un gradient de Percoll (70-50-35-0%). Elles sont mises en présence d'un double marquage avec un anticorps anti GP130 (couplé au fluorochrome APC) et anti GP80 (couplé au fluorochrome PE) pendant 1heure. L'analyse a été réalisée par cytométrie de flux. (A) Graphe représentant le taux de variation (%) de l'intensité de fluorescence des anticorps spécifique de GP130 et GP80, en condition de régime équilibré Colza) ou carencé en  $\omega$ 3 (Tournesol) (n=3).

Le graphe illustré figure 22 montre que les microglies CD11b<sup>high</sup> et CD45<sup>low</sup> isolées *ex vivo* expriment les récepteurs GP130 et GP80 à leur surface comme les cellules BV2. Cette intensité de fluorescence traduisant la présentation des récepteurs à la surface cellulaire ne varie pas entre les deux groupes régimes.

***Nous validons la présence des récepteurs GP130 et GP80 à la surface des microglies isolées ex vivo. La carence alimentaire en  $\omega$ 3 n'a pas d'effet sur le taux de présentation de ces récepteurs.***

### **La réponse des microglies *ex vivo* à l'IL-6 n'est pas modulée par la carence en $\omega$ 3**

Dans cette expérience, nous avons incubé la fraction enrichie en microglies, isolée à partir du gradient de Percoll, en présence d'IL-6 (10ng/ml) pendant 30min. L'activation de STAT3 a été évaluée par Western Blot.



**Figure 22:** Evaluation de l'activation de STAT3 par l'IL-6 dans les microglies *ex vivo*.

Les microglies sont isolées par un gradient de Percoll (70-50-35-0%). Les cellules sont stimulées pendant 0-30 minutes avec de l'IL-6 (10ng/mL). (A) Les protéines extraites sont analysées en Western Blot avec les anticorps anti-phospho Y705 STAT3 (forme phosphorylée) et anti-STAT3 (forme totale) et anti-Actine. (B) Représentation du taux de phosphorylation de STAT3 en fonction du régime. Les résultats représentent la moyenne +/- SEM (n=3).

Ces résultats montrent que la voie STAT3 a été activée par l'IL-6 chez les microglies isolées *ex vivo* (Fig.22A). Le rapport phospho-STAT3/STAT3 totale est similaire dans les deux groupes de régimes (Fig.22B).

***Cette étude valide la fonctionnalité de la voie de signalisation de l'IL-6 dans les microglies ex vivo. Nous n'avons pas mis en évidence d'effet régime sur l'activation de la voie STAT3 induite par l'IL-6 dans nos conditions.***

### **c) Discussion**

Il a été montré chez le rat et chez la souris que la carence alimentaire en AGPI  $\omega$ 3 entraîne une diminution de la concentration cérébrale en DHA au profit de l'AA et de l'équivalent  $\omega$ 6 du DHA en nombre d'atomes de carbones, l'acide docosapentaénoïque (DPA  $\omega$ 6, 22:5 n-6) (Moriguchi, et al. 2004) (Ward, et al. 1996), (Mingam, et al. 2008), (Lafourcade, et al. 2011). Cette substitution se ferait au détriment des propriétés biophysiques spécifiques du DHA. Cependant, les effets directs de l'AA et du DPA sur des systèmes cellulaires *in vitro* ont été peu étudiés. Dans notre étude, nous avons testé indépendamment l'impact d'un enrichissement du milieu de culture en DHA, AA et DPA sur la voie de signalisation de l'IL-6 dans les cellules microgliales BV2. Dans un premier temps, nous avons mesuré l'incorporation de ces AGPI dans les cellules BV2. Nous montrons, qu'à une concentration de 30 $\mu$ M d'AGPI dans le milieu de culture, les taux de ces AGPI augmentent de manière significative dans les acides gras totaux des cellules BV2 (11%, 5,5% et 8% pour le DHA, AA et DPA respectivement). Il est intéressant de noter qu'un prétraitement des cellules par le DPA augmente le taux d'AA (C20:4 n-6), ce qui suggère qu'une partie du DPA (C22:5 n-6) a été rétro-converti en AA. Nous n'avons pas observé d'augmentation de DPA dans des cellules traitées à l'AA comme c'est le cas *in vivo* dans les cerveaux d'animaux nourris avec l'acide linoléique, précurseur de l'AA. Il est possible que les cellules BV2 ne possèdent pas la machinerie nécessaire à la conversion de l'AA en DPA, régulée par une élongase et une  $\Delta$ 6 désaturase. Le DHA et l'AA s'incorporent préférentiellement dans les phospholipides de la bicouche membranaire, Il serait intéressant d'analyser dans quelles populations de phospholipides les AGPI étudiés se concentrent notamment le DPA n-6.

Nos résultats suggèrent que l'incorporation de DHA et d'AA pourrait moduler la concentration de cholestérol mais pas le DPA. L'AA semble augmenter la concentration du cholestérol mais de manière non significative, ces résultats demandent à être confirmés et n'ont pas été décrits dans la littérature. A l'inverse, nous observons que l'incorporation du DHA a tendance à diminuer le taux de cholestérol dans les cellules BV2. Il a été décrit en effet que le DHA présente une incompatibilité stérique avec le cholestérol dépendante de son incorporation dans les phosphatidyl éthanolamine (PE). Cette propriété physico-chimique permet au DHA de réduire le taux de cholestérol membranaire (Schiley PD et al., 2007) ou en modifier la distribution spatiale (Shaikh and Teague 2012; Wassall and Stillwell 2009). Le cholestérol étant un des constituants majeurs des rafts, le DHA peut modifier ainsi leur taille et leur

dynamique (revue Shaikh 2010). D'autre part, nous confirmons qu'un traitement par  $\beta$ -MCD induit la déplétion du cholestérol dans les cellules BV2. Ceci confirme l'action de cet agent pharmacologique, en tant que chélateur du cholestérol, connue pour désintégrer les rafts. Cet effet est à relier avec nos résultats montrant que  $\beta$ -MCD induit un remaniement à la surface des cellules des gangliosides GM1, autres constituants des rafts. Les GM1 ont des propriétés physiologiques importantes et impactent sur la plasticité neuronale et les mécanismes de réparations cellulaires (Mocchetti 2005). En effet, les GM1 augmentent le relargage de neurotransmetteurs et de facteurs de croissance neuronaux (Rabin, et al. 2002) dans les neurones et même dans les cellules gliales. Ils pourraient moduler l'activité des canaux calciques présents à la surface cellulaire au niveau des cavéoles et des lipides rafts. De plus, les GM1 peuvent moduler la distribution de cholestérol entre les feuillettes externes et internes des membranes plasmiques (Rondelli, et al. 2012). Sur des membranes lipidiques synthétiques, l'ajout de GM1 a pour effet un rééquilibrage du ratio en cholestérol de 80% feuillet interne - 20% feuillet externe. Récemment, une étude réalisée dans des splénocytes murins isolées *ex vivo* montre qu'un régime enrichi en  $\omega$ 3 (huile de poisson) induit une augmentation des GM1 à la surface des cellules comparé à un régime standard (Rockett, et al. 2012). Ces résultats sont contraires à ceux que nous avons obtenus dans les cellules microgliales BV2 traitées au DHA où nous observons une diminution de l'expression des GM1 à la surface des cellules.

Des travaux menés au laboratoire montrent que l'incorporation du DHA dans les phospholipides membranaires des cellules BV2 induit la suppression à la surface cellulaire des protéines CD14 et TLR4 appartenant au complexe récepteur du LPS dans la microglie (De Smedt-Peyrusse, et al. 2008). Ce phénomène est-il spécifique aux récepteurs du LPS ? Nous avons testé l'impact de l'incorporation des AGPI  $\omega$ 3 et  $\omega$ 6 sur l'expression des récepteurs de l'IL-6, GP80 et GP130 en cytométrie de flux. Nous montrons que les AGPI ne modifient pas l'expression totale des récepteurs. L'incorporation du DPA n'a pas d'effet sur la présentation des récepteurs ni sur la réponse à l'IL-6. Ceci indique que le DPA joue un rôle sur l'architecture membranaire mais n'a pas d'effet fonctionnel. En revanche le DHA et l'AA, incorporés dans les acides gras totaux, induisent une réduction de l'expression des deux récepteurs de l'IL-6 à la surface des cellules BV2 pouvant limiter l'accession de l'IL-6 à ses récepteurs. Il a été décrit que le DHA et l'AA réduisaient l'expression de surface des antigènes HLA dans les cellules de la lymphoblastique JY en inhibant le transport du HLA entre le RE et la membrane plasmique (Shaikh and Edidin 2007). Il est possible également que le degré d'insaturation des AGPI module la fluidité membranaire et provoque une internalisation des récepteurs comme nous l'avons montré pour l'effet du DHA sur les récepteurs du LPS (De Smedt-Peyrusse, et al. 2008). Un modèle biophysique développant des membranes artificielles montre que les phospholipides contenant du DHA forment des domaines membranaires non rafts, distincts des rafts, altérant la conformation et l'organisation

latérale des protéines (Wassall and Stillwell 2009). La structure moléculaire du DHA due à 22 carbones et 6 doubles liaisons est hautement désorganisée par rapport aux autres AGPI et aux acides gras saturés. Le DHA, de par sa structure flexible peut adopter différents états de conformations. Cette propriété unique du DHA peut induire des changements importants dans l'organisation et les propriétés physico chimiques de la membrane (élasticité, fusion vésiculaire, phospholipides flip flop et organisation membranaire latérale (Stillwell and Wassall 2003).

Bien que nos données indiquent que l'AA et DHA induisent une réduction de l'expression de GP80 et GP130, l'intensité de cette réponse à l'IL-6 est dépendante du type d'AGPI. Le DHA inhibe l'activation de STAT3 par l'IL-6 alors que l'AA la réduit. De manière intéressante, nous montrons que l'expression de STAT3 est augmentée par l'AA en condition basale qui pourrait compenser un défaut d'activation de la protéine comme nous l'avons déjà montré *in vivo* dans le cas d'une carence en AGPI  $\omega$ 3 pour STAT1. Il est possible que l'AA exerce un effet direct ou indirect via ses dérivés lipidiques sur l'expression génique de STAT par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires de type PPAR (Desvergne and Wahli 1999). Le DHA n'a pas d'effet sur l'expression de STAT3 et induit une inhibition totale de son activation dépendante de l'IL-6. Un des mécanismes par lequel le DHA pourrait modifier la fonction cellulaire passerait par les changements dans l'organisation des domaines rafts. Dans la partie 1 de ce travail, nous montrons que le complexe Jak2/STAT3 est présent dans les rafts en conditions basales. Il serait intéressant d'étudier si la localisation du complexe dans les rafts est modifiée par le DHA. Les rafts lipidiques, auxquels sont associés de nombreux récepteurs dont CD14 (Triantafilou, et al. 2002) sont riches en sphingolipides et en cholestérol et pauvres en AGPI (Simmons and Toomre, 2000, (De Smedt-Peyrusse, et al. 2008). Certains travaux montrent ainsi que le traitement par le DHA modifie la composition lipidique des rafts, induisant des altérations de protéines et des voies de signalisations associées. Dans les lymphocytes T de la lignée Jurkat, le traitement par le DHA modifie la composition lipidique des rafts et altère la signalisation Jak/STAT associée à l'IL-2 en déplaçant le récepteur de l'IL-2 à l'extérieur des rafts (Li, et al. 2005). Dans les cellules endothéliales de la vascularisation rétinienne, le DHA diminue le cholestérol dans les rafts et inhibe la signalisation du TNF $\alpha$ . *In vivo*, la supplémentation alimentaire en DHA diminue la teneur en sphingomyéline des rafts dans les lymphocytes T de souris ainsi que l'activation de la voie NF $\kappa$ B et la production de cytokines inflammatoires associées (Fan, et al. 2004). Le DHA est donc capable de moduler l'expression membranaire des récepteurs et des voies de signalisation associées.

Le modèle BV2 nous a permis de caractériser des effets spécifiques de l'AA et du DHA, constituants fondamentaux de phospholipides des membranes des cellules. La teneur de ces AGPI varie en fonction de l'apport alimentaire et joue sur les propriétés physico-chimiques des membranes des cellules cérébrales. Il était intéressant de conduire, parallèlement à des études *in vitro*, des études *ex vivo*,

pour établir la relation fonctionnelle entre l'apport en AGPI  $\omega$ 3 et l'activation des voies de signalisation des cytokines, en particulier celle de l'IL-6 dans les cellules microgliales. Cette étude a été menée dans un modèle de carence en AGPI  $\omega$ 3 (1  $\omega$ 3 pour 100  $\omega$ 6) comparé à un modèle équilibré en  $\omega$ 3 (1  $\omega$ 3 pour 5  $\omega$ 6). Dans les cellules microgliales extraites de souris soumises à ces deux groupes de régime, l'expression des récepteurs GP80 et GP130 a été analysée en cytométrie de flux. Nos résultats ne montrent pas de différences ni dans l'expression des récepteurs ni dans l'activation de ces cellules par l'IL-6 entre les deux groupes. Ces données ne reflètent pas les altérations de la voie STAT3 induite par le LPS dans l'hippocampe chez des souris soumises à un régime carencé (Mingam, et al. 2008). D'autres cibles de l'IL-6 que les cellules microgliales peuvent être sensibles aux variations lipidiques induites par la diète. C'est le cas des astrocytes qui expriment les récepteurs de l'IL-6 et qui sont capables d'activer la voie Jak2/STAT3 en situation inflammatoire de manière précoce (Oliva, et al. 2012). Cette piste reste à être explorée.



## V- Conclusions et Perspectives

**Rôle de Jak2 dans la voie de signalisation de L'IL-6.** Nous avons mis en évidence un pré-complexe Jak2-STAT3 dans l'hippocampe et dans les cellules BV2 en absence de stimulation de la voie IL-6. Ceci n'avait jamais été décrit dans aucun modèle mais l'existence de ce complexe est cohérente avec les données de la littérature qui décrivent une association partielle de STAT3 au niveau de la membrane plasmique dans une lignée hépatocytaire. Notre étude apporte un élément nouveau dans la compréhension du mécanisme d'activation de STAT3 au niveau membranaire. Cependant, il serait important d'invalider l'expression de Jak2 par siRNA (expériences en cours) pour confirmer le rôle de Jak2 dans le recrutement de STAT3 dans les domaines membranaires de type rafts et son rôle spécifique dans l'activation de STAT3 induite par l'IL-6. Nos résultats suggèrent que Jak2 constitue le lien physique entre STAT3 et les domaines rafts en association avec le domaine cytoplasmique de GP130 et/ou des protéines adaptatrices. La caractérisation de ce complexe protéique et la modulation des interactions protéines/lipides au niveau membranaire nécessiterait le développement d'analyses protéomiques (Q exactive). De plus, nous montrons que Jak2 associé au pré-complexe est phosphorylé sur son résidu Y1007/1008. Quelle est la signification et quel est le rôle de cette phosphorylation en basal ? Plusieurs hypothèses sont à envisager : 1) Jak2 est transphosphorylé par GP130 suggérant une association de Jak2 avec GP130. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait immunoprécipiter GP130, analyser son état de phosphorylation et une possible association de GP130 avec Jak2 et STAT3. 2) la phosphorylation de Jak2 est nécessaire au recrutement de STAT3. Dans ce cas, nous pourrions tester l'action d'un inhibiteur de phosphorylation de Jak2, AG490, sur l'intégrité du complexe Jak2-STAT3.

**Rôle des rafts dans la voie de signalisation de L'IL-6 et influence des AGPI.** Nous avons isolé les domaines rafts à partir d'hippocampes de souris et caractérisé la localisation des récepteurs de l'IL-6 (GP130 et GP80) et des protéines de la voie de signalisation Jak2/STAT3 dans les différents domaines membranaires (raft/non raft). STAT3 est associé aux domaines rafts dans l'hippocampe de souris. L'abolition de l'activation de STAT3 consécutive à la destruction des lipides rafts par un inhibiteur (Methyl- $\beta$ -Cyclo-Dextrine) démontre l'implication fonctionnelle des rafts dans l'activation de STAT3. Visualiser les rafts et suivre leur dynamique apporteraient des éléments nouveaux dans la compréhension de leur fonction dans la réponse cellulaire aux stimuli inflammatoires (LPS, cytokines) et sur l'impact des AGPIs sur ces processus. L'imagerie moléculaire par spectrométrie de masse (MALDI) sur des cryo-coupes de tissus cérébraux ou cellules isolées (neurones, microglies) permettrait de réaliser ce travail.

**Effet des AGPI sur les propriétés physico-chimiques des membranes.** Nous avons émis l'hypothèse que la teneur membranaire en AGPI incorporés dans les phospholipides pouvait influencer la fonctionnalité des radeaux lipidiques (rafts) et ainsi modifier le couplage récepteur/voie de signalisation. L'acide docosohexanoïque (DHA, AGPI  $\omega$ 3 longue chaîne), en s'incorporant dans les phospholipides membranaires, impose des contraintes physiques sur les domaines rafts et entre en compétition avec le cholestérol composant les rafts. Cette action peut modifier la fonctionnalité des rafts auxquels sont associés transitoirement des récepteurs et des complexes protéiques impliqués dans la transduction des signaux de ces récepteurs. L'action des AGPI sur la fluidité membranaire pourrait induire une internalisation des récepteurs, modifier le trafic des récepteurs à la membrane mais également moduler les interactions GP80-GP130 pour former des hétérodimères en réponse à leur ligand IL-6. Pour étudier cette possibilité, nous avons initié des expériences utilisant la technique de Quantum dot. Le principe de cette méthode repose sur le marquage des protéines de surface par des anticorps couplés à des nanoparticules fluorescentes dont l'émission détectée en microscopie à épifluorescence est stable. Elle permet d'apprécier la mobilité des protéines marquées qui est déterminée par leur coefficient de diffusion dans la cellule vivante. Les interactions des récepteurs pourraient être étudiées par la technique de FRET (fluorescence résonance énergie transfert) qu'il serait utile de développer au laboratoire.

**Développement du modèle *ex vivo* et *in vitro*.** Nos expériences menées sur les microglies *ex vivo* isolées à partir de cerveaux de souris soumises à un régime carencé ou équilibré en  $\omega$ 3 sont incomplètes et n'ont pas permis de mettre en évidence de différence dans ces cellules, ni au niveau de l'expression des récepteurs de l'IL-6, ni dans l'activation de la voie STAT3 induite de manière exogène par l'IL-6. Ces données ne reflètent pas les résultats précédemment publiés au laboratoire montrant que les souris carencées en  $\omega$ 3 présentaient un défaut de l'activation de STAT3 dans l'hippocampe sous l'effet de l'administration de LPS. Plusieurs expériences pourraient être menées pour réconcilier ces deux modèles et affiner nos résultats. 1) Des modifications phénotypiques (expression des récepteurs à l'IL-6) des microglies pourraient être structures dépendantes. Il serait intéressant de caractériser les microglies isolées à partir d'hippocampes dans les deux groupes de régimes. 2) Nous avons testé une dose unique d'IL-6 dans une fraction enrichie en microglies issues de cerveaux entiers. Il est possible que cette dose d'IL-6 soit trop importante et masque une réactivité différentielle des cellules issues des deux groupes de régimes. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions établir une dose réponse d'IL-6 exogène pour compléter nos données. Dans le même ordre d'idée, il serait intéressant de traiter les cellules avec du LPS pour se rapprocher du modèle *in vivo*. Dans ces deux cas, l'activation de STAT3 *in situ* pourrait être mesurée plus spécifiquement dans ces cellules en cytométrie de flux (intensité de fluorescence de P-STAT3 intracellulaire). 3) Une autre cible

cellulaire potentielle des AGPI dans la réponse à l'IL-6 pourrait être l'astrocyte qui présente fortement les récepteurs GP80 et GP130 à sa surface. Dans le protocole utilisé pour extraire les microglies des cerveaux de souris, nous observons dans les gradients de Percoll, une fraction enrichie en GFAP, protéine exprimée spécifiquement par les astrocytes. Nous pourrions de la même manière que pour les microglies, identifier les astrocytes de cette fraction en cytométrie de flux grâce à un récepteur de surface spécifique comme GLAST et évaluer leur réponse *in vitro* à l'IL-6 et au LPS. 4) Nous avons montré que le DHA avait un effet drastique sur la réponse des BV2 à l'IL-6, tant sur la réduction de l'expression des récepteurs que sur l'abolition de l'activité de STAT3, confirmant l'effet anti-inflammatoire de cet AGPI largement décrit *in vivo*. Les effets d'un régime supplémenté en  $\omega$ 3 dans le système *ex vivo* que nous avons développé, serait une approche d'intérêt pour mieux comprendre *in situ* l'action du DHA sur les cellules gliales et par conséquent son rôle protecteur joué dans la neuroinflammation. 5) Une analyse de la composition lipidique des populations cellulaires cérébrales extraites après régime carencé, équilibré et supplémenté en  $\omega$ 3 serait indispensable. 6) Ces données nous permettraient de mettre au point des modèles *in vitro* mimant les variations de composition lipidique induites par les différents régimes dans les BV2 ou dans d'autres lignées cellulaires.

## **Bibliographie**

- Aloisi, F.  
2001 Immune function of microglia. *Glia* 36(2):165-79.
- Banati, R. B., et al.  
1993 Early and rapid de novo synthesis of Alzheimer beta A4-amyloid precursor protein (APP) in activated microglia. *Glia* 9(3):199-210.
- Banks, W. A.  
2006 The blood-brain barrier in psychoneuroimmunology. *Neurol Clin* 24(3):413-9.
- Becher, B., and J. P. Antel  
1996 Comparison of phenotypic and functional properties of immediately ex vivo and cultured human adult microglia. *Glia* 18(1):1-10.
- Behrmann, I., et al.  
2004 Janus kinase (Jak) subcellular localization revisited: the exclusive membrane localization of endogenous Janus kinase 1 by cytokine receptor interaction uncovers the Jak.receptor complex to be equivalent to a receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 279(34):35486-93.
- Bessis, A., et al.  
2007 Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55(3):233-8.
- Blasi, E., et al.  
1990 immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol* 27(2-3):229-37.
- Boulanger, M. J., et al.  
2003 Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science* 300(5628):2101-4.
- Budowski, P.  
1988 omega 3-fatty acids in health and disease. *World Rev Nutr Diet* 57:214-74.
- Buk, D. M., O. Renner, and L. Graeve  
2005 Increased association with detergent-resistant membranes/lipid rafts of apically targeted mutants of the interleukin-6 receptor gp80. *Eur J Cell Biol* 84(10):819-31.
- Burton, M. D., N. L. Sparkman, and R. W. Johnson  
2011 Inhibition of interleukin-6 trans-signaling in the brain facilitates recovery from lipopolysaccharide-induced sickness behavior. *J Neuroinflammation* 8:54.
- Calder, P. C.  
2006 Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75(3):197-202.
- Cohen, I. R., and S. Livnat  
1976 The cell-mediated immune response: interactions of initiator and recruited T lymphocytes. *Transplant Rev* 29:24-58.
- Dantzer, R.  
2001 Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Ann N Y Acad Sci* 933:222-34.
- De Caterina, R., and P. Libby  
1996 Control of endothelial leukocyte adhesion molecules by fatty acids. *Lipids* 31 Suppl:S57-63.
- De Smedt-Peyrusse, V., et al.  
2008 Docosahexaenoic acid prevents lipopolysaccharide-induced cytokine production in microglial cells by inhibiting lipopolysaccharide receptor presentation but not its membrane subdomain localization. *J Neurochem* 105(2):296-307.
- Desvergne, B., and W. Wahli

- 1999 Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20(5):649-88.
- Dong, Y., and E. N. Benveniste  
2001 Immune function of astrocytes. *Glia* 36(2):180-90.
- Duhe, R. J., and W. L. Farrar  
1998 Structural and mechanistic aspects of Janus kinases: how the two-faced god wields a double-edged sword. *J Interferon Cytokine Res* 18(1):1-15.
- Fan, Y. Y., et al.  
2004 Dietary docosahexaenoic acid suppresses T cell protein kinase C theta lipid raft recruitment and IL-2 production. *J Immunol* 173(10):6151-60.
- Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane Stanley  
1957 A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226(1):497-509.
- Fong, Y., et al.  
1989 Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. *J Exp Med* 170(5):1627-33.
- Ford, A. L., et al.  
1995 Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared. *J Immunol* 154(9):4309-21.
- Gautron, L., V. De Smedt-Peyrusse, and S. Laye  
2006 Characterization of STAT3-expressing cells in the postnatal rat brain. *Brain Res* 1098(1):26-32.
- Godbout, J. P., et al.  
2005 Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. *FASEB J* 19(10):1329-31.
- Goujon, E., et al.  
1995 Corticosterone regulates behavioral effects of lipopolysaccharide and interleukin-1 beta in mice. *Am J Physiol* 269(1 Pt 2):R154-9.
- Greenhill, C. J., et al.  
2011 IL-6 trans-signaling modulates TLR4-dependent inflammatory responses via STAT3. *J Immunol* 186(2):1199-208.
- Guo, G. G., et al.  
2002 Association of the chaperone glucose-regulated protein 58 (GRP58/ER-60/ERp57) with Stat3 in cytosol and plasma membrane complexes. *J Interferon Cytokine Res* 22(5):555-63.
- Haeffner-Cavaillon, N., et al.  
1989 In vivo induction of interleukin-1 during hemodialysis. *Kidney Int* 35(5):1212-8.
- Hart, B. L.  
1988 Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev* 12(2):123-37.
- Henn, A., et al.  
2009 The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX* 26(2):83-94.
- Henry, C. J., et al.  
2009 Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain Behav Immun* 23(3):309-17.
- Hibi, M., et al.  
1990 Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 63(6):1149-57.

- Holman, R. T.  
1998 The slow discovery of the importance of omega 3 essential fatty acids in human health. *J Nutr* 128(2 Suppl):427S-433S.
- Jostock, T., et al.  
2001 Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem* 268(1):160-7.
- Jou, I., et al.  
2006 Gangliosides trigger inflammatory responses via TLR4 in brain glia. *Am J Pathol* 168(5):1619-30.
- Kim, H. Y., et al.  
2006 Raft-mediated Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2 (SHP-2) regulation in microglia. *J Biol Chem* 281(17):11872-8.
- Kim, J., et al.  
2004 Involvement of cholesterol-rich lipid rafts in interleukin-6-induced neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate cancer cells. *Endocrinology* 145(2):613-9.
- Kim, W., et al.  
2010 Regulatory activity of polyunsaturated fatty acids in T-cell signaling. *Prog Lipid Res* 49(3):250-61.
- Konsman, J. P., et al.  
2004 Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. *J Comp Neurol* 472(1):113-29.
- Kreutzberg, G. W.  
1996 Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19(8):312-8.
- Lacroix, S., D. Feinstein, and S. Rivest  
1998 The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. *Brain Pathol* 8(4):625-40.
- Laflamme, N., and S. Rivest  
2001 Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J* 15(1):155-163.
- Lafourcade, M., et al.  
2011 Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nat Neurosci* 14(3):345-50.
- Larbi, A., et al.  
2004 Effects of methyl-beta-cyclodextrin on T lymphocytes lipid rafts with aging. *Exp Gerontol* 39(4):551-8.
- Laye, S., et al.  
1994 Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain Res Mol Brain Res* 27(1):157-62.
- Lee, H. Y., et al.  
2012 Changes of ribosomal protein S3 immunoreactivity and its new expression in microglia in the mice hippocampus after lipopolysaccharide treatment. *Cell Mol Neurobiol* 32(4):577-86.
- Lee, S. C., et al.  
1993 Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol* 150(7):2659-67.
- Li, Q. R., et al.  
2005 Interleukin-2alpha receptor in membrane lipid rafts. *Transplant Proc* 37(5):2395-7.
- Marin-Teva, J. L., et al.  
2004 Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41(4):535-47.

- May, L. T., et al.  
1991 Marked cell-type-specific differences in glycosylation of human interleukin-6. *Cytokine* 3(3):204-11.
- Medzhitov, R.  
2001 Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1(2):135-45.
- Mingam, R., et al.  
2008 Uncoupling of interleukin-6 from its signalling pathway by dietary n-3-polyunsaturated fatty acid deprivation alters sickness behaviour in mice. *Eur J Neurosci* 28(9):1877-86.
- Mocchetti, I.  
2005 Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins. *Cell Mol Life Sci* 62(19-20):2283-94.
- Moriguchi, T., et al.  
2004 Effects of an n-3-deficient diet on brain, retina, and liver fatty acyl composition in artificially reared rats. *J Lipid Res* 45(8):1437-45.
- Morrison, W. R., and L. M. Smith  
1964 Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride--Methanol. *J Lipid Res* 5:600-8.
- Ndubuisi, M. I., et al.  
1999 Cellular physiology of STAT3: Where's the cytoplasmic monomer? *J Biol Chem* 274(36):25499-509.
- Ng, J., and D. Cantrell  
1997 STAT3 is a serine kinase target in T lymphocytes. Interleukin 2 and T cell antigen receptor signals converge upon serine 727. *J Biol Chem* 272(39):24542-9.
- Ohmichi, M., et al.  
1992 Binding sites for interleukin-6 in the anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology* 55(2):199-203.
- Okugawa, S., et al.  
2003 Janus kinase 2 is involved in lipopolysaccharide-induced activation of macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol* 285(2):C399-408.
- Oliva, A. A., Jr., et al.  
2012 STAT3 signaling after traumatic brain injury. *J Neurochem* 120(5):710-20.
- Olsson, S., and R. Sundler  
2006 The role of lipid rafts in LPS-induced signaling in a macrophage cell line. *Mol Immunol* 43(6):607-12.
- Paolicelli, R. C., et al.  
2011 Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333(6048):1456-8.
- Pfeffer, L. M., F. R. Landsberger, and I. Tamm  
1981 Beta-interferon-induced time-dependent changes in the plasma membrane lipid bilayer of cultured cells. *J Interferon Res* 1(4):613-20.
- Podar, K., et al.  
2003 Essential role of caveolae in interleukin-6- and insulin-like growth factor I-triggered Akt-1-mediated survival of multiple myeloma cells. *J Biol Chem* 278(8):5794-801.
- Rabin, S. J., A. Bachis, and I. Mocchetti  
2002 Gangliosides activate Trk receptors by inducing the release of neurotrophins. *J Biol Chem* 277(51):49466-72.
- Rockett, B. D., et al.  
2012 Fish oil increases raft size and membrane order of B cells accompanied by differential effects on function. *J Lipid Res* 53(4):674-85.
- Rondelli, V., et al.

- 2012 Ganglioside GM1 forces the redistribution of cholesterol in a biomimetic membrane. *Biochim Biophys Acta* 1818(11):2860-7.
- Sadeghi, S., F. A. Wallace, and P. C. Calder  
1999 Dietary lipids modify the cytokine response to bacterial lipopolysaccharide in mice. *Immunology* 96(3):404-10.
- Sanz, E., et al.  
2008 Minimal role for STAT1 in interleukin-6 signaling and actions in the murine brain. *Glia* 56(2):190-9.
- Sato, N., et al.  
2003 Involvement of heat-shock protein 90 in the interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3. *Biochem Biophys Res Commun* 300(4):847-52.
- Satriotomo, I., K. K. Bowen, and R. Vemuganti  
2006 JAK2 and STAT3 activation contributes to neuronal damage following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 98(5):1353-68.
- Sawada, M., et al.  
1993 Expression of cytokine receptors in cultured neuronal and glial cells. *Neurosci Lett* 160(2):131-4.
- Sawin, K. J., et al.  
2008 The development of the NAPNAP research agenda: priorities for evidence in pediatric practice 2008-2013. *J Pediatr Health Care* 22(3):208-10.
- Scheller, J., and S. Rose-John  
2006 Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med Microbiol Immunol* 195(4):173-83.
- Schobitz, B., D. A. Voorhuis, and E. R. De Kloet  
1992 Localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Neurosci Lett* 136(2):189-92.
- Schuringa, J. J., et al.  
2000 Interleukin-6-induced STAT3 transactivation and Ser727 phosphorylation involves Vav, Rac-1 and the kinase SEK-1/MKK-4 as signal transduction components. *Biochem J* 347 Pt 1:89-96.
- Sehgal, P. B., et al.  
2002 Cytokine signaling: STATS in plasma membrane rafts. *J Biol Chem* 277(14):12067-74.
- Shah, M., et al.  
2002 Interactions of STAT3 with caveolin-1 and heat shock protein 90 in plasma membrane raft and cytosolic complexes. Preservation of cytokine signaling during fever. *J Biol Chem* 277(47):45662-9.
- Shaikh, S. R., and M. Edidin  
2007 Immunosuppressive effects of polyunsaturated fatty acids on antigen presentation by human leukocyte antigen class I molecules. *J Lipid Res* 48(1):127-38.
- Shaikh, S. R., et al.  
2009 Docosahexaenoic acid modifies the clustering and size of lipid rafts and the lateral organization and surface expression of MHC class I of EL4 cells. *J Nutr* 139(9):1632-9.
- Shaikh, S. R., and H. Teague  
2012 N-3 fatty acids and membrane microdomains: From model membranes to lymphocyte function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 87(6):205-8.
- Sheets, E. D., D. Holowka, and B. Baird  
1999 Critical role for cholesterol in Lyn-mediated tyrosine phosphorylation of FcepsilonRI and their association with detergent-resistant membranes. *J Cell Biol* 145(4):877-87.
- Simons, K., and G. van Meer  
1988 Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27(17):6197-202.
- Simopoulos, A. P.

- 2002 Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr* 21(6):495-505.
- Sparkman, N. L., et al.  
2006 Interleukin-6 facilitates lipopolysaccharide-induced disruption in working memory and expression of other proinflammatory cytokines in hippocampal neuronal cell layers. *J Neurosci* 26(42):10709-16.
- Stillwell, W., and S. R. Wassall  
2003 Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem Phys Lipids* 126(1):1-27.
- Streit, W. J., M. B. Graeber, and G. W. Kreutzberg  
1989 Expression of Ia antigen on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motor neuron injury. *Exp Neurol* 105(2):115-26.
- Taga, T., et al.  
1989 Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58(3):573-81.
- Terao, A., et al.  
2002 Immune response gene expression increases in the aging murine hippocampus. *J Neuroimmunol* 132(1-2):99-112.
- Triantafilou, M., et al.  
2002 Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J Cell Sci* 115(Pt 12):2603-11.
- Vallieres, L., and S. Rivest  
1997 Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta. *J Neurochem* 69(4):1668-83.
- Ward, G., et al.  
1996 Artificial rearing of infant rats on milk formula deficient in n-3 essential fatty acids: a rapid method for the production of experimental n-3 deficiency. *Lipids* 31(1):71-7.
- Wassall, S. R., and W. Stillwell  
2009 Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: domain formation in membranes. *Biochim Biophys Acta* 1788(1):24-32.
- Waugh, M. G., D. Lawson, and J. J. Hsuan  
1999 Epidermal growth factor receptor activation is localized within low-buoyant density, non-caveolar membrane domains. *Biochem J* 337 ( Pt 3):591-7.
- Williams, J. A., et al.  
2012 Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids segregate differently between raft and nonraft domains. *Biophys J* 103(2):228-37.
- Williamson, L. L., et al.  
2011 Microglia and memory: modulation by early-life infection. *J Neurosci* 31(43):15511-21.
- Woodcock, J. M., C. J. Bagley, and A. F. Lopez  
1997 Receptors of the cytokine superfamily: mechanisms of activation and involvement in disease. *Baillieres Clin Haematol* 10(3):507-24.
- Wynne, A. M., et al.  
2010 Protracted downregulation of CX3CR1 on microglia of aged mice after lipopolysaccharide challenge. *Brain Behav Immun* 24(7):1190-201.

