

ÉCOLE DOCTORALE 414 Des sciences de la vie et de la santé

[UMR CNRS 7242 BSC]

THÈSE présentée par :

Thomas KUNTZEL

soutenue le : **5 octobre 2022**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Analyse systématique des interactions des
domaines transmembranaires : du récepteur de
l'interleukine-10 et AMIG03 à l'ensemble des
récepteurs à activité tyrosine kinase**

THÈSE dirigée par :

Pr. Dominique BAGNARD

PhD, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS EXTERNES :

Dr. Séverine BOILLEE

PhD, Institut du Cerveau, Sorbonne Université, Paris

Pr. Michel BOUVIER

PhD, Université de Montréal

EXAMINATEUR INTERNE :

Dr. Monique DONTENWILL

PhD, Université de Strasbourg

A mes grands-parents

Vous m'avez toujours soutenu et encouragé et je sais que vous serez toujours près de moi.

Fer mini grosseltere

Ehr han mi immer understed'st un ich weis dos n'r fer immer bi'mr sin.

Sommaire

Sommaire	3
Remerciements	6
Liste des abréviations	9
Liste des figures	13
Introduction	14
I. Les interactions protéine-protéine au sein de la membrane plasmique	14
1) Les interactions protéine-protéine : historique	14
2) Les méthodes pour étudier les interactions protéine-protéine	18
3) La membrane plasmique, une barrière aux fonctions multiples	23
4) Les récepteurs membranaires, des « substances réceptrices » à l'origine des signalisations cellulaires	25
II. Le domaine transmembranaire, plus qu'un rôle d'ancrage ?	29
1) Description du domaine transmembranaire	29
2) Historique de l'étude du domaine transmembranaire	32
3) La séquence en acides aminés possède un rôle prépondérant	35
4) Les méthodes pour analyser les interactions du domaine TM	38
III. Le domaine transmembranaire, une cible thérapeutique ?	41
1) La découverte des <i>membrane targeting peptides</i>	41
2) Comment solubiliser le peptide pour qu'il puisse atteindre sa cible ?	44

3)	Des outils pour cibler les cellules tumorales	46
4)	Les <i>Membrane Targeting Peptides</i> et le système nerveux central	47
IV.	L'implication du domaine transmembranaire dans les plateformes de récepteurs : vers de nouveaux traitements ?	49
1)	La plateforme du récepteur NgR dans le contexte de la sclérose en plaques	49
2)	La plateforme du récepteur de l'interleukine-10 et son rôle dans la polarisation des macrophages et de la microglie	52
a)	Le récepteur de l'interleukine-10	52
b)	La polarisation des macrophages et de la microglie : mythe ou réalité ?	55
	Objectifs de la thèse	76
	Résultats	78
I.	Implication du domaine TM d'AMIGO3 dans la plateforme du récepteur NgR par l'étude du peptide MTP-AMIGO3	78
II.	Implication du domaine TM dans l'oligomérisation du récepteur de l'interleukine-10	105
III.	Systématiser les connaissances sur l'implication du domaine TM dans les interactions entre tous les récepteurs à activité tyrosine-kinase	136
1)	Introduction : les récepteurs à activité tyrosine kinase	136
2)	Matériel et méthodes : le criblage <i>in vitro</i> par BRET	138
3)	Résultats : un criblage à grand échelle	141
a)	Validation technique	141
b)	L'asymétrie des valeurs	143
c)	Une carte d'interaction complète et spécifique	144
d)	Un interactome aux perspectives d'analyses très larges	149
4)	Discussion : un criblage ouvrant la voie à de nouvelles approches thérapeutiques ?	152

Discussion	156
I. Approches méthodologiques communes	156
1) La modélisation <i>in silico</i> des interactions TM	157
2) La validation biologique par BRET	158
II. La plateforme du récepteur impliquant AMIG03 : inhiber une inhibition ?	161
1) L'implication du domaine TM d'AMIG03	161
2) AMIG03, une cible thérapeutique ?	162
III. Le récepteur de l'interleukine-10, un ciblage difficile	166
1) L'implication du domaine transmembranaire dans l'oligomérisation du récepteur	166
2) Le récepteur de l'interleukine-10, des attentes et des échecs	168
3) Induire l'activation du récepteur de l'interleukin-10 pour empêcher l'inflammation	169
4) Inhiber l'activation du récepteur de l'interleukine-10 pour réactiver l'inflammation dans les tumeurs	171
IV. La systématisation de l'étude de l'implication du domaine transmembranaire sur l'interaction des récepteurs membranaires	173
V. Les <i>membrane targeting peptides</i> , un beau futur en perspective ?	176
Conclusion	178
Références bibliographiques	182
Liste des articles et communications	195

Remerciements

Avant de commencer, je souhaite remercier un certain nombre personnes qui m'ont aidé à réaliser ce travail.

Je remercie les membres de mon jury de thèse, Dr. Séverine Boillée, Dr. Monique Dontenwill et Pr. Michel Bouvier, pour avoir pris un peu de leur temps pour évaluer mon travail et pour l'intérêt que vous y avez porté.

Je remercie Dr. Jean-Luc Galzi de m'avoir permis d'effectuer cette thèse au sein de l'unité CNRS 7242 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire.

Je remercie en particulier mon directeur de thèse Pr. Dominique Bagnard pour son soutien durant cette thèse. Tu as toujours vu le verre à moitié plein quand je le voyais à moitié vide et tu m'as proposé des solutions à mes problèmes... J'ai pu apprendre tant de choses pendant ces quatre années et me sens prêt à affronter de nouveaux *challenge*.

Gérard, je te remercie pour tes bons conseils pour jongler avec les peptides TM. Ton expérience m'aura bien été utile ! Et bien que nous ne te voyions plus beaucoup au labo, ton esprit est toujours là à nous juger lorsque nous osons simplement toucher un flacon de DMSO !

Caroline, la matriarche du labo, je te remercie pour ton aide dans la réalisation de cette thèse. Tu es non seulement le bourreau des souris mais aussi la spécialiste des blots et je suis content d'avoir pu bénéficier de ton œil expert. Et puis un peu de solidarité entre *Untereksässer* ne fait pas de mal contre tous ces *Overlander* ou *Hargeloffeni*...

Aurore, tu as été là pour m'apprendre les bases, tout au début de mon stage de M2 et je t'en remercie. Après une période de disparition, tu es réapparue plus forte que jamais, comme si tu avais gagné un nouveau level. Je te remercie pour nos discussions à midi et pour nous avoir partagé l'existence de l'aligot.

Thanos, I thank you for your joy that lighted up our routines. Though you may perceive me as distant and strict; I really enjoyed the time we spent together, and it was always very funny!

Merveille, je te remercie pour tes conseils et tes idées dans notre projet commun. C'était un plaisir d'avoir pu collaborer avec toi là-dessus. J'espère que nous pourrons en sortir quelque chose !

Imane, spécialiste dans la tranche fine depuis 2020. Qui aurait cru que nous aurions une cohabitation dans le bureau aussi harmonieuse entre un animal du désert et un autre de la banquise ? Je te remercie pour nos fous rires et les bons moments passés ensemble, mais aussi pour ton aide précieuse au labo. Je te remercie également pour m'avoir soutenu mordicus pour obtenir les faveurs d'une certaine personne qui se reconnaîtra... Je te souhaite beaucoup de courage pour la suite, même si je ne m'inquiète pas trop, vu quel type de *predator* tu es !

Maximilian, quand tu es venu, je pensais que je ne serais plus le plus *German* de ce labo. Je ne suis toujours pas sûr que ça se soit réalisé... J'ai été ravi de pouvoir faire ta connaissance et discuter des meilleurs coins pour se poser et juger les gens. Je te remercie d'avoir un peu chamboulé nos habitudes concernant la PCR grâce à tes recherches poussées. J'espère que nous continuerons à se faire des sorties (et puis c'est pratique de garder un contact avec un médecin pour faire des ordonnances !).

Aurélien, alias Dougmcdougan. Tu nous as été présenté comme vieille France, finalement on a eu un *prince charming* métalleux, et je pense que nous avons été largement gagnants dans le change ! Merci pour ta gentillesse, ta présence et ton aide dans ce travail. J'espère que nous continuerons à faire des sorties, comme cette fameuse à la thèse de Lucas où nous avons eu un accompagnateur surprise en rentrant... Par contre il faudra qu'on trouve une solution pour briser la malchance qui nous poursuit et ainsi éviter un deuxième voyage de 14 heures, surtout que tu es un très bon compagnon de route ! Enfin, merci de m'avoir fait découvrir Valheim, où il nous reste encore du mob à dégligner et des cités magnifiques à (dé)construire.

Lucas, mon frère. Tu as été la constance dans ce labo, comme une colonne sur laquelle on peut s'appuyer. Tu as toujours été là pour me remonter le moral et pour me calmer quand rien n'allait. Tu m'as passé le flambeau du BRET et j'espère en être ton digne successeur. J'ai trop d'anecdotes à raconter, mais c'est grâce à toi que j'ai pu sortir de ma zone de confort. Tu m'as pris sous ton aile dès le premier jour, je te l'ai d'ailleurs bien rendu à coups de fouet... Plus qu'un ami, tu es devenu le S et je suis, chère *vietnamese masseuse*, très heureux d'être ta *german bitch*. J'ai hâte de voir quelles seront les prochaines aventures que nous vivrons, qu'elles soient dans la vraie vie ou en roulant sur des civilisations.

Lady Dafni, *αγάπη μου*, quand il s'agit de toi, j'en perds les mots... Comme on dit, les contraires s'attirent, mais sommes-nous réellement si contraires ? La même folie nous habite et en tant qu'équipe nous sommes imbattables, qu'il s'agisse de *cytokine arrays*, mails acides et programmation de vacances... Tu m'as aidé à chaque instant pour réaliser ce travail, merci pour tout. J'ai adoré nos sorties et voyages à la recherche de châteaux, tous les uns les plus beaux que les autres. Il nous en reste beaucoup à visiter, *be ready* ! Pour finir, je dirais : μου είπατε ότι θα υπήρχαν πολλά κεράσια, έπρεπε να φέρω ένα ακόμα μεγαλύτερο καλάθι για να κρατήσω την αγάπη μου ! J'espère qu'il n'y a pas trop de fautes, sinon il faut en vouloir au traducteur (*What is thaaateee ??*).

Je remercie mes consœurs et confrères de la fac (et leurs +1) pour tous les bons moments passés ensemble pendant nos études (en cours ou à la machine à café !) et au-delà.

Catherine, Sophie, j'apprécie beaucoup nos sorties au resto, qui nous permettent de vider nos sacs ! Laura quant à toi, j'ai adoré nos sorties rando dans le Haut-Rhin (ça fera plaisir à certains qui liront que j'apprécie leur département) et j'ai hâte de pouvoir te rendre visite sous le soleil des Caraïbes ! Aude, Céline, Juliette, Florent... Dans quoi nous sommes-nous fourrés ? J'espère comme moi, que vous ne regrettez pas votre choix de se lancer dans un PhD et si oui, n'oubliez pas que nous pourrons nous appeler Dr².

Je remercie mes amis du lycée, Audrey, Rachel, Lucas, Lucas, Erwan... ça fait maintenant entre 11 et 12 ans que nous nous connaissons ! OK ça ne nous rajeunit pas, mais je suis heureux de vous avoir et puis ces chiffres parlent d'eux-mêmes sur l'importance que vous avez pour moi. Vous êtes toujours là pour moi et nous passons beaucoup de bons moments ensemble. Je remercie également vos +1, Jessica et Sam que j'ai appris à connaître et je vous souhaite à tous beaucoup de bonheur.

Je remercie la famille Dusch, vous avez été présent et m'avez soutenu tout au long de ces années ! Je pense que la meilleure façon pour vous le rendre se déroulera autour d'une assiette.

Je remercie mes grands-parents et leur dédie cette thèse. Vous m'avez encouragé dans tout ce que j'ai entrepris dès ma plus tendre enfance. Je suis si reconnaissant de vous avoir connus et d'avoir pu passer autant de temps auprès de vous. De là où vous êtes à présent, je sais que vous suivez toujours avec fierté ce que je fais. Je pense à vous chaque jour avec joie et gratitude. *Merci vielmals fer alles !*

Pour finir, je remercie mes parents. Trois ans après la précédente, je remets ça ! Mais plus qu'une seconde thèse, celle-ci marque la fin de mes études. Je sais que vous êtes fiers de moi et du travail que j'ai accompli, mais si j'ai pu le faire c'est grâce à vous. Vous m'avez soutenu et avez été là pour moi pendant ces neuf années. Merci de m'avoir permis de faire tout ça ! Savoir que vous êtes là me rassure pour les nouvelles aventures que je m'appête à vivre.

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMIGO ₃	<i>Adhesion Molecule With Ig Like Domain 3</i> OU <i>Amphoterin-induced protein 3</i>
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Analyse de la variance)
ARN	Acide Ribonucléique
ATRAM	<i>Acidity-triggered rational membrane</i>
BBB	<i>Blood-Brain Barrier</i> (Barrière hémato-encéphalique)
BES	Acide N,N-Bis(2-hydroxyéthyl)-2-aminoéthanesulfonique
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BRET	<i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i> (Transfert d'énergie par résonance de bioluminescence)
BSA	<i>Buried Surface Area</i>
BTH	<i>Bacterial Two-Hybrid</i>
CAT	Chloramphénicol acétyltransférase
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) Ligand</i> (Chimiokine ligand à motif C-C)
CCR	<i>Chemokine (C-C motif) Receptor</i> (Chimiokine Récepteur à motif C-C)
CD	Cluster de Différenciation
cDNA	ADN complémentaire
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i> (Adjuvant Complet de Freund)
CMC	Concentration Micellaire Critique
CNP	<i>2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase</i>
CNS	<i>Central Nervous System</i> (Système nerveux central)
Co-IP	Co-immunoprécipitation
CPP	<i>Cell Penetrating Peptide</i> (Peptide de pénétration cellulaire)
cryo-EM	<i>Cryogenic electron microscopy</i> (Cryomicroscopie électronique)
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand</i> (Chimiokine ligand à motif C-X-C)
DCC	<i>Deleted in Colorectal Cancer</i>
DDR	<i>Discoidin Domain Receptor</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (Milieu d'Eagle modifié de Dulbecco)
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EAE	<i>Experimental Autoimmune Encephalitis</i> (Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale)
EDTA	Acide édétique
EGFR	<i>Epithelial Growth Factor Receptor</i> (Récepteur aux facteurs de croissance épidermiques)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Technique d'immunoabsorption par enzyme liée)
Eph	Ephrine
eYFP	<i>Enhanced Yellow Fluorescent Protein</i> (Protéine fluorescente jaune améliorée)
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Sérum de veau fœtal)
Fc	Fragment cristallisable

FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux)
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i> (Récepteur aux facteurs de croissance des fibroblastes)
FL	<i>Full-length</i> (ici, protéine entière)
FLT3	<i>Fms Like Tyrosine kinase 3</i>
FRET	<i>Förster Resonance Energy Transfer</i> (Transfert d'énergie par résonance de type Förster)
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GBSS	<i>Gey's Balanced Salt Solution</i> (Tampon salin équilibré de Gey)
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i> (Facteur de stimulation des colonies de granulocytes)
GDP	Guanosine diphosphate
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (Protéine fluorescente verte)
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> (Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages)
GpA	Glycophorine A
GTP	Guanosine triphosphate
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt solution</i> (Tampon salin équilibré de Hank)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Peroxydase de raifort)
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IL-10R	Récepteur de l'interleukine 10
IMS	Institut du Médicament de Strasbourg
IP	Intrapéritonéal
IR	<i>Insulin Receptor</i> (Récepteur de l'insuline)
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> (Organisation internationale de normalisation)
JAK	<i>Janus kinase / Just Another Kinase</i>
LDS	Lithium Dodécyl Sulfate
LED	Lupus Erythémateux Disséminé
LINGO1	<i>Leucine rich repeat and Ig domain containing 1</i>
LMTK	<i>Lemur Tail (Tyrosine) Kinase</i>
LPC	Lysophosphatidylcholine
LRR	<i>Leucin-Rich Repeat</i> (Répétition riche en leucine)
LT	Lymphocyte T (Thymus)
LTK	<i>Leukocyte receptor Tyrosine Kinase</i> (Récepteur à activité tyrosine kinase des leucocytes)
MAG	<i>Myelin Associated Glycoprotein</i> (Glycoprotéine associée à la myéline)
MAIs	<i>Myelin Associated Inhibitors</i> (Inhibiteurs associés à la myéline)
MBP	<i>Myelin Basic Protein</i> (Protéine basique de la myéline)
mBu	<i>MilliBRETunit</i>
MCP	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i> (Protéine chemoattractante des monocytes)
M-CSF	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> (Facteur de stimulation des colonies de macrophages)
MHP	<i>Molecular Hydrophobicity Potential</i>
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i> (Protéine inflammatoire de macrophage)
MOG	<i>Myelin Oligodendrocyte glycoprotein</i> (Glycoprotéine de la myéline oligodendrocytaire)
mRNA	ARN messager
MS	<i>Multiple Sclerosis</i> (Sclérose en plaques)
MTP	<i>Membrane Targeting Peptide</i> (Peptide ciblant le domaine transmembranaire)
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
NCT	<i>National Clinical Trial number</i> (Numéro d'essai clinique national)
NgR / RTN4R	<i>Nogo-receptor / Reticulon 4 Receptor</i> (Récepteur Nogo / Récepteur au réticulon 4)
NRP1	Neuropiline 1
OD	<i>Optical Density</i> (Densité optique / Absorbance)
OMgp	<i>Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein</i> (Glycoprotéine de la myéline oligodendrocytaire)
OPC	<i>Oligodendrocyte precursor cells</i> (Précurseurs d'oligodendrocytes)
p75NTR / NGFR	<i>Nerve Growth Factor Receptor</i> (Récepteur au facteur de croissance nerveux)
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Tampon phosphate salin)
PDBePISA	<i>Protein DataBank in Europe, Proteins, Interfaces, Structures and Assemblies</i>
PDGFR	<i>Platelet Derived Growth Factor Receptor</i> (Récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes)
pH	Potentiel Hydrogène
pHLIP	<i>pH-Low Insertion Peptide</i>
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
PLP	<i>Myelin Proteolipid Protein</i> (Protéolipide protéine de la myéline)
PR	Polyarthrite Rhumatoïde
PTX	Toxine pertussique
RCPG	Récepteur Couplé à une Protéine G
RECIST	<i>Response Evaluation Criteria in Solid Tumours</i> (Critère d'évaluation de la réponse dans des tumeurs solides)
RhoA	<i>Ras Homolog family member A</i> (Membre de la famille des homologues Ras)
Rluc	<i>Renilla Luciferase</i>
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Acide ribonucléique)
RRMS	Relapsing-Remitting multiple sclerosis (sclérose en plaques récurrente-rémittente)
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
RTqPCR	<i>Reverse Transcription / Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (Réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Electrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium)
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> (Erreur standard)
Sema	Sémaphorine
SEP	Sclérose En Plaques
SNC	Système Nerveux Central
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TAM	<i>Tumour Associated Macrophage</i> (Macrophage associé à la tumeur)
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i> (Tampon Tris-salin)
TE	Tris-EDTA
TIE	<i>Tyrosine kinase with immunoglobulin like and EGF like domains</i>

TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TM	Transmembranaire
TNF	<i>Tumour Necrosis Factor</i> (Facteur de nécrose tumorale)
ToxR	<i>Cholera toxin transcriptional activator</i> (Activateur transcriptionnel de la toxine cholérique)
TrkB	<i>Tropomyosin-Related Kinase B</i>
TROY / TNFRSF19	<i>Tumour necrosis factor receptor superfamily, member 19</i> (Membre 19 de la superfamille des récepteurs des facteurs de nécrose tumorale)
TYK2	<i>Non-receptor Tyrosine-protein Kinase 2</i>
TYRO3	<i>Tyrosine-protein kinase receptor 3</i>
UMR	Unité Mixte de Recherche
VEGFR / VGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i> (Récepteur au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
YTH	<i>Yeast Two-Hybrid</i>

Liste des figures

Figure 1	Fonctionnement général des techniques de double hybride.
Figure 2	Les interactions protéine-protéine.
Figure 3	Protocole de co-immunoprécipitation.
Figure 4	Principe du FRET.
Figure 5	Principe de la technique de PLA.
Figure 6	Principes des méthodes de marquage de proximité (BioID et APEX).
Figure 7	Organisation de la membrane plasmique.
Figure 8	Les récepteurs couplés aux canaux ioniques.
Figure 9	Les récepteurs couplés à une protéine G.
Figure 10	Les récepteurs couplés à une enzyme.
Figure 11	Le domaine transmembranaire des protéines membranaires.
Figure 12	Le modèle à trois étapes d'insertion des domaines TM dans la membrane cellulaire.
Figure 13	Principe de la méthode ToxCAT.
Figure 14	Stratégie générale des <i>Membrane Targeting Peptides</i> .
Figure 15	Les principales méthodes pour délivrer les MTPs dans un organisme.
Figure 16	La plateforme du récepteur NgR.
Figure 17	La plateforme du récepteur IL-10R.
Figure 18	Protocole du test de BRET automatisé.
Figure 19	Reproductibilité des ratios de BRET.
Figure 20	Asymétrie entre les deux valeurs de chaque paire.
Figure 21	Liste des 64 cibles du criblage BRET.
Figure 22	Distribution des ratios de BRET, en prenant le maximum pour chaque paire.
Figure 23	Courbes de saturation de BRET.
Figure 24	Les dix paires avec les valeurs de ratio de BRET les plus fortes.
Figure 25	Les cartes d'interaction des quatre séquences aux BRET ratios les plus élevés.
Figure 26	Test de BRET et problèmes d'orientation.
Figure 27	Les mécanismes d'action proposés pour les peptides testés.
Figure 28	Vers le décryptage des interactions entre segments TM.

Introduction

I. Les interactions protéine-protéine au sein de la membrane plasmique

1) Les interactions protéine-protéine : historique

Les protéines, nommées ainsi par J.J. Berzelius en référence au mot grec « Proteios » qui signifie « premier, primaire », ont été décrites dès les années 1830 par G.J. Mulder (1). Plusieurs protéines ont ensuite été étudiées, dont la trypsine en 1876 par W. Kühne. En 1906, un inhibiteur de la trypsine a été découvert dans le plasma sanguin et son activité décrite. Le premier couple protéine-protéine (ici enzyme-inhibiteur) a ainsi été présenté, comme se combinant en un composé inactif mais indissociable (1). Une autre interaction protéine-protéine faisant partie des premières à être analysées est l'interaction entre un anticorps et un antigène par P. Ehrlich en 1891 (1). Malgré la description de ces phénomènes dès le XIX^{ème} siècle, il faudra attendre les années 1920, avant que les enzymes et les anticorps ne soient considérés comme des protéines. De par leur poids moléculaire important, considérer les protéines comme des molécules uniques a été difficile à démontrer et à accepter, expliquant qu'elles étaient pendant longtemps jugées comme étant un assemblage de petites molécules et électrolytes (1). A la fin des années 1940, F. Sanger a pu déterminer la séquence de la chaîne B de l'insuline, permettant ainsi de comprendre la structure primaire de cette protéine (1). Ensuite, au cours des années 1950-1960, l'avènement des techniques cristallographiques et l'arrivée des technologies informatiques ont permis de déterminer les structures secondaires, tertiaires et quaternaires des protéines. Finalement, la caractérisation de ces structures a permis la compréhension des interactions allostériques et l'identification des interfaces d'interaction spécifiques. De ce fait, de nombreux mécanismes ont pu être reliés à des interactions protéine-protéine. La contraction musculaire, par l'interaction entre l'actine et la myosine, la régulation des enzymes du métabolisme ou encore l'activité de la glycogène phosphorylase dans la conversion du glycogène en glucose en sont des exemples. Dans l'article décrivant cette

phosphorylase, le premier exemple détaillé d'interaction protéine-protéine régulée par la phosphorylation est retrouvé (1). L'étape suivante a été la preuve de l'existence des récepteurs dans les années 1960 grâce au développement des méthodes de radio-marquage. Les récepteurs sont en effet des protéines qui interagissent avec d'autres protéines : leurs ligands, mais aussi d'autres co-récepteurs ou sous-unités (1). Au fil des décennies, l'intérêt pour les interactions entre protéines n'a cessé de croître, comme en témoigne le développement de nouvelles techniques pour les étudier. Ainsi, une augmentation du nombre d'articles scientifiques traitant de ce sujet, passé de moins de 50 en 1980, à plus de 2000 après les années 2000 a pu être observée (1). Parmi les techniques d'étude, une en particulier a permis de mettre au point la majorité des méthodes de criblage à haut-débit : la fusion de gènes, pour l'étude des protéines dans les années 1980 (1,2). Ainsi, des étiquettes (« tag ») ont pu être fusionnées aux protéines permettant de les détecter et de les purifier. C'est par exemple le cas de l'étiquette HA (*Human influenza hemagglutinin*) qui est reconnue par des anticorps spécifiques (1). Une autre méthode permettant de mesurer l'interaction entre deux protéines est la technique du double hybride originellement développée dans la levure (*Yeast Two Hybrid YTH*) (Figure 1). Dans ce système, chaque partenaire de l'interaction est couplé à un fragment d'un facteur de transcription codant une séquence activatrice d'un gène rapporteur : l'un à la séquence permettant la fixation du facteur de transcription à l'ADN, l'autre permettant l'induction de la transcription. Lorsque les deux partenaires sont proches, le gène rapporteur est transcrit (1,3). Cette méthode a par la suite été étendue pour l'étude dans les bactéries (*Bacterial Two Hybrid BTH*) et les mammifères (*Mammalian Two Hybrid MTH*) (4,5). Ces méthodes, ainsi que les travaux de séquençage du génome humain ont permis la création de réseaux d'interactions : les interactomes, permettant de comprendre le fonctionnement et l'organisation de systèmes biologiques complexes. Dans ces réseaux, certaines protéines n'ont que quelques partenaires interagissant avec eux, tandis que d'autres sont de véritables plaques tournantes impliquées dans de nombreuses interactions mais également à l'origine de nombreuses situations pathologiques (1).

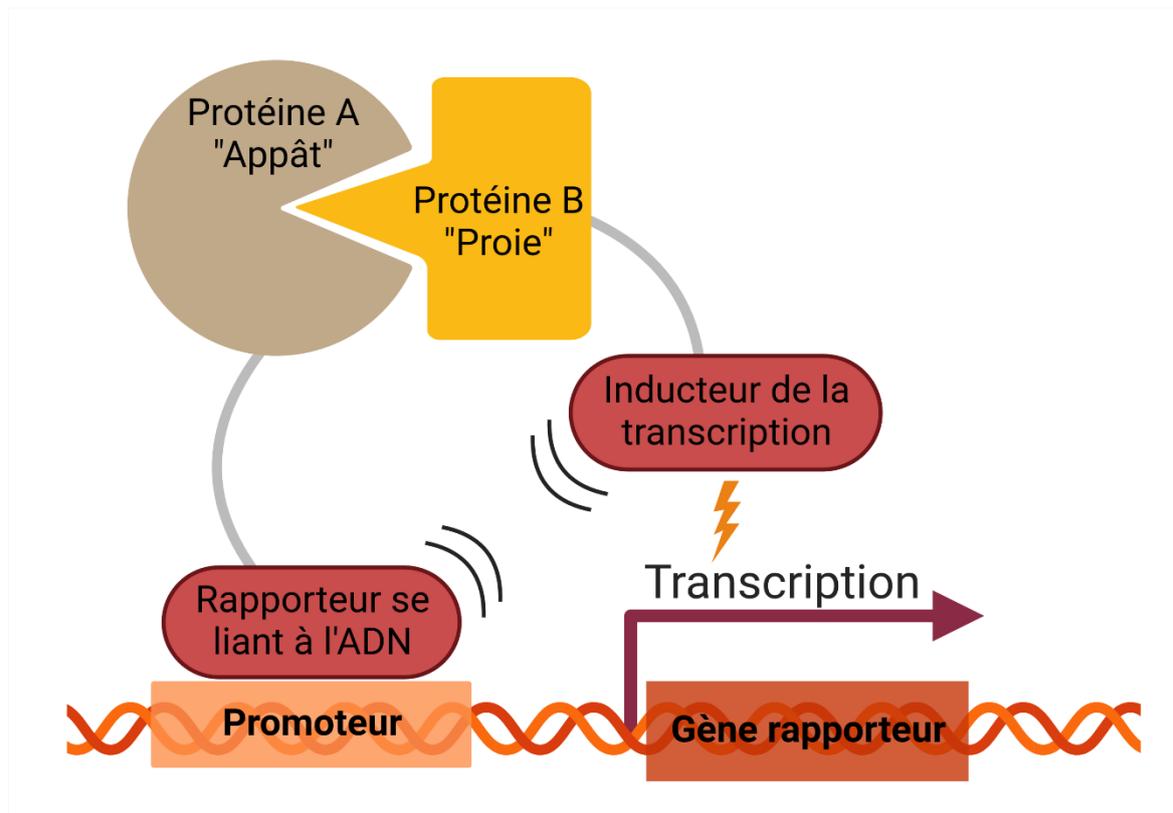


Figure 1 : Fonctionnement général des techniques de double hybride.

Une protéine « appât » est couplée à un rapporteur se liant à l'ADN et une protéine « proie » interagissant avec la première est couplée à un inducteur de la transcription. Lorsque les deux protéines interagissent, les deux fragments du facteur de transcription sont assez proches pour induire la transcription d'un gène rapporteur. L'expression de celui-ci peut ensuite être mesurée et est indicatrice de l'interaction entre les deux protéines.

(Figure réalisée sur Biorender.com, adaptée de Sawma *et al.*, (6).)

Au vu de leur importance, les interactions protéine-protéine constituent donc des cibles particulièrement intéressantes dans la recherche de nouveaux composés thérapeutiques. Cependant, la découverte de composés ciblant ces interactions représente un défi. En effet, les interactions protéine-protéine sont des cibles atypiques : les surfaces d'interaction sont larges (1300 à 3000Å) et planes (7,8). Celles-ci présentent des points chauds (« *hot spots* ») contribuant fortement à l'interaction. Ces points chauds, identifiés notamment par analyse cristallographique ou mutagenèse dirigée, constituent la cible principale des inhibiteurs d'interactions protéine-protéine (**Figure 2**) (1,7,8). Ces composés y jouent le rôle d'un grain de sable, empêchant l'interaction de se réaliser. Malgré les difficultés rencontrées pour concevoir ce type de composés, cibler les

interactions protéine-protéine avec des petites molécules notamment, est une approche démontrée comme faisable et plusieurs exemples ayant atteints le marché ou des phases cliniques avancées existent. Parmi les composés commercialisés, nous pouvons citer les inhibiteurs de la famille des BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*) comme le vénétoclax dans le traitement des leucémies myéloïdes et les inhibiteurs d'entrée du VIH dans les lymphocytes T, comme le maraviroc ou l'enfuvirtide (9,10). L'idasanutlin, inhibant l'interaction entre la protéine MDM2 (*Murine double minute 2*) et la protéine suppressive de tumeurs p53 a été testé en étude clinique de phase III dans la leucémie myéloïde aiguë (11). Une explosion du nombre de composés ciblant les interactions protéine-protéine en cours d'étude a été observée ces dernières années, comme en témoigne la banque de données iPPI-DB de l'institut Pasteur, qui répertorie 2443 petites molécules ciblant 142 interactions protéine-protéine.

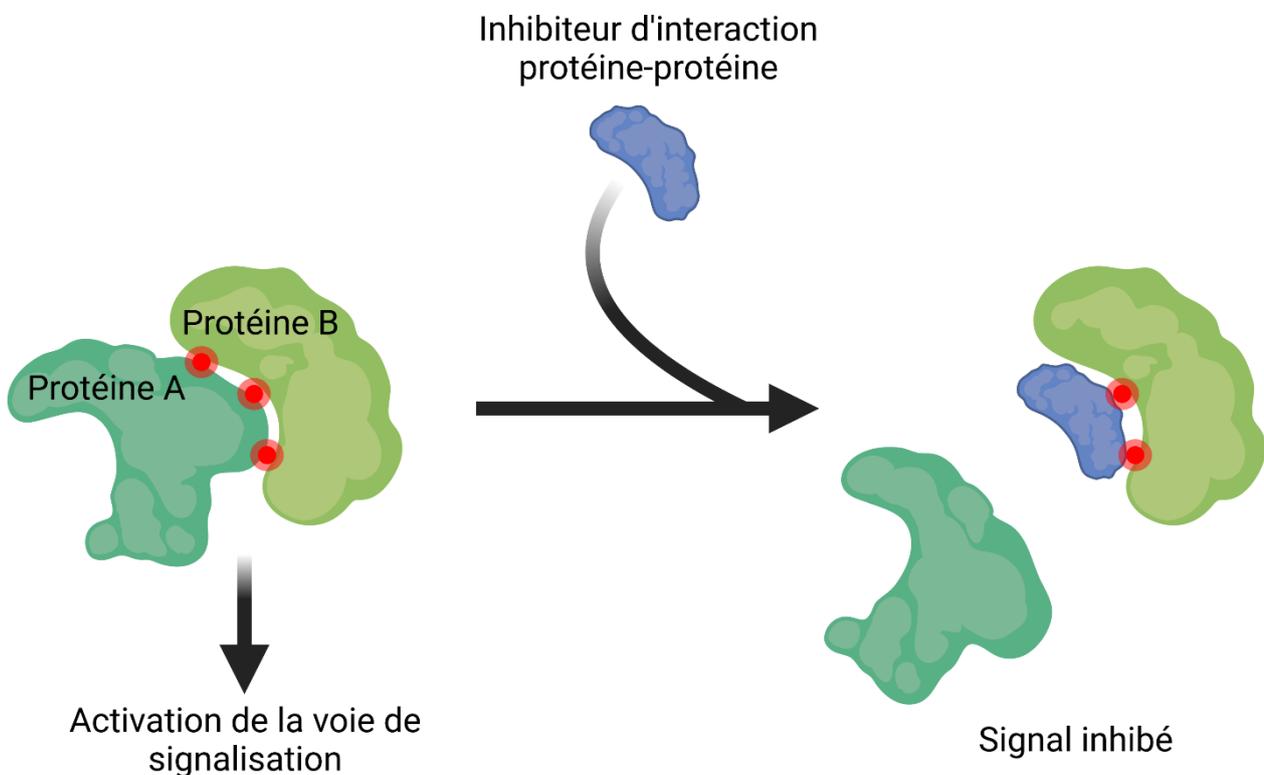


Figure 2 : Les interactions protéine-protéine.

L'interaction entre deux protéines permet la conduction de signaux cellulaires. Elles interagissent par le biais de points chauds (« *hot spot* », identifiés par les points rouges). Les inhibiteurs d'interaction protéine-protéine empêchent la reconnaissance entre les deux protéines en ciblant les points chauds. Leur fixation empêche l'activation de la voie de signalisation.

(Figure réalisée sur Biorender.com.)

2) Les méthodes pour étudier les interactions protéine-protéine

L'intérêt grandissant autour des interactions protéine-protéine s'accompagne d'un foisonnement de nouvelles méthodes pour les étudier, les analyser et les comprendre. Un premier objectif est de déterminer la structure tridimensionnelle des protéines et ainsi comprendre leur organisation. La technique la plus utilisée est la cristallographie aux rayons X. Cependant, pour les protéines membranaires, du fait de leur faible expression, insolubilité et instabilité, obtenir des cristaux s'avère très complexe. De nouvelles méthodes pour dépasser ces difficultés se mettent peu à peu en place, comme la très coûteuse cryomicroscopie électronique, mais le nombre de structures en trois dimensions de protéines membranaires reste limité (12,13). Des méthodes pour étudier directement les interactions protéine-protéine ont été développées et les plus anciennes sont celles faisant intervenir un système de double-hybride, que nous avons décrites dans la partie précédente. Cette méthode a initialement été développée dans les levures et a permis d'identifier de nombreuses interactions étant donné la facilité à transposer cet essai à grande échelle. Cependant, le système est assez éloigné de la réalité biologique puisqu'il est effectué dans des levures (14). Ainsi, des innovations ont permis d'effectuer ce test dans des bactéries et finalement dans des cellules de mammifères pour se rapprocher au plus du *vivo* et ainsi d'augmenter la spécificité. Les purifications par affinité constituent d'autres méthodes anciennes permettant d'identifier les partenaires d'une protéine. La plus utilisée est la co-immunoprécipitation (**Figure 3**) (14). Dans cette méthode, un anticorps reconnaissant la protéine d'intérêt couplée à ses partenaires ou reconnaissant une étiquette liée à cette protéine d'intérêt est utilisé. Des protéines bactériennes (en particulier les protéines A et G) couplées à des billes (de sépharose, d'agarose ou métalliques notamment), se fixent au fragment cristallisable (Fc) des anticorps, entraînant ainsi leur précipitation. Le complexe isolé peut ensuite être analysé par western-blot, ELISA ou spectrométrie de masse pour identifier les protéines et leurs partenaires d'interactions (14). La co-immunoprécipitation est cependant une méthode longue, fastidieuse et coûteuse car nécessitant des anticorps performants.

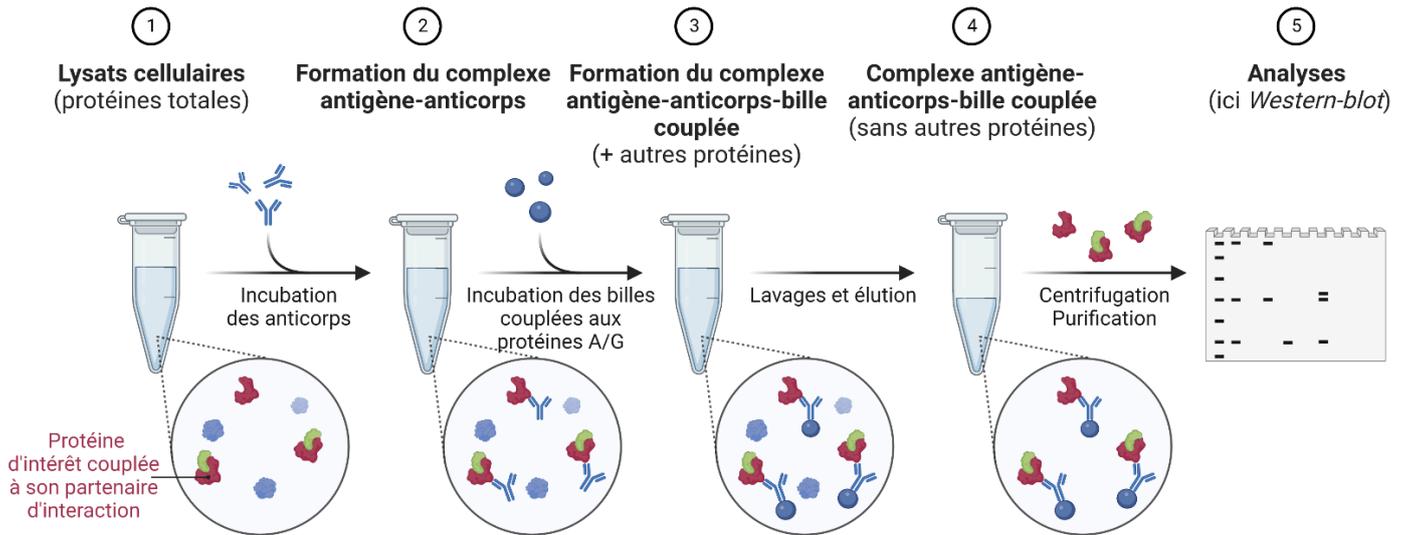


Figure 3 : Protocole de co-immunoprécipitation.

Des anticorps primaires dirigés contre la protéine d'intérêt couplée à ses partenaires d'interaction sont incubés dans un lysat de protéines totales. Des protéines bactériennes (A ou G) couplées à des billes sont ajoutées. Celles-ci se fixent au fragment cristallisable des anticorps. Le complexe formé est ensuite lavé et élué. Les protéines sont purifiées et analysées (par *Western-blot* notamment).

(Figure réalisée sur Biorender.com.)

Certaines méthodes permettent d'étudier les interactions *in situ*. Parmi celles-ci sont retrouvées l'ensemble des méthodes dérivées du FRET, mais également le *Proximity Ligation Assay* (PLA). Le FRET ou *Förster Resonance Energy Transfer* (**Figure 4**) est une méthode décrite par T. Förster dès 1946 et qui s'appuie sur le phénomène de transfert de l'énergie d'un chromophore se trouvant à un état excité (le donneur), vers un autre chromophore à proximité, se trouvant à l'état fondamental (l'accepteur). Lorsque les deux rapporteurs sont à proximité, le donneur excité par une longueur d'onde transfère l'énergie à l'accepteur, qui émet une longueur d'onde différente. Ces rapporteurs sont couplés aux protéines pour lesquelles une interaction éventuelle est étudiée. La distance minimale pour observer un transfert se situe aux alentours de 10nm (100Å), ce qui indique qu'en cas de signal, une interaction entre les protéines couplées est fortement probable (14,15). D'autres méthodes s'appuyant sur le même principe de base ont ensuite été développées, comme le BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*), le FLIM (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) ou le PRIM (*PRoximity IMaging*) (15). Dans le BRET, le donneur est une molécule bioluminescente émettant son énergie en réponse à un traitement avec son substrat (16). Pour le

FLIM, c'est une mesure du déclin de fluorescence qui est mesuré, la demi-vie de la fluorescence d'une molécule étant augmentée en cas de transfert d'énergie (17). Enfin, le PRIM repose sur le fait que lorsque deux molécules de GFP sont en étroite interaction, le spectre d'absorption de la GFP change par rapport à la forme monomérique (18).

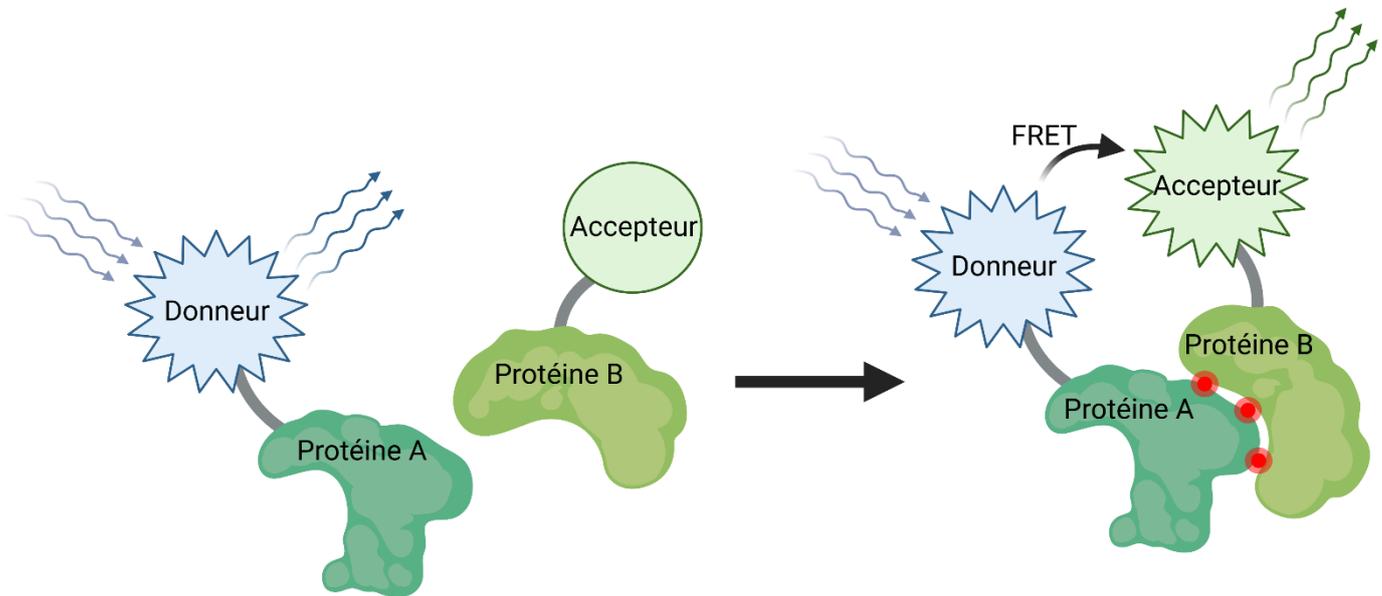


Figure 4 : Principe du FRET.

Chaque partenaire d'un couple de protéines interagissant est couplé à un rapporteur de FRET. La première protéine est couplée à un donneur et la seconde à un accepteur. Lorsque les deux protéines sont proches, les deux rapporteurs sont assez proches pour permettre un transfert d'énergie de résonance après excitation du donneur par une longueur d'onde appropriée. La longueur d'onde d'émission du donneur correspond à celle d'excitation de l'accepteur, qui peut alors émettre un signal quantifiable.

(Figure réalisée sur Biorender.com, adaptée de Trugnan *et al.* (15).)

Concernant le *proximity ligation assay* (Figure 5), décrit la première fois par Frederiksson *et al.* en 2002, il permet de caractériser la potentielle interaction entre deux protéines par émission d'un point fluorescent. Des anticorps primaires, dirigés contre les protéines d'intérêt sont reconnus par des anticorps secondaires, couplés à des oligonucléotides. Lorsque les protéines sont suffisamment proches, les oligonucléotides peuvent s'hybrider et former un brin d'ADN circulaire. Après ligation, cet ADN est ensuite amplifié, induisant ainsi la formation d'un simple brin d'ADN

répété. Ensuite, des nucléotides marqués avec un fluorophore sont ajoutés et après hybridation de ceux-ci sur l'ADN, un signal peut être observé au microscope (19).

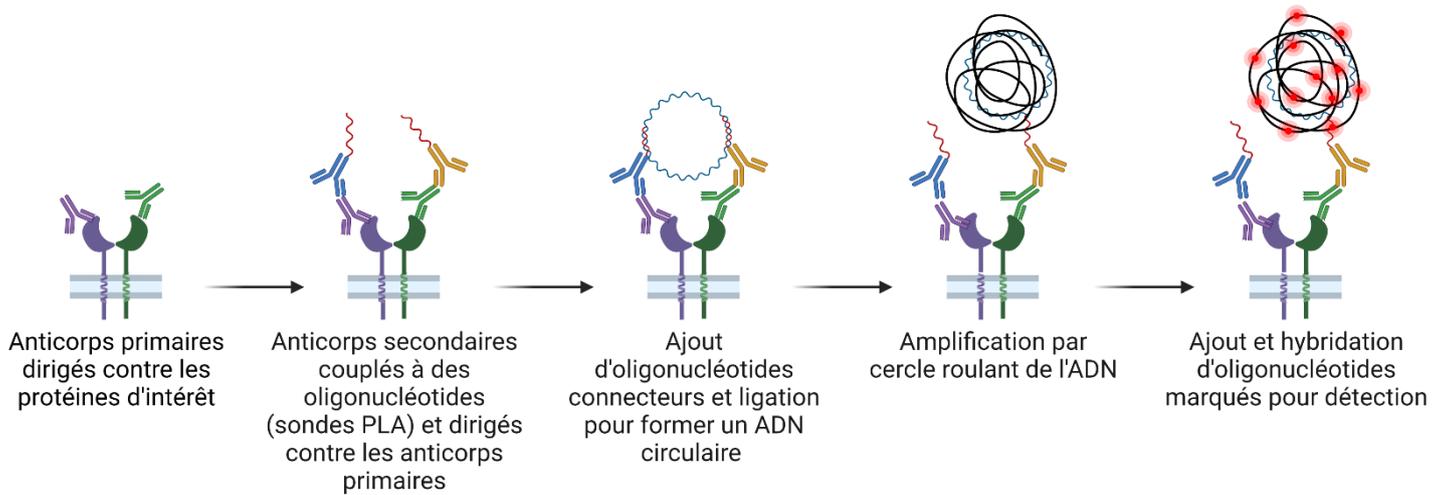


Figure 5 : Principe de la technique de PLA.

Des anticorps primaires dirigés contre les protéines d'intérêt, sont reconnus par des anticorps secondaires couplés à des oligonucléotides. Lorsque les protéines sont proches, les oligonucléotides peuvent s'hybrider grâce à l'ajout d'autres oligonucléotides connecteurs et former un ADN circulaire. Après ligation, l'ADN sera amplifié par synthèse d'ADN en cercle roulant. Finalement, des oligonucléotides marqués avec des fluorophores et reconnaissant l'ADN sont ajoutés. Ces derniers peuvent ensuite être détectés et l'intensité du signal marque la proximité entre les deux protéines d'intérêt.

(Figure réalisée sur Biorender.com.)

Pour finir, des méthodes récentes permettent à la fois d'observer des interactions fortes entre protéines, comme c'est le cas pour les approches classiques, mais également des interactions plus fugaces, en tenant compte de leurs spécificités spatio-temporelles. Ces méthodes reposent sur un marquage de proximité, grâce à l'utilisation d'une enzyme couplée à la protéine d'intérêt. Cette enzyme génère des composés réactifs se diffusant autour de la protéine étudiée. L'ensemble des protéines qui vont ensuite interagir avec celle-ci, sera marqué et pourra être purifié et identifié par *western-blot* ou spectrométrie de masse (14). Deux de ces méthodes parmi les plus utilisées, sont le BioID (*proximity-dependent biotinylation identification*) reposant sur l'utilisation d'une biotine ligase et la méthode APEX (*Ascorbate peroxidase*), qui est basée sur l'utilisation d'une ascorbate

peroxydase (Figure 6) (20,21). Ces dernières méthodes peuvent être transposées dans des modèles animaux, permettant ainsi d'ouvrir de nouvelles possibilités pour l'étude des interactions protéine-protéine.

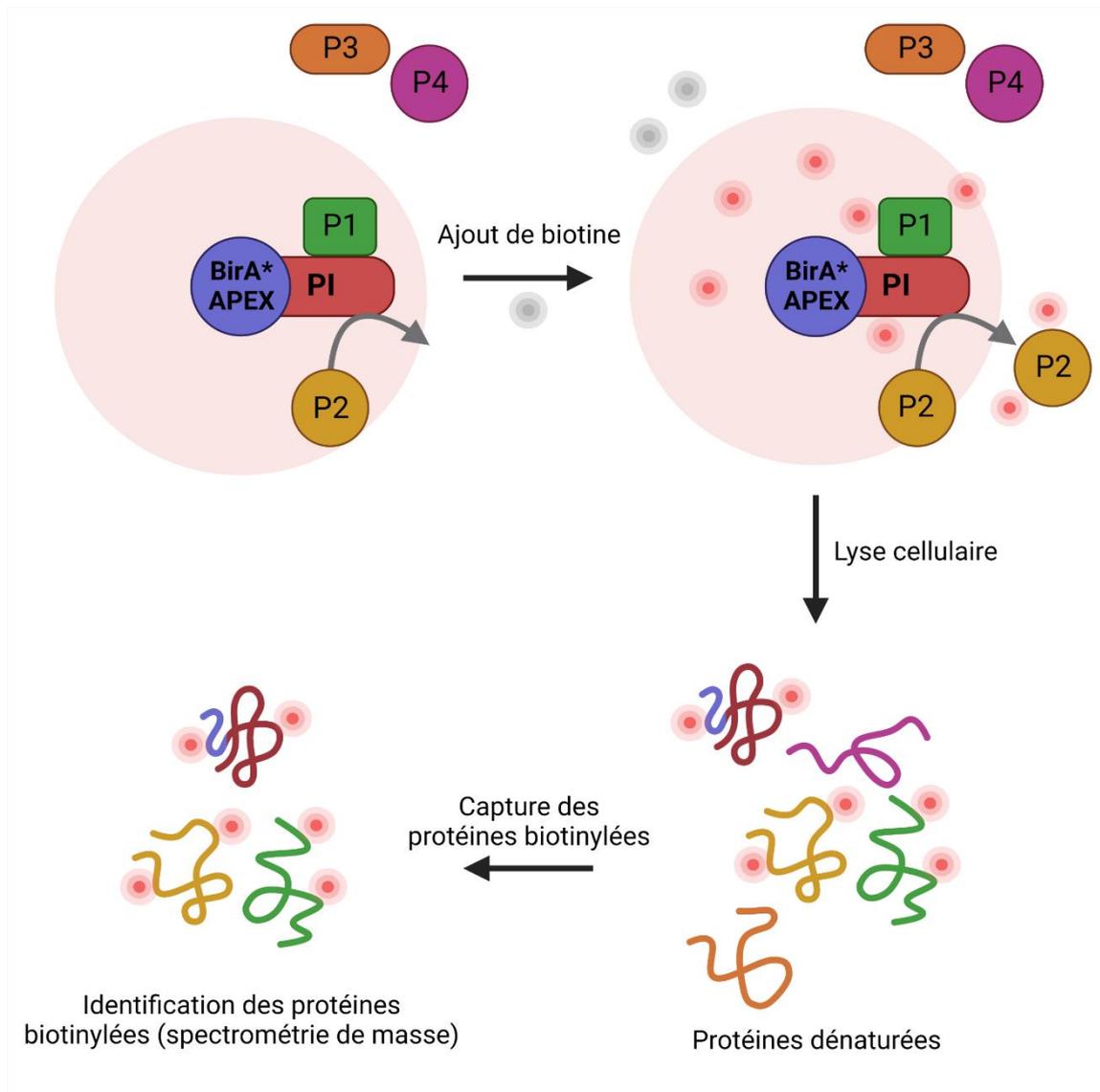


Figure 6 : Principes des méthodes de marquage de proximité (BioID et APEX).

Les méthodes de BioID et APEX reposent sur le couplage d'une protéine d'intérêt (notée ici PI) à une enzyme générant des composés réactifs diffusant autour de la protéine d'intérêt. Pour le BioID il s'agit d'une biotine ligase (BirA*) et pour l'APEX une ascorbate peroxydase. Dans les deux cas, les protéines interagissant plus ou moins longuement (ici P1 et P2) avec la protéine d'intérêt sont marquées par les composés réactifs (ici la biotine). Les protéines qui au contraire n'ont pas interagi (ici P3 et P4), ne sont pas marquées. Après lyse cellulaire, les protéines marquées peuvent être isolées et identifiées par spectrométrie de masse ou *western-blot* notamment.

(Figure réalisée sur Biorender.com, adaptée de Béganton *et al.* (14).)

3) La membrane plasmique, une barrière aux fonctions multiples

La membrane cellulaire ou membrane plasmique est une bicouche lipidique semi-perméable, formant une barrière entre l'intérieur de la cellule et son environnement. Son rôle est double : isoler les composants cellulaires du milieu extérieur et réguler l'entrée des nutriments, ainsi que la sortie des substances toxiques (22,23). La membrane plasmique est constituée majoritairement de lipides (phospholipides, stérols et glycolipides) et de protéines (transmembranaires ou périphériques), qui ont la possibilité de glisser plus ou moins librement latéralement le long de la membrane (22,24). L'organisation de la membrane a été décrite comme une mosaïque fluide par J. Singer et G. Nicholson en 1972 (22,25,26). Ainsi, la membrane correspond à un fluide dans lequel des protéines sont insérées dans des bicouches lipidiques. Les phospholipides s'organisent de façon à créer cette bicouche dans laquelle les parties hydrophiles font face au domaine intracellulaire ou extracellulaire et les parties hydrophobes se trouvent à l'intérieur de la membrane (22). Le domaine transmembranaire est donc fortement hydrophobe. Le cholestérol constitue environ 20% des lipides dans la membrane et a un rôle de régulation de la fluidité de celle-ci (24). Les glycolipides, correspondent à des lipides avec une chaîne glucidique se trouvant à la surface extracellulaire de la membrane et sont impliqués dans la communication entre cellules (22). Dans certains domaines de la membrane, un enrichissement en cholestérol et sphingolipides (sphingomyéline et glycolipides) induit la formation de radeaux lipidiques, facilitant la transduction de signaux à travers la membrane par une concentration des protéines membranaires (27). Les protéines périphériques ne sont pas insérées dans la membrane, mais interagissent le plus souvent avec d'autres protéines qui le sont. Ces protéines assurent des rôles d'enzyme, de communication entre cellules ou permettent l'ancrage de la cellule. Certaines de ces protéines périphériques sont directement sécrétées par les cellules, participant ainsi à la formation de la matrice extracellulaire, à l'image du glycocalyx des cellules endothéliales vasculaires, composé de protéoglycanes, glycosaminoglycanes et glycoprotéines (22,24,28). Cependant, la majorité des protéines sont membranaires, avec différents rôles, comme la communication ou le transport. Concernant le rôle de transport, les petites molécules hydrophobes, les gaz et petites molécules polaires peuvent traverser la membrane de façon passive, alors que les grosses molécules et les molécules chargées nécessitent un transport actif grâce à des transporteurs ou des canaux présents à la surface de la membrane (22,24). Enfin, concernant le rôle de communication, il peut être entre cellules pour les glycoprotéines ou au sein

de la cellule pour les récepteurs, induisant l'activation de voies de signalisation après la reconnaissance de leur ligand spécifique (Figure 7) (22,24).

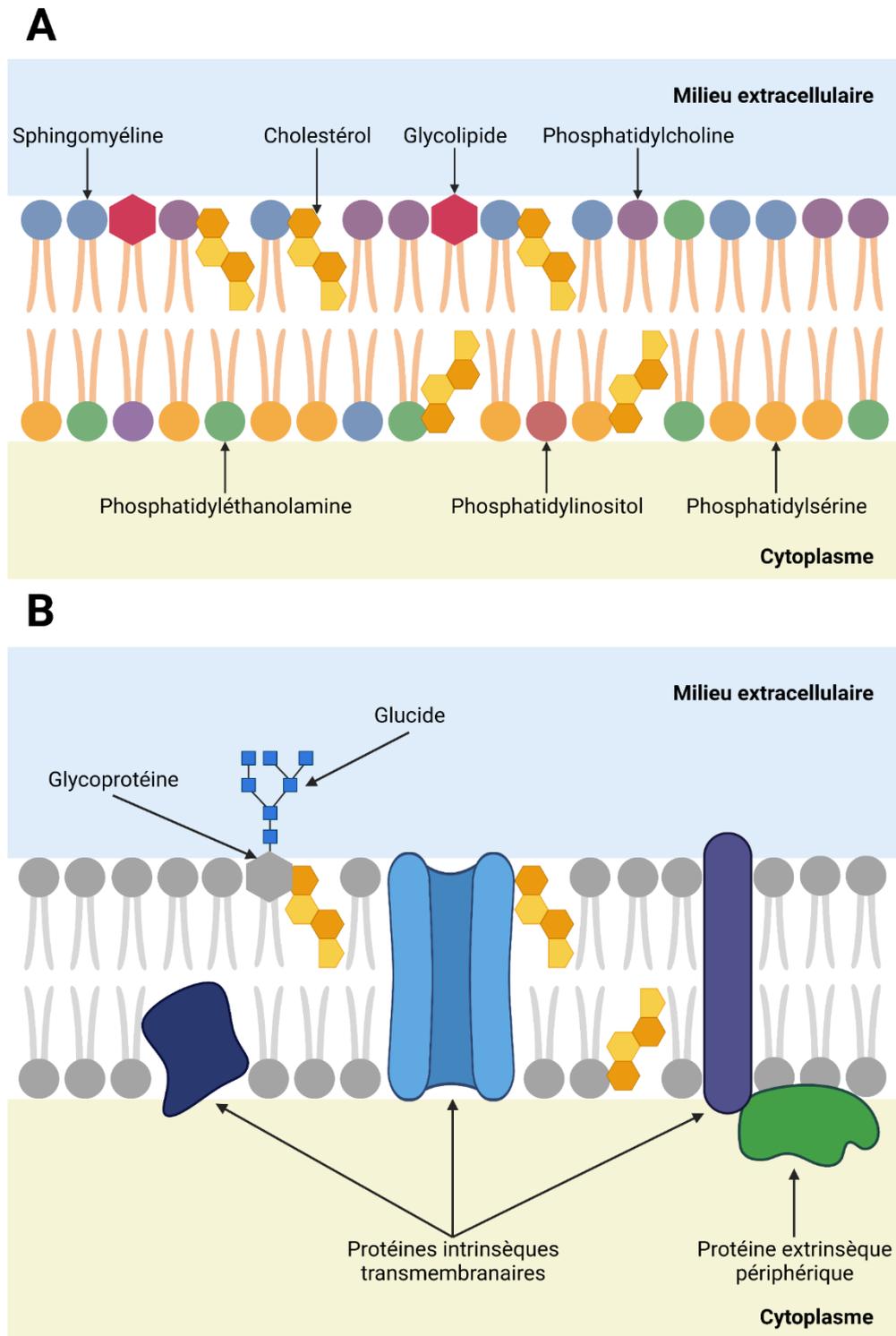


Figure 7 : Organisation de la membrane plasmique.

(A) Composition lipidique asymétrique de la membrane plasmique.

(B) Composition protéique de la membrane plasmique.

(Figure réalisée sur Biorender.com, adaptée de Cooper (22).)

4) Les récepteurs membranaires, des « substances réceptrices » à l'origine des signalisations cellulaires

Les « substances réceptrices », c'est ainsi que J.N. Langley a désigné pour la première fois les récepteurs en 1905, en décrivant les effets de la nicotine et des curarisants sur les muscles (29). Il formule l'hypothèse que ces « substances réceptrices » sont capables d'affecter la fonction d'une cellule (qu'il appelle « substance directrice »). L'existence de récepteurs, notamment pour les drogues produites par l'humain, n'a cependant pas fait l'unanimité jusque dans les années 1960. Ces doutes n'ont été écartés que grâce au développement de principes actifs, spécifiques d'un récepteur en particulier, notamment les bêtabloquants pour le traitement de l'hypertension artérielle et les antihistaminiques H₂ pour le traitement des ulcères par J. W. Black dans les années 1960-1970. En parallèle, les premières observations de récepteurs par microscopie électronique, renforcent l'existence d'une multitude de récepteurs pouvant être ciblés pharmacologiquement (30).

Les récepteurs cellulaires constituent le lien entre un stimulus extérieur et une réponse cellulaire. Le ligand spécifique se fixe sur son récepteur, activant ainsi une voie de signalisation à l'origine d'une réponse de la cellule, qu'elle soit transcriptionnelle, biochimique, métabolique ou structurale. Il existe deux catégories de récepteurs : les récepteurs intracellulaires (qui peuvent être nucléaires, cytoplasmiques ou à la surface des organites) et les récepteurs membranaires à la surface de la cellule. Nous porterons notre attention sur ces derniers, constitués d'un domaine extracellulaire qui reconnaît le ligand, un domaine transmembranaire (TM) hydrophobe et un domaine intracellulaire, couplé aux transmetteurs du signal. Leurs ligands ne peuvent pas entrer dans la cellule car ils sont trop gros ou hydrophiles et se fixent donc à ces récepteurs. S'en suit une modification conformationnelle du récepteur, induisant ainsi l'activation de la voie de signalisation sous-jacente. Il existe trois types majoritaires de récepteurs membranaires : les récepteurs couplés aux canaux ioniques, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et les récepteurs couplés aux enzymes (31). Pour les premiers (**Figure 8**), l'activation par un ligand induit l'ouverture d'un canal ionique, permettant l'entrée ou la sortie d'ions spécifiques (Ca²⁺, K⁺, Na⁺, et Cl⁻). En conséquence, une modification du potentiel membranaire se produit, induisant une hyperpolarisation (signal inhibiteur) ou une dépolarisation (signal excitateur). Ce type de récepteur est retrouvé notamment

à la surface des neurones au niveau des corps cellulaires, des axones et des dendrites, comme c'est le cas des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine par exemple (31–33).

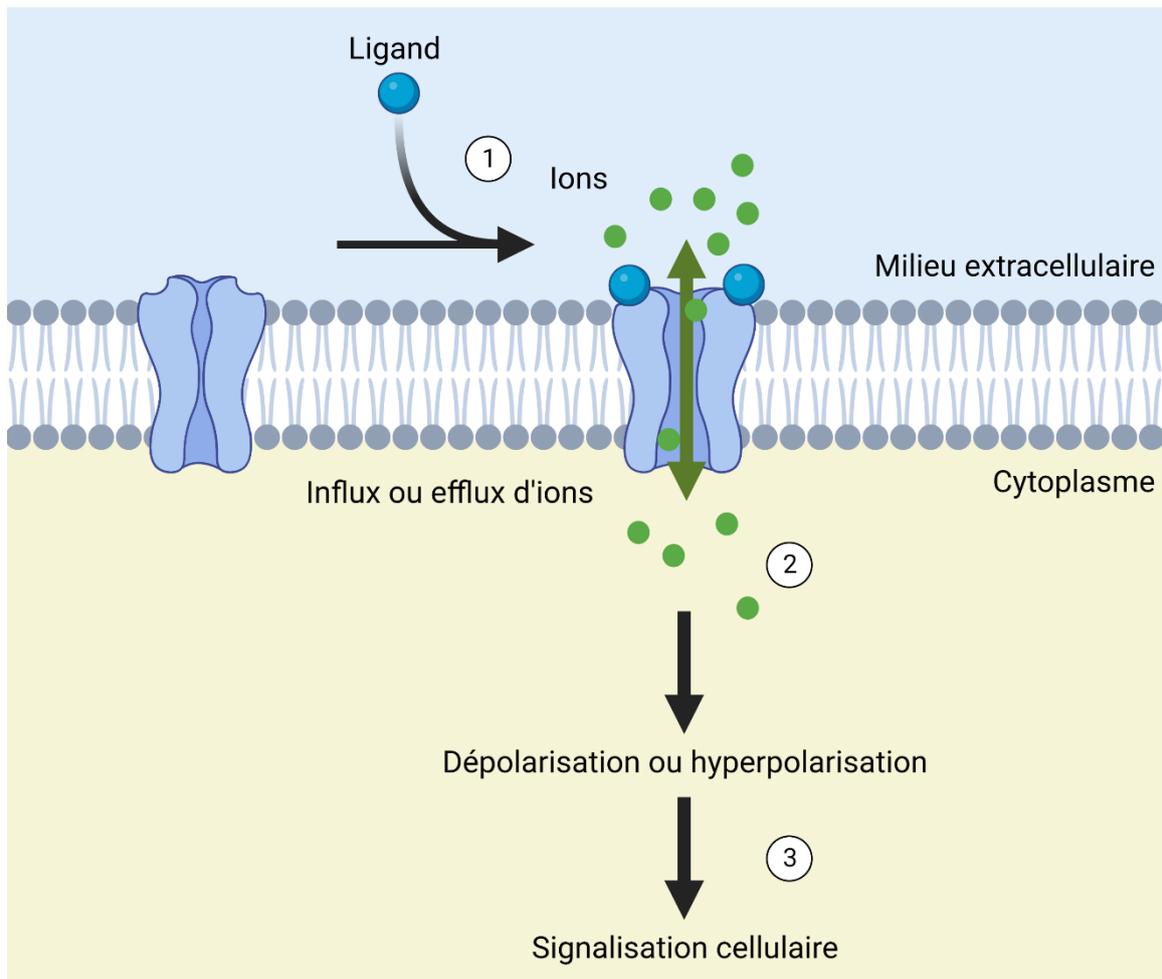


Figure 8 : Les récepteurs couplés aux canaux ioniques.

- (1) La fixation du ligand sur un récepteur couplé à un canal ionique, induit l'ouverture du canal.
- (2) Des ions vont ensuite diffuser à travers le canal en suivant le gradient de concentration.
- (3) L'influx ou l'efflux de ces ions induit une dépolarisation ou une hyperpolarisation de la membrane, à l'origine de la signalisation cellulaire sous-jacente.

(Figure réalisée sur Biorender.com, adaptée de Nair *et al.* (31).)

Les seconds (RCPG) constituent une grande famille de protéines à sept domaines TM (Figure 9). Les boucles extracellulaires constituent des poches pour l'interaction avec le (les) ligand(s). La fixation du ligand sur le récepteur induit un changement conformationnel entraînant l'activation d'une protéine G. La protéine G est constituée de trois sous-unités : α , β et γ . Ces deux dernières, sont attachées à la membrane via un ancrage lipidique. Dans l'état non activé, une molécule de GDP est

fixée à la sous-unité α . L'activation par le récepteur entraîne le remplacement du GDP par une molécule de GTP, induisant une dissociation de la protéine G. La sous-unité α se détache des deux autres, permettant leur diffusion le long de la membrane et l'activation de messagers secondaires pour propager le signal. Parmi ces messagers secondaires sont retrouvés l'adénylate cyclase, l'AMPc ou la phospholipase C notamment. En fonction des types de sous-unités de la protéine G, celle-ci peut être activatrice ou inhibitrice (24,33–35). Les RCPG constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires (environ un millier de récepteurs différents), mais aussi la cible la plus fréquente des médicaments (entre un tiers et la moitié des substances actives sur le marché) (24). Parmi ces médicaments sont retrouvés le maraviroc ciblant le récepteur CCR5 dans la prise en charge du VIH et le fingolimod ciblant les récepteurs de la sphingosine-1-phosphate dans la sclérose en plaques (36).

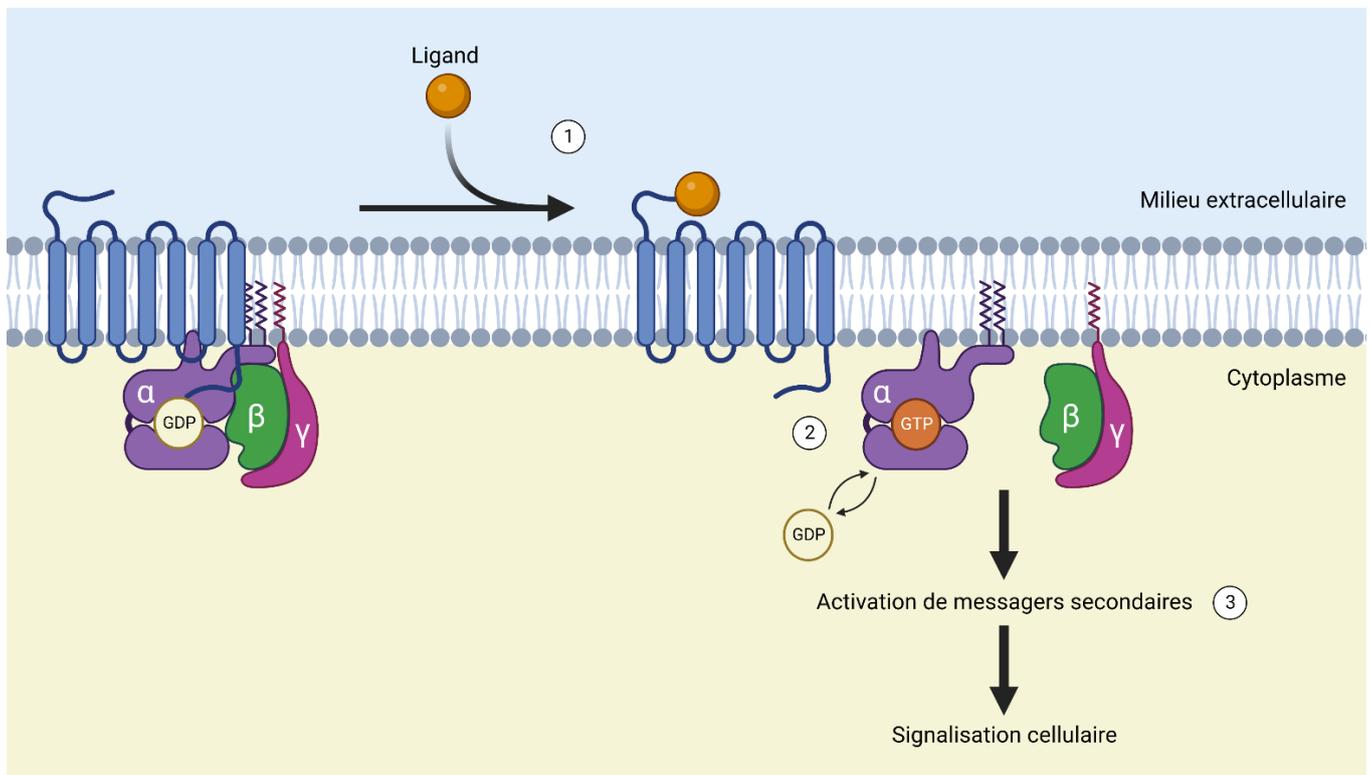


Figure 9 : Les récepteurs couplés à une protéine G.

- (1) La fixation du ligand sur un récepteur couplé à une protéine G, induit l'activation de cette dernière.
- (2) La sous-unité α fixe une molécule de GTP et se dissocie du récepteur et des sous-unités $\beta\gamma$.
- (3) Les sous-unités ainsi activées, activent des messagers secondaires à l'origine de la signalisation cellulaire sous-jacente.

(Figure réalisée sur Biorender.com, adaptée de Nair *et al.* (31).)

Enfin, le troisième type de récepteurs membranaires (récepteurs couplés aux enzymes) possède une activité catalytique intracellulaire médiée par des enzymes (**Figure 10**). La reconnaissance d'un ligand entraîne l'oligomérisation du récepteur, ce qui induit cette activité. Plusieurs types d'activités enzymatiques existent, la plupart sont des kinases qui phosphorylent des protéines intracellulaires. Les récepteurs les plus nombreux sont les récepteurs à activité tyrosine kinase et les récepteurs à activité sérine-thréonine kinase. L'activation de ces récepteurs entraîne une autophosphorylation sur des résidus tyrosine, sérine ou thréonine respectivement. Cette autophosphorylation active l'activité enzymatique du récepteur qui phosphoryle alors des cibles dans la voie de signalisation impliquée (31,35).

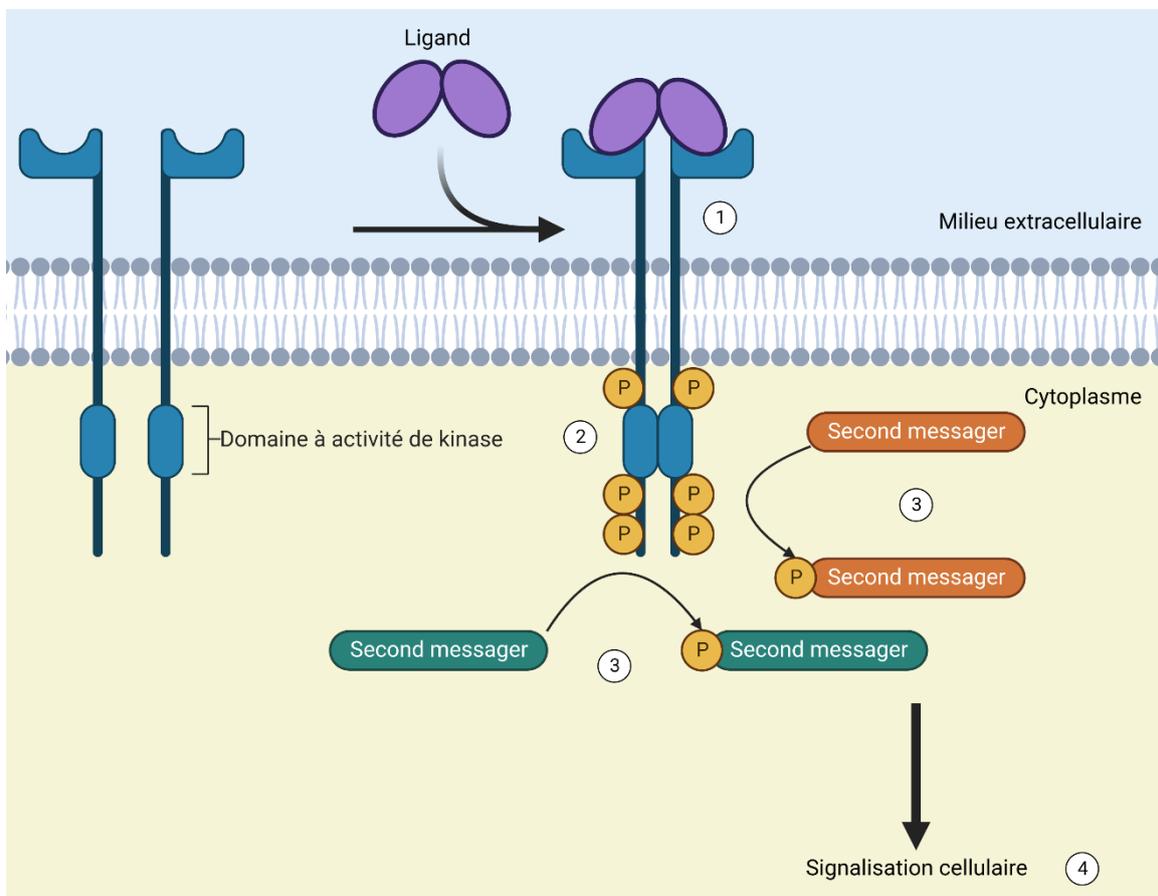


Figure 10 : Les récepteurs couplés à une enzyme.

- (1) La fixation du ligand sur un récepteur couplé à une enzyme, induit sa dimérisation.
- (2) Les enzymes, le plus souvent des kinases, induisent l'autophosphorylation du récepteur.
- (3) Des seconds messagers recrutés au niveau du récepteur, peuvent ensuite être activés par phosphorylation.
- (4) Ces seconds messagers peuvent ensuite transduire le signal.

(Figure réalisée sur Biorender.com, adaptée de Nair *et al.* (31).)

II. Le domaine transmembranaire, plus qu'un rôle d'ancrage ?

1) Description du domaine transmembranaire

Les récepteurs membranaires sont constitués d'un ou plusieurs domaines transmembranaires, lorsqu'ils traversent la membrane plasmique. Les protéines ayant un domaine transmembranaire, également appelées bitopiques, sont celles dont le domaine TM est le plus étudié. Il en existe deux types : le type I pour lesquelles l'extrémité N-terminale (N-ter) est extracellulaire et le type II pour lesquelles le N-ter est intracellulaire. Les protéines à plusieurs domaines TM quant à elles sont appelées polytopiques (37). Les domaines TM sont constitués majoritairement d'acides aminés non polaires, du fait de l'hydrophobicité de la membrane (38). Les acides aminés les plus souvent retrouvés sont donc l'alanine (A), la glycine (G), l'isoleucine (I), la leucine (L), la méthionine (M), la phénylalanine (F), le tryptophane (W), la tyrosine (Y) et la valine (V) (38). L'environnement hydrophobe de la bicouche lipidique est responsable de la forme dominante adoptée par les domaines TM, les hélices α (**Figure 11A**). Cette forme permet d'optimiser la formation de liaisons hydrogène au sein de l'hélice, mais aussi pour des questions d'énergie, car les hélices α en sont moins demandeuses (38). L'énergie nécessaire pour former l'hélice étant excédentaire, la séquence TM peut aussi contenir quelques acides aminés polaires (dont l'acide aspartique [D], l'acide glutamique [E], l'arginine [R], l'asparagine [N], la glutamine [Q], l'histidine [H] et la lysine [K]). Enfin, la cystéine (C), la sérine (S) et la thréonine (T) sont souvent retrouvées dans les séquences TM afin de favoriser la formation de liaisons hydrogène stabilisant la structure (38). D'après une étude à grande échelle des séquences TM des protéines membranaires de H.J. Sharpe et collaborateurs, une distribution asymétrique de ces acides aminés est cependant observée au sein de la séquence TM (39). Ainsi, des acides aminés plus petits (comme G et V) sont retrouvés plus fréquemment dans l'hémi-membrane externe, alors que des acides aminés plus grands (comme la leucine) sont plus fréquents dans l'hémi-membrane interne. Cette asymétrie peut être expliquée en partie par la différence de composition lipidique entre les deux hémi-membranes.

La longueur de la séquence TM est imposée par l'épaisseur de la membrane. Celle-ci est d'environ 3nm (sans les têtes polaires des phospholipides), or chaque acide aminé étend l'hélice d'environ 0,15nm et chaque tour d'hélice est constitué de 3,6 acides aminés. Par conséquent, la longueur de la séquence TM est aux alentours de 18 à 21 acides aminés (**Figure 11B**) (37,39,40). La

détermination des extrémités du domaine TM est facilitée par la présence d'acides aminés particuliers. Du côté cytoplasmique, la règle dite du « positif à l'intérieur » (*positive-inside rule*) s'applique, entraînant une concentration d'acides aminés chargés positivement (K et R en particulier) (39,41). Une seconde règle dite de « déplétion négative à l'intérieur et enrichissement négatif à l'extérieur » (*negative-inside depletion / negative-outside enrichment*) s'applique pour les deux extrémités. Selon cette règle, un appauvrissement en acides aminés chargés négativement (D et E) est observé du côté cytoplasmique, alors qu'un enrichissement de ces mêmes acides aminés est noté du côté extracellulaire (41). Enfin, un enrichissement en acides aminés aromatiques (W et Y en particulier) est observé aux deux extrémités. Les raisons de ces distributions différentielles ne sont pas toutes connues, mais elles favoriseraient notamment l'insertion de la séquence TM dans la membrane (41).

Les hélices au sein de la membrane ne sont pas figées et peuvent adopter quatre types de mouvements différents : les domaines TM peuvent s'étendre et s'allonger comme un piston, glisser le long de la membrane de gauche à droite, tourner sur leur axe et s'incliner dans la membrane (**Figure 11C**) (42). Certaines protéines TM peuvent adopter une structure différente, en tonneaux β , constitués au moins de huit feuillets β antiparallèles (**Figure 11A**). Les feuillets sont reliés entre eux par des liaisons hydrogène via les acides aminés polaires, faisant face à la lumière du tonneau, par lequel des nutriments en solutions aqueuses peuvent passer. Ce type de protéines est retrouvé dans la membrane externe des bactéries, des mitochondries et des chloroplastes (43).

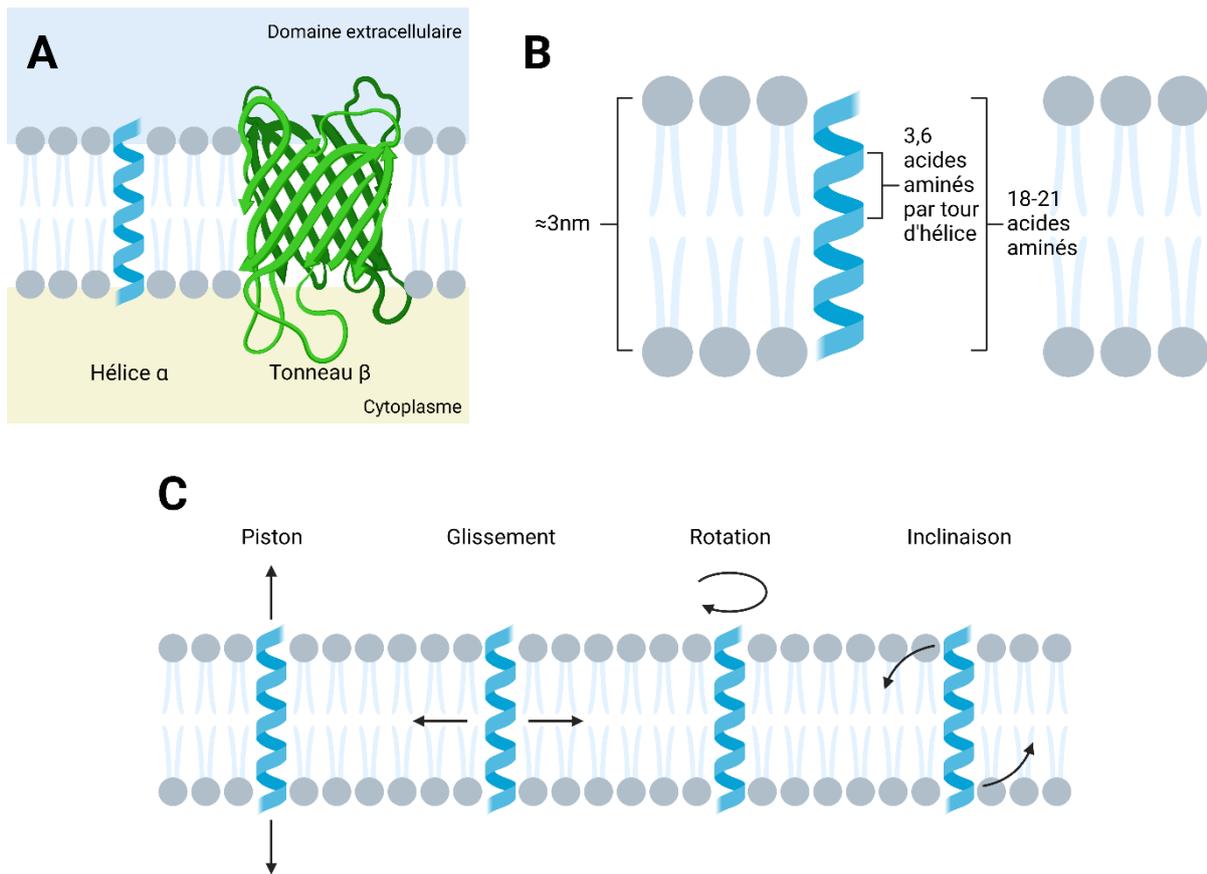


Figure 11 : Le domaine transmembranaire des protéines membranaires.

- (A) Les formes majoritaires que peuvent adopter les domaines transmembranaires des protéines membranaires dans la membrane cellulaire sont soit les hélices α , soit les tonneaux β formés de plusieurs feuillets β .
- (B) La partie hydrophobe de la membrane plasmique a une épaisseur d'environ 3nm et dans une hélice α , chaque tour d'hélice est constitué de 3,6 acides aminés, qui étendent chacun l'hélice de 0,15nm. En conséquence, l'hélice a une taille totale de 18 à 21 acides aminés.
- (C) Les différents mouvements que peuvent adopter les domaines transmembranaires dans la membrane cellulaire.

(Figure réalisée sur Biorender.com, adaptée de Westerfield et Barrera (42).)

2) Historique de l'étude du domaine transmembranaire

L'intérêt pour cette petite séquence au sein des protéines membranaires restait limité jusque dans les années 1990, avant l'intervention de D.M. Engelman et J.L. Popot. Dans leurs premiers articles s'intéressant aux protéines membranaires, peu d'informations existaient sur leurs structures secondaires, tertiaires et quaternaires, ni sur leur fonctionnement pour la transmission d'informations (44,45). Cependant, ils ont pu montrer grâce à leur modèle de « double étape » (*two-stage model*, **figure 12**) que les hélices α des domaines TM des protéines à plusieurs domaines TM interagissent entre elles par des interactions électrostatiques et de Van der Waals. D'après ce modèle, une protéine peut replier ses domaines TM en hélices α indépendantes, les insérer dans la membrane, puis les assembler dans leur structure tertiaire, sans altérer les hélices. La première étape (conformation des hélices) est obtenue grâce au milieu hydrophobe et les liaisons hydrogènes au sein de l'hélice. De plus, en raison de l'hydrophobicité de la membrane, la chaîne polypeptidique ne peut pas intégrer la bicouche lipidique sans être repliée en hélice. La seconde étape (interactions entre hélices) repose sur des liaisons polaires entre hélices, des domaines extra-membranaires ou d'autres protéines (38,44–46). Ces résultats s'appuient surtout sur l'étude d'une protéine à sept domaines TM, la bactériorhodopsine (47). Par extension, ils proposent que dans les protéines à un domaine TM, ce type d'interactions entre plusieurs hélices se déroule également. Pour appuyer leurs propos, ils décrivent des expériences où la bactériorhodopsine est séparée en plusieurs fragments et ces fragments sont capables d'interagir, comme s'il s'agissait de deux partenaires d'une hétérodimérisation (46). En outre, les interactions entre les hélices TM de plusieurs récepteurs à un domaine TM sont essentielles pour l'oligomérisation et la transduction du signal (45,48). Les premières protéines dont l'importance du domaine TM a été démontrée comprennent le récepteur PDGFR du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), pour lequel l'association des domaines extracellulaires induite par le ligand et l'activité tyrosine kinase nécessitent l'association des domaines TM et intracellulaire (45). Ainsi, en remplaçant le domaine TM par celui du récepteur de l'EGF, l'activation du récepteur est inhibée (49). Un autre exemple est la glycoprotéine gp160 de l'enveloppe du virus VIH-1, pour laquelle une délétion du segment TM empêche la dimérisation, entraînant une perte de la capacité infectieuse des particules virales (50). Une autre protéine très étudiée, est la sialoglycoprotéine érythrocytaire humaine glycophorine A (GpA), dont le domaine TM est essentiel pour l'oligomérisation. Ce rôle indispensable a été démontré de manière élégante,

par l'ajout d'un peptide reprenant la séquence du domaine TM de la GpA qui rompt le dimère de GpA. L'ajout de peptides non liés et reprenant la séquence TM de l'EGFR, de l'oncogène *neu* ou de la bactériorhodopsine n'a au contraire pas d'effet (51,52). Cet essai, démontre que le segment TM est non seulement indispensable pour l'activité du récepteur, mais aussi que sa séquence est spécifique d'un récepteur, malgré le nombre restreint d'acides aminés disponibles.

Au fur et à mesure des avancées dans les connaissances concernant le domaine TM et ses interactions, Engelman, Popot et leurs collaborateurs durent se rendre à l'évidence que le modèle à deux étapes reste insuffisant pour expliquer ce qu'il se produit après l'enroulement en hélice α et les interactions entre hélices. Ainsi, ils proposent en 2003 une troisième étape se déroulant après les deux autres (**Figure 12**). Dans cette troisième étape, les structures formées par les hélices interagissant peuvent accueillir d'autres régions polypeptidiques de la protéine (de courtes hélices par exemple) ou des groupements prosthétiques au sein de la membrane. Ces interactions sont rendues possibles par l'environnement « moins hydrophobe » que les hélices créent. Cet environnement est créé notamment grâce à la polarité partielle de la séquence de l'hélice, l'éloignement des lipides par l'hélice et la création de surfaces propices à des interactions spécifiques (53,54).

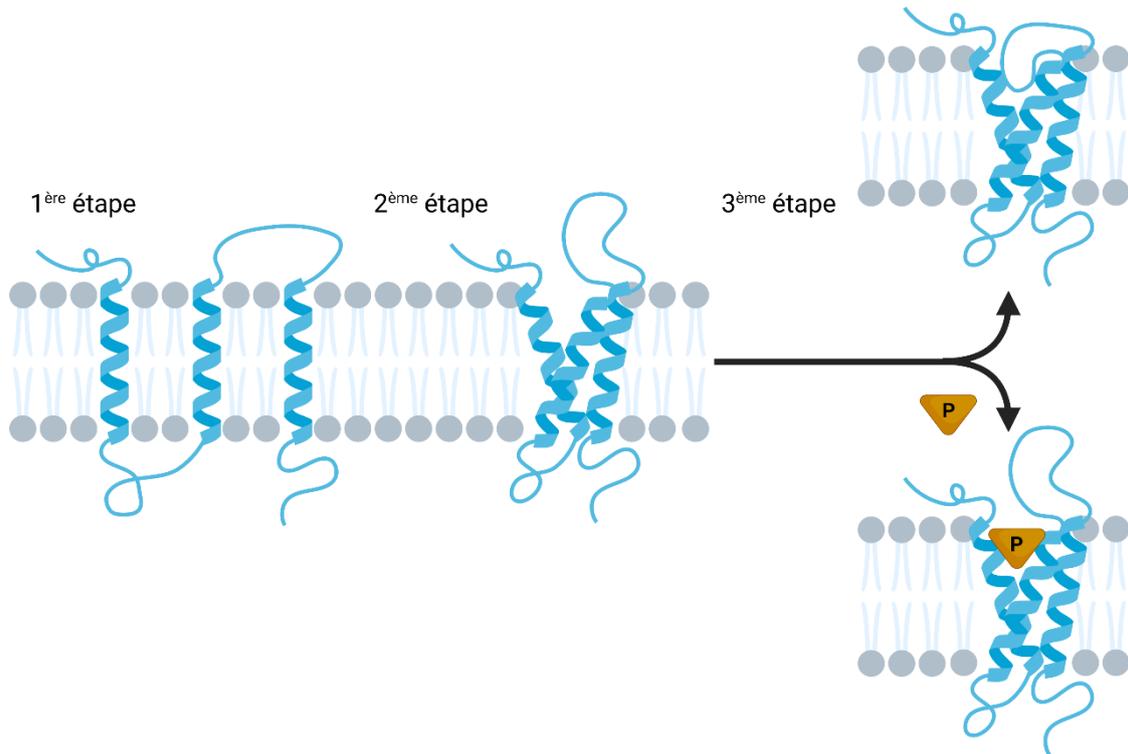


Figure 12 : Le modèle à trois étapes d’insertion des domaines transmembranaires dans la membrane cellulaire.

L’insertion et l’organisation du domaine transmembranaire des protéines membranaires à plusieurs domaines membranaires se déroule en suivant un modèle à trois étapes. La première étape est la formation d’hélices α au sein de la membrane. La deuxième étape correspond aux interactions entre hélices. Les structures formées lors de la deuxième étape, permettent dans une troisième étape d’accueillir d’autres régions de la protéine ou des groupements prosthétiques (notés P dans la figure) dans la membrane.

(Figure réalisée sur Biorender.com, adaptée de Engelman *et al.* (54).)

Les modèles développés par Engelman et Popot dans les années 1990, sont toujours acceptés dans les articles plus récents, s’appuyant sur des simulations et des essais dans des membranes synthétiques (55–57). Les résultats obtenus permettent de conclure que la structure tridimensionnelle adoptée par les domaines TM des protéines membranaires est essentiellement dictée par les interactions intramoléculaires et non par les contraintes imposées par la bicouche lipidique (58). Ce dernier point est cependant ouvert au débat, puisque certains chercheurs affirment que les lipides présents dans la membrane influencent l’oligomérisation des récepteurs.

Un exemple cité est le fragment C99 de la protéine APP (*Amyloid Precursor Protein* – Protéine précurseur de l'amyloïde) pour lequel l'interface d'homodimérisation est également un site de fixation du cholestérol, les deux entrant en compétition (59). Par ailleurs, de plus en plus d'informations ont pu être collectées sur l'importance des différents acides aminés présents dans la séquence TM. Ceux-ci sont décisifs pour la génération d'interfaces d'interaction, pour le repliement et la fonction, notamment en réponse à des modifications de pH (56,60,61).

3) La séquence en acides aminés possède un rôle prépondérant

Comme mentionné précédemment, la nature des acides aminés présents dans la séquence TM a un impact conséquent sur les interactions entre domaines TM et par extension entre récepteurs membranaires entiers (62). Il existe des motifs d'acides aminés favorisant les interactions appelés « points chauds » (*hot spot*). Le premier à avoir été décrit est le motif GxxxG dans la séquence TM de la GpA par Engelman et ses collaborateurs (63–65). Ils ont d'abord identifié un motif d'interaction d'homodimérisation par différentes méthodes (FRET, ultracentrifugation analytique), en intégrant à chaque fois des mutations dans la séquence, position après position. Ainsi, les sept acides aminés essentiels (LlxxGVxxGVxxT) pour l'interaction ont pu être établis (63–65). Par la suite, un criblage effectué par un essai ToxCAT (voir partie II. 4), leur a permis de réduire cette interface à un motif (G, A ou S)xxx(G, A ou S), « x » représentant un acide aminé quelconque. Le motif le plus fréquemment retrouvé est GxxxG. Ce motif est souvent retrouvé dans des interactions entre hélices avec une forte affinité. En effet, il fournit un espace pour le repliement en diminuant l'encombrement stérique. Il permet ainsi un enfouissement important et favorise le rapprochement entre les hélices par la formation de liaisons hydrogène entre elles. GxxxG est donc un motif formant un cadre pour la dimérisation d'hélices α TM (66–69). La position de ce motif dans la séquence est importante puisqu'il favorise l'interaction avec un domaine TM ayant le motif dans une position similaire. Si le motif se trouve par exemple à proximité de la surface de la bicouche, il ne va pas interagir avec un TM pour lequel le motif est au centre. De même, l'orientation de l'hélice impacte les interactions entre domaines TM. Ainsi, ces deux paramètres confèrent une certaine spécificité du motif malgré sa propension à interagir avec n'importe quelle séquence TM (66,67,70). Le motif est également entouré par des acides aminés particuliers, à savoir des acides aminés à chaîne aliphatique large (I, L ou V), stabilisant l'hélice (71).

Le deuxième motif est la présence d'acides aminés polaires au sein de la séquence TM. L'occurrence de ce genre de résidus est rare, mais ils sont d'une importance capitale pour la fonction de la protéine. Une mutation remplaçant un acide aminé non polaire par un autre polaire est associée à la survenue de pathologies (66). C'est le cas notamment dans le domaine TM du récepteur CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) où une mutation de ce type (V→D) est responsable de la mucoviscidose (72). Pour la protéine MPZ (*Myelin Protein Zero*), une mutation G→R dans le domaine TM est quant à elle responsable de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (68,73). De telles conséquences proviennent du fait que ces résidus polaires sont capables de former des liaisons hydrogène entre les deux séquences TM stabilisant fortement leur interaction (66,68,74). Les acides aminés qui stabilisent le plus l'interaction sont l'asparagine, l'acide aspartique, la glutamine et l'acide glutamique du fait de la présence de deux atomes polaires dans leur chaîne latérale, pouvant servir à la fois de donneur et d'accepteur de liaison hydrogène (62,75,76). Des acides aminés chargés positivement peuvent également être retrouvés au sein de la séquence TM, notamment l'arginine et la lysine. Ces résidus ont également des conséquences importantes sur les capacités de dimérisation, en témoignent les mutations les introduisant dans la séquence (62). En effet, l'insertion d'une arginine dans le domaine TM est souvent associée à un dysfonctionnement dans la dimérisation d'une protéine membranaire, comme c'est le cas pour FGFR3, où une mutation G→R est responsable de l'achondroplasie (77). Ces dysfonctionnements sont dus à la taille importante de l'arginine, responsable d'encombrements stériques. De plus, sa forte polarité peut induire la formation de liaisons hydrogènes et sa charge peut au contraire induire une répulsion du second TM impliqué dans l'interaction (62,78). Des mutations entraînant une perte d'un acide aminé chargé peuvent aussi avoir des effets néfastes, comme dans la substitution d'une lysine par une méthionine dans le TM de la rhodopsine, qui perd ainsi son site de fixation du rétinol, responsable d'une forme grave de rétinopathie pigmentaire (78).

Le troisième motif est appelé « *zipper* », traduisible par « fermeture à glissière ». Il en existe deux types, le glycine *zipper* et le leucine *zipper*. Le premier à avoir été décrit est le leucine *zipper* par Landschulz et collaborateurs en 1988, comme étant une répétition de leucines chaque sept résidus sur huit tours d'hélices et des acides aminés hydrophobes (I, L ou V) à la quatrième position entre les leucines dans des protéines solubles (79,80). Un motif de ce type est retrouvé dans de nombreuses séquences TM et est essentiel pour la dimérisation de ces séquences. Nous pouvons

citer le récepteur DDR₁ pour lequel la dimérisation nécessaire à son activation passe notamment par un motif leucine *zipper* et un motif GxxxG présents dans la séquence. Après mutation du motif leucine *zipper*, la dimérisation de la protéine entière est toujours possible, mais une perte de l'activité est observée. Le *zipper* est donc impliqué dans des changements conformationnels à l'origine de la transduction du signal et de l'activation du récepteur (81). Un autre exemple est la protéine membranaire E-cadhérine impliquée dans l'adhésion cellulaire. Pour cette protéine, l'activité repose également sur une dimérisation dépendante d'un leucine *zipper* (82). Le deuxième *zipper* est le glycine *zipper*, dont les motifs les plus fréquents sont (G, A, S)xxxGxxxG et GxxxGxxx(G, S, T). Ces motifs favorisent des repliements d'hélices droites favorables à des interactions hélice-hélice, en particulier dans la formation d'oligomères (tétra-, penta-, hexa- et heptamères) à l'origine de la formation de pores. L'importance de ce motif repose également sur sa surreprésentation dans les séquences TM et sa conservation au sein de familles de protéines. Ce motif est différent du motif GxxxG, dans la mesure où le *zipper* interagit avec une face différente de l'hélice, alors que le motif GxxxG interagit avec la même face de l'hélice complémentaire (83). Un exemple de protéine pour laquelle ce motif glycine *zipper* est essentiel dans son activité est le peptide β -amyloïde (A β), pour lequel un motif glycine *zipper* est retrouvé dans la séquence TM. A β a la capacité de former par oligomérisation des pores dans la membrane des neurones, à l'origine de la mort de ceux-ci dans la maladie d'Alzheimer. En mutant les glycines de ce motif, la formation de pores est diminuée et par conséquent la gravité de la pathologie est réduite (84).

Le quatrième et dernier motif que nous allons présenter est un motif faisant intervenir des acides aminés aromatiques (F, W et Y), qui interagissent avec d'autres acides aminés aromatiques via des interactions π - π ou avec des acides aminés chargés positivement (H, K et R) via des interactions cation- π . Les résidus impliqués dans ces interactions étant fortement conservés, ils possèdent des rôles cruciaux dans l'activité des récepteurs (80,85).

Les motifs d'interaction pour les domaines TM décrits ici ne sont jamais indispensables pour que l'interaction entre les protéines entières puisse avoir lieu. Leur présence constitue des sites facilitant ces interactions, tandis que leur absence peut plus ou moins les réduire. Dans certains cas, les motifs permettent de très bien caractériser une interaction, comme c'est le cas pour la glycophorine A, tandis que pour d'autres, il y a une interaction sans motif identifié ou au contraire, il n'y a pas d'interaction via un motif connu (80,86). L'ensemble des résultats obtenus en identifiant

des motifs d'interaction permettent cependant de prédire des interactions, en absence de structures pour les protéines membranaires, difficiles à obtenir (80). En effet, en 2020, seule une vingtaine de structures d'homodimères TM a été obtenue par RMN et cristallographie aux rayons X (69). Finalement, lorsqu'un motif est identifié, cela facilite par la suite son ciblage dans une optique de modulation pharmacologique.

4) Les méthodes pour analyser les interactions du domaine TM

Afin de pouvoir comprendre comment les protéines membranaires et en particulier leurs domaines TM interagissent entre eux, des méthodes *in silico* et *in vitro* ont été conçues. Les méthodes *in silico* ont permis de simuler un grand nombre d'interactions protéine-protéine de la sensibilité gros grain à l'atome (87). Les logiciels présentés ici sont utilisables sans connaissances de programmation. Le premier outil est PREDDIMER (*Prediction tool for an ensemble of transmembrane α -helical dimer conformations*) développé par A.A. Polyansky et P.E. Volynsky. Le logiciel permet de prédire les interactions les plus probables entre homo- et hétérodimères de segments TM. Dans un premier temps, le logiciel reconstruit des hélices α à partir des séquences TM, avant de calculer les propriétés hydrophobes et hydrophiles de ces hélices (*Molecular Hydrophobicity Potential*, MHP). Par la suite, il projette ces propriétés sur des cartes planes en deux dimensions. Ensuite, le logiciel compare les paires de cartes entre elles et estime la complémentarité des surfaces de manière systématique, en faisant interagir les cartes dans toutes les positions. Pour finir, il reconstruit des modèles en trois dimensions des dimères (88,89). Un deuxième outil informatique est TMDOCK, permettant de modéliser des homodimères parallèles d'hélices TM en s'appuyant sur les énergies libres d'association dans un milieu apolaire. Ces énergies comprennent les liaisons hydrogènes et de Van der Waals, les interactions dipôle-dipôle, l'entropie des chaînes latérales et les énergies de solvatation (87,90). TMHOP (*TransMembrane Homo-Oligomer Predictor*) est un autre outil permettant de prédire les homo-oligomères de protéines TM, s'appuyant sur un criblage par ToxCAT (voir plus bas cette méthode). D'après les auteurs, ce calcul intègre le rôle des lipides et des molécules d'eau dans les interactions. De plus, pour ce logiciel, le calcul commence dès la séquence linéaire du peptide et non pas à partir des hélices directement (87,91). Après avoir déterminé les probabilités d'interaction des séquences TM entre elles, il peut être intéressant de déterminer quels sont les acides aminés présents à l'interface d'interaction. Pour ce faire, le logiciel PDBePISA

(*Proteins, Interfaces, Structures and Assemblies*) peut être utilisé. Celui-ci permet d'explorer les interfaces de macromolécules en s'appuyant sur plusieurs propriétés physico-chimiques (énergie libre de formation du complexe, énergies de solvatation, surface d'interaction, liaisons hydrogène, hydrophobicité,...) et de déterminer l'enfouissement de chaque acide aminé (92). Un autre logiciel permettant de prédire les acides aminés présents à l'interface de séquences TM interagissant en homodimères est THOIPA (*TM HOmodimer Interface Prediction Algorithm*). Il se base sur les structures résolues des TM pour déterminer l'enfouissement, la conservation et la polarité des acides aminés (69).

Les méthodes *in silico* permettent d'émettre des hypothèses, qui doivent être validées par la suite par des méthodes *in vitro*. Toutes les méthodes utilisées pour étudier les interactions protéine-protéine et présentées précédemment peuvent également être utilisées pour étudier les interactions TM-TM (co-immunoprécipitation, BTH, PLA, FRET, BRET). Nous présenterons ici une méthode qui a été développée dans les années 1990, en particulier pour l'étude des interactions TM-TM. Celle-ci permet également d'effectuer des criblages à haut débit. Elle repose sur l'utilisation de l'activateur de transcription bactérien ToxR, dont l'activité dépend de sa dimérisation. La partie intracellulaire de ToxR est fusionnée à la séquence TM d'intérêt et le tout est exprimé dans *Escherichia coli*. Si la séquence TM s'auto-associe, ToxR dimérise et induit la transcription d'un gène rapporteur (β -galactosidase) dont le niveau d'activité est proportionnel à la force de l'interaction de la séquence TM (87,93,94). En ajoutant en plus dans la construction la partie extracellulaire d'une protéine monomérique périplasmique (*Maltose-binding protein*), et en supprimant la capacité d'exprimer cette protéine à la bactérie, l'adressage à la membrane est augmenté (87). Des améliorations du système comprennent le remplacement du gène rapporteur par la CAT (*Chloramphenicol Acetyl-Transferase*), alors nommé ToxCAT (**Figure 13**) (87,95). Cette dernière méthode a été très utilisée pour déterminer les interactions entre domaines TM de nombreuses familles et pour déterminer les motifs d'interaction notamment. Une autre amélioration consistait à remplacer le ToxR par d'autres constructions afin de pouvoir étudier les hétérodimérisations. Cependant toutes ces méthodes présentent le désavantage d'être réalisées dans des membranes bactériennes, différentes de celles des mammifères, ce qui peut avoir un impact sur les capacités d'interactions des domaines TM. Des méthodes transposables dans des membranes de mammifères ont donc été développées, telles que le BiFC (*Biomolecular Fluorescent Complementation assay*). Cette dernière méthode repose sur

l'utilisation d'une protéine fluorescente (par exemple la GFP) divisée en deux fragments non fluorescents. Chaque fragment est fusionné à un domaine TM et lorsque les deux TM interagissent, un signal fluorescent peut être mesuré (87,96). Le développement de la méthode ToxR et des dérivés a permis de mieux comprendre les règles qui régissent les interactions entre domaines TM et en particulier les acides aminés impliqués dans ces interactions. Elles ont également permis l'étude de composés ciblant les interactions TM-TM.

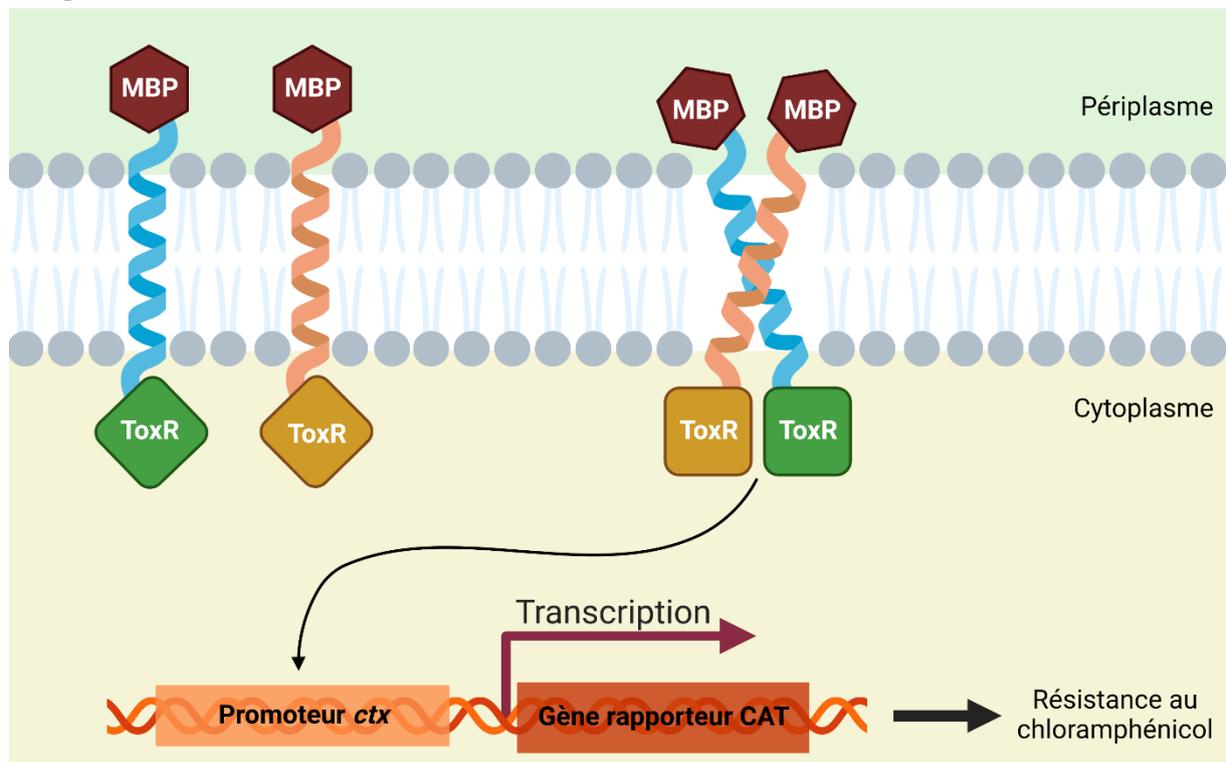


Figure 13 : Principe de la méthode ToxCAT.

Les segments transmembranaires d'intérêt sont couplés d'une part au facteur de transcription ToxR et d'autre part à la *maltose-binding protein* (MBP). Si les deux segments transmembranaires interagissent, le facteur de transcription dimérise, et induit la transcription du gène rapporteur via le promoteur *ctx*. Le gène rapporteur code pour la *chloramphenicol acetyl-transferase* (CAT) conférant aux bactéries la résistance au chloramphénicol. L'acétylation du chloramphénicol peut être quantifiée et est indicatrice de l'interaction entre les deux segments transmembranaires.

(Figure réalisée sur Biorender.com, adaptée de Russ et Engelman (95).)

III. Le domaine transmembranaire, une cible thérapeutique ?

Au vu de l'importance du domaine TM dans les fonctions biologiques et son implication dans de nombreuses pathologies, il peut sembler judicieux de le cibler pharmacologiquement. Des difficultés non négligeables se présentent cependant, puisque c'est un domaine qui n'est pas aisé à atteindre. De plus, les molécules qui le ciblent doivent être fortement hydrophobes et avec des caractéristiques pharmacologiques particulières, en comparaison aux traitements classiques. Certaines petites molécules ont la capacité de cibler ce domaine particulier, à l'image de la fluoxétine (antidépresseur), capable de moduler la dimérisation du récepteur TrkB en agissant directement sur le domaine TM. La fluoxétine permet de stabiliser une conformation dimérique du récepteur, facilitant ainsi son activation par le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) et favorisant ainsi l'activité antidépressive du récepteur (97). Dans le paragraphe ci-dessous, nous allons cependant nous intéresser à une stratégie différente, qui consiste à utiliser des peptides mimant les séquences TM de la cible pour ainsi moduler l'oligomérisation de la protéine membranaire et par conséquent sa signalisation sous-jacente. Ces peptides sont appelés « *Membrane Targeting Peptides* » (MTP).

1) La découverte des *membrane targeting peptides*

La stratégie des MTP n'a, dans un premier temps, pas été développée directement pour une application comme molécule thérapeutique. En effet, elle a été mise au point pour comprendre les motifs d'interaction, le repliement et les structures tertiaires et quaternaires des domaines TM dans la bicouche lipidique (70). La première protéine pour laquelle cette méthode a été testée est le récepteur glycophorine A par Furthmayr et Marchesi en 1976 (98). Par la suite, l'utilisation de ce peptide TM a permis de déterminer que la dimérisation passe par des acides aminés particuliers, le motif GxxxG (51). Ce premier peptide TM a pu être obtenu par synthèse bactérienne, pour être utilisé sur des dimères formés en SDS analysés par SDS-PAGE et *western-blot* (51). Rapidement, le phénomène de ces peptides interagissant avec le domaine TM de la protéine entière a été perçu comme une stratégie intéressante pour le développement de nouvelles cibles thérapeutiques (Figure 14). Ainsi, Lofts et collaborateurs, ont testé de tels peptides produits par génie génétique pour inhiber la dimérisation d'ErbB2/*neu* dans des modèles *in vitro* de neuroblastome. Ils ont pu

montrer que les peptides inhibent partiellement la dimérisation, se traduisant par une inhibition de la prolifération tumorale (99). Depuis lors, de nombreux peptides ont été testés pour une multitude de cibles et permettant d'inhiber ou stabiliser l'oligomérisation de domaines TM. Les peptides ciblant les protéines à un domaine TM ont été compilés par Westerfield et Barrera en 2020 dans une revue, dont nous verrons plus en détails quelques exemples par la suite (42).

Pour concevoir les peptides ciblant le domaine TM, deux approches principales existent : la conception basée sur la structure et la conception basée sur la séquence (42). La première repose sur la conception *de novo* de peptides ajustés à la structure adoptée par l'hélice dans la membrane en intégrant les acides aminés les plus adaptés pour chaque position. Ce type d'approche a été mise au point par Yin *et al.* sous l'appellation *Computed Helical Anti-Membrane Proteins* (CHAMPs) (100,101). Ils ont ainsi pu concevoir des peptides TM inhibant l'hétérodimérisation des intégrines α_{IIb}/β_3 et α_v/β_3 permettant ainsi l'activation de l'agrégation plaquettaire (100,101). Cette méthode dépend cependant d'une banque de données sur laquelle le logiciel s'appuie pour générer les peptides (102). La deuxième approche, se basant sur la séquence directement, est abordée soit via le criblage, soit via une conception rationnelle. Le criblage peut être réalisé *in silico* par des modélisations ou *in vitro*. Un exemple est le développement des « traptamères », correspondant à des aptamères protéiques TM ciblant un domaine TM spécifique. Il a été développé par DiMaio et collaborateurs, qui ont pu développer des peptides ciblant et activant le récepteur PDGFR β ou celui de l'érythropoïétine (EpoR) (103–105). La conception rationnelle permet de construire des peptides ciblant sélectivement un domaine TM en particulier. C'est la méthode qui a été la plus utilisée. Une possibilité est de simplement isoler le domaine TM d'une protéine ou de le synthétiser et de le tester directement (42). Une autre possibilité est de partir de la séquence native, puis de la modifier pour améliorer sa solubilité, sa stabilité et son activité. Ainsi, le peptide peut être amélioré notamment en modifiant certains acides aminés, en intégrant des acides aminés non naturels ou leurs énantiomères dextrogyres (D), en lui greffant des lipides ou en induisant une cyclisation (106).

Une question reste cependant en suspens : comment le segment TM peut-il induire l'activation du récepteur ? Une première piste repose sur le fait que les domaines TM (en particulier ceux des RTKs et TLRs) ont tendance à s'auto-assembler. Ainsi, ils facilitent la dimérisation des récepteurs, essentielle à leur activité. Cependant, des formes dimériques non-actives existent et cette première hypothèse ne peut pas expliquer le rôle complet du segment TM dans l'activation des

récepteurs. Une deuxième hypothèse propose que sur un dimère inactif, la fixation du ligand induit une rotation, transmise au domaine intracellulaire via le domaine TM. Enfin, une troisième hypothèse propose que pour être actifs, certains récepteurs nécessitent de former des « grappes » (*clusters*). Ce phénomène peut aussi reposer sur le domaine TM capable de se déplacer horizontalement dans la membrane pour retrouver ses partenaires d'interaction. La réalité repose sans doute sur plusieurs hypothèses en fonction du récepteur étudié (42).

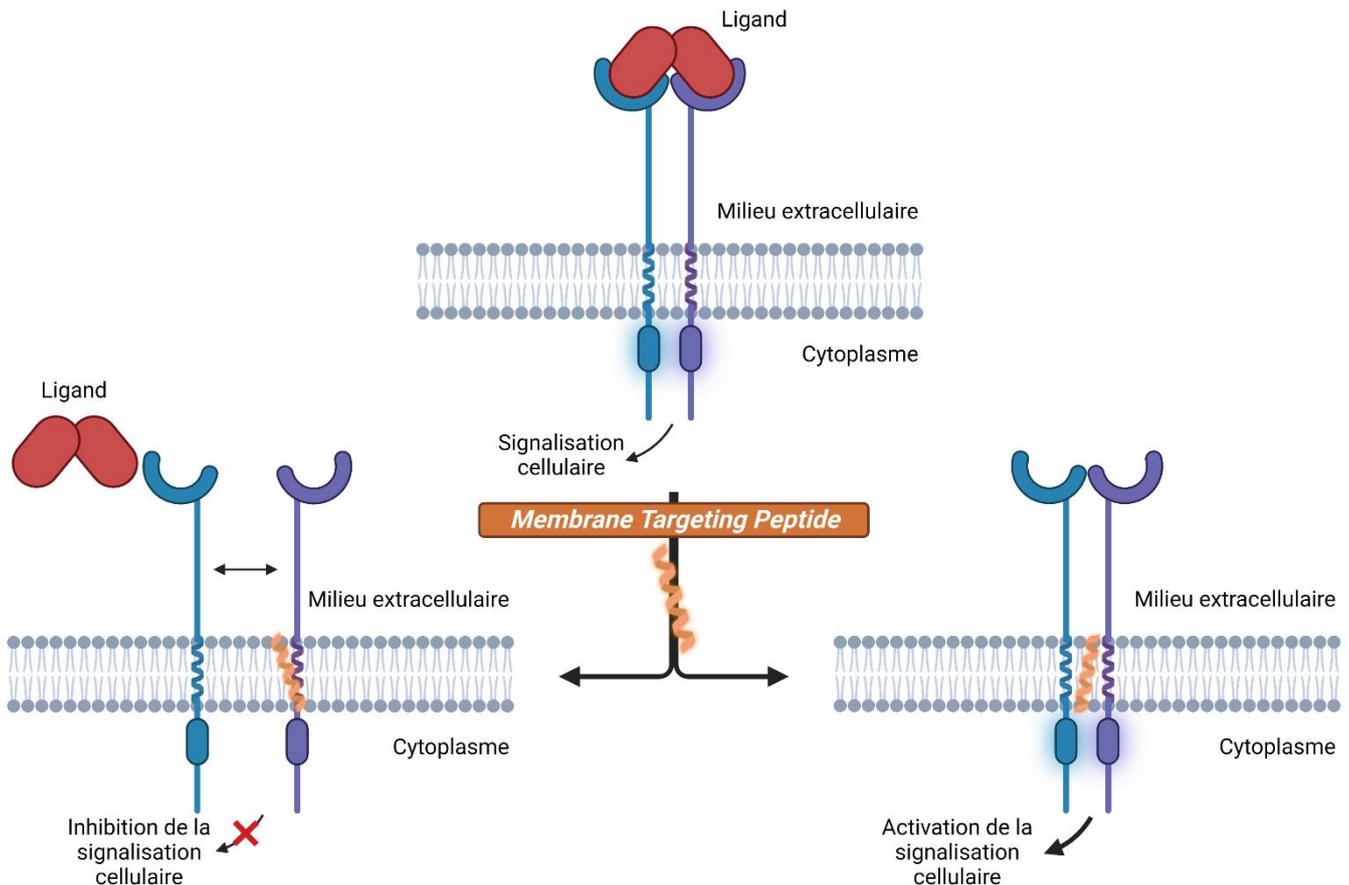


Figure 14 : Stratégie générale des Membrane Targeting Peptides.

La fixation d'un ligand sur son récepteur induit sa dimérisation, son activation et la transduction d'un signal cellulaire. Le domaine transmembranaire du récepteur est impliqué dans sa dimérisation et activation. En le ciblant avec des MTPs qui miment sa séquence, la signalisation cellulaire peut être modulée. Le MTP peut d'une part empêcher la dimérisation du récepteur et ainsi inhiber la voie de signalisation sous-jacente. Il peut d'autre part, favoriser la dimérisation du récepteur, et ainsi induire l'activation de la voie de signalisation sans ligand.

(Figure réalisée sur Biorender.com.)

2) Comment solubiliser le peptide pour qu'il puisse atteindre sa cible ?

Avant de nous intéresser à quelques exemples de MTPs, nous allons passer en revue les différentes méthodes pour permettre aux peptides TM d'être solubilisés et d'atteindre leur cible. En effet, les MTPs sont des composés hautement hydrophobes et très peu solubles dans des solvants aqueux. Ces questions émergent surtout à partir des étapes d'évaluation de l'efficacité *in vivo* de ces peptides. Injecter des peptides solubilisés dans des solvants organiques n'étant pas concevable, il a fallu développer des solutions alternatives. Quatre méthodes principales ont été développées et permettent d'amener les peptides à leur(s) cible(s) (**Figure 15**) (107). La première consiste à utiliser des micelles de détergent, par exemple le lithium dodecyl sulfate (LDS), utilisé historiquement au sein du laboratoire d'accueil. Les peptides intègrent les micelles formées par le LDS. Ces micelles vont, après administration parentérale et passage dans le sang, se désintégrer car leur concentration sera inférieure à la concentration micellaire critique (CMC). Les peptides hydrophobes n'auront alors pas d'autre possibilité que d'intégrer les membranes des cellules (108). La deuxième méthode consiste à faire exprimer les peptides par les cellules elles-mêmes via l'utilisation de plasmides. La troisième méthode repose sur l'utilisation des CPP (*Cell Penetrating Peptides*), qui sont de courts peptides (une trentaine d'acides aminés) capables d'entrer dans les cellules et de transporter avec eux les molécules auxquelles ils sont liés. L'entrée des CPP se fait par endocytose ou perturbation de l'organisation lipidique de la membrane (109). Enfin, la dernière méthode repose sur la modification de la séquence peptidique afin de rendre les TM moins hydrophobes sans altérer leur fonction. Cette dernière méthode a notamment été mise au point dans le laboratoire d'Engelman, sous la dénomination de pHLIP (*pH-Low Insertion Peptide*). Ce peptide soluble dans l'eau se fixe aux membranes sans structure spécifique. Après acidification (notamment dans les tumeurs), les acides aspartiques présents dans la séquence se protonent, induisant une augmentation de l'hydrophobicité du peptide qui se replie en hélice α , permettant ainsi son insertion dans la membrane (56,110). Une amélioration de ce type de peptide a été réalisée dans le laboratoire de F.N. Barrera, sous la dénomination d'ATRAM (*Acidity-Triggered Rational Membrane*). Pour ce dernier, la tendance d'auto-agrégation du peptide pHLIP est diminuée et sa sensibilité aux différences de pH a été augmentée, ce qui en fait un véritable outil de thérapie ciblée (111).

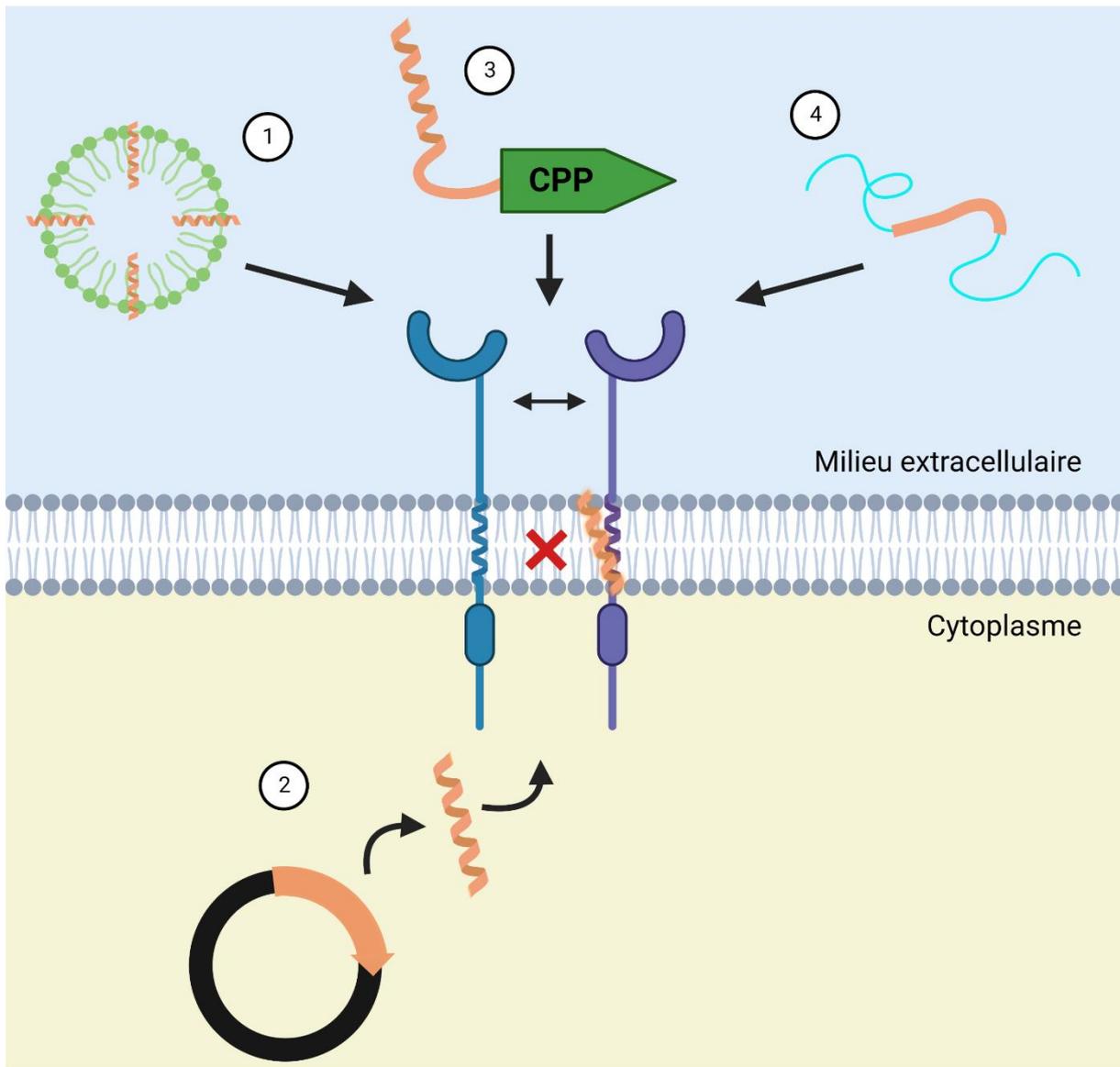


Figure 15 : Les principales méthodes pour délivrer les MTPs dans un organisme.

- (1) La solubilisation des MTPs est possible dans des micelles de détergent (comme le lithium dodécyl sulfate), qui libèrent les peptides lorsque leur concentration est inférieure à la concentration micellaire critique.
- (2) Les MTPs peuvent être exprimés et sécrétés directement par les cellules grâce à l'utilisation de plasmides.
- (3) Les MTPs peuvent être amenés aux cellules en utilisant des CPP (*cell penetrating peptides*).
- (4) Les MTPs peuvent être conçus de manière à être solubles dans l'eau. Ils se fixent alors aux membranes et la modification locale de pH induit une augmentation d'hydrophobicité, permettant ainsi leur insertion dans la membrane.

(Figure réalisée sur Biorender.com, adaptée d'Albrecht *et al.* (107).)

3) Des outils pour cibler les cellules tumorales

La recherche s'intéressant tout particulièrement au cancer, un nombre important de peptides avec des capacités anti-tumorales ont été développés. La famille de récepteurs la plus étudiée est la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase de classe I, la famille des récepteurs ErbB. Cette famille est composée des récepteurs EGFR/ErbB1/HER1, ErbB2/HER2/*neu*, ErbB3/HER3 et ErbB4/HER4, souvent dérégulés dans le cancer (107). L'activation de ces récepteurs passe par une dimérisation après fixation du ligand, médiée notamment par le domaine TM. Ainsi, inhiber cette dimérisation par l'ajout d'un peptide mimant la séquence TM du récepteur pour perturber son activation est une stratégie testée à de nombreuses reprises. Les premiers à l'avoir évaluée étaient Lofts *et al.* en 1993 sur le récepteur ErbB2 (99). Par la suite, le laboratoire d'accueil a démontré qu'exposer des cellules tumorales sur-exprimant ErbB1 ou ErbB2 aux peptides TM respectifs, diminue l'activité des récepteurs (112). De même, en mutant le récepteur de l'insuline (IR) en remplaçant son domaine TM par celui d'ErbB1 ou ErbB2, l'ajout des peptides TM ErbB1 ou ErbB2 diminue l'activité du récepteur IR chimérique (113). L'effet *in vivo* de ce type de peptide sur la dimérisation du récepteur ErbB2 a ensuite été évalué. Le peptide (appelé MTP-NeuNT) est capable d'inhiber à une dose de 15µg/kg le développement tumoral dans un modèle de souris transgénique de cancer du sein. De même, une augmentation de la survie et une diminution du développement de métastases pulmonaires est observé (114). Bublil *et al.* ont testé un peptide similaire (nommé B2C-D), qui est capable d'inhiber la formation des hétérodimères entre ErbB2 et les autres membres de la famille. En conséquence la prolifération de plusieurs lignées cancéreuses est inhibée *in vitro* et *in vivo* sur des modèles murins de xénogreffes (115).

Un deuxième exemple est la plateforme du récepteur neuropiline-1 (NRP1) impliquée dans de nombreuses voies de signalisation. NRP1 forme entre autres des hétérodimères avec les membres de la famille des plexines (en particulier la plexine-A1) et des RTKs (comme les VEGFR) (6,108). Ces hétérodimères servent de récepteurs notamment pour les ligands de la famille des sémaphorines (en particulier Sema3A). Des dérégulations de NRP1 sont à l'origine de cancers, notamment son interaction avec les VEGFR. Des travaux du laboratoire d'accueil ont permis de démontrer que le traitement de souris ayant subi des xénogreffes orthotopiques et hétérotopiques de glioblastomes murins et humains avec le peptide ciblant NRP1 (MTP-NRP1) inhibe la croissance tumorale par des effets antiprolifératifs, anti-migratoires et anti-angiogéniques. L'effet passe par une inhibition de la

dimérisation entre NRP1 et VEGFR et empêche la fixation de Sema3A (116). Dans des travaux d'Arpel *et al.*, le laboratoire a démontré que le même peptide possède également des effets anti-cancéreux sur plusieurs lignées de cancers du sein (dont des triples négatifs) en inhibant la croissance tumorale et la formation de métastases *in vivo* (117).

Un dernier exemple est le récepteur EphA2. Celui-ci fait partie de la plus grande famille des RTKs : la famille des récepteurs aux éphrines. Les ligands de ces récepteurs (les éphrines) sont liés à la membrane de cellules différentes, la reconnaissance entre ligand et récepteur permet donc des contacts cellulaires. L'activation des récepteurs passe par leur *clustering* (~ regroupement). Le récepteur EphA2 joue un rôle actif dans de nombreux cancers, mais semble avoir un rôle différent en fonction de son activation. Ainsi, en absence de ligand il promeut l'oncogenèse, alors que son activation est plutôt suppressive de tumeurs (42). Dans cette optique, Alves et collaborateurs, ont conçu un peptide activateur (appelé TYPE7), induisant l'oligomérisation et l'activation du récepteur, ce qui inhibe la migration cellulaire. La particularité de ce peptide est qu'il s'agit d'un peptide conçu sur les principes des peptides pHLIP et ATRAM : il est soluble dans l'eau et change de conformation en fonction du pH. Le peptide se fixe aux lipides membranaires à pH neutre, mais à proximité des membranes cellulaires, une diminution locale du pH est observée, ce qui induit le changement de conformation, permettant au peptide d'entrer dans la membrane (118). Cette technologie permet de s'affranchir des problèmes de solubilité des peptides TM à cause de leur hydrophobicité, mais doit être validée *in vivo* pour vérifier son efficacité.

4) Les Membrane Targeting Peptides et le système nerveux central

Les recherches menées par le laboratoire d'accueil ont permis de démontrer que les MTPs sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) (116). Au vu de cette caractéristique intéressante, les peptides TM peuvent constituer une nouvelle catégorie de composés pour la prise en charge de pathologies du système nerveux central (SNC). Le premier peptide développé par le laboratoire possédant cette caractéristique est celui reprenant la séquence TM de neuropiline-1 (MTP-NRP1). Comme présenté précédemment, ce peptide inhibe l'activité pro-angiogénique du VEGF et empêche ainsi le développement tumoral de glioblastomes *in vivo* (108,116). Un second peptide, est celui conçu à partir de la séquence TM de la plexine-A1 (MTP-PlexA1). Dans les travaux de Jacob *et al.*, le laboratoire a démontré que ce peptide inhibe la dimérisation de plexine-A1 avec

ses partenaires (119). En conséquence, une inhibition du développement tumoral a été observée dans plusieurs modèles *in vivo* de glioblastome (119). La plexine-A1 n'est cependant pas impliquée uniquement dans des pathologies cancéreuses. En effet, dans la SEP elle forme un dimère avec NRP1. Le ligand de ce complexe est alors la Sema3A (120).

La SEP est une pathologie auto-immune chronique, caractérisée par des lésions inflammatoires démyélinisantes (121). Pour induire une réparation de la gaine de myéline, des précurseurs d'oligodendrocytes utilisent des signaux favorisant leur migration vers les zones lésées où ils peuvent se différencier en oligodendrocytes matures myélinisants. Cependant, d'autres signaux s'opposent à ces phénomènes, à l'image de certaines sémaphorines, dont la Sema3A (120). Dans les lésions, une surexpression de Sema3A et plexine-A1 est observée. Les travaux les plus récents du laboratoire, ont pu démontrer que l'utilisation du peptide ciblant le domaine TM de plexine-A1 (MTP-PlexA1) *in vitro* permet d'inhiber les effets de Sema3A, favorisant ainsi la migration et la différenciation des oligodendrocytes (122). De même, l'efficacité du peptide a été démontrée *in vivo*, sur deux modèles animaux de la SEP (modèle cuprizone et modèle EAE). En effet, le traitement avec le peptide (à 1µg/kg tous les trois jours) a permis de limiter les atteintes de la myéline et d'obtenir une remyélinisation efficace (122).

IV. L'implication du domaine transmembranaire dans les plateformes de récepteurs : vers de nouveaux traitements ?

L'ensemble des travaux menés sur le développement de peptides ciblant le domaine TM de récepteurs sont encourageants et au fil des années, le laboratoire d'accueil a pu acquérir une certaine expertise concernant l'utilisation de ces MTPs. Ces peptides offrent des applications variées, dont la cancérologie et les maladies de la myéline sur lesquelles le laboratoire a pu se spécialiser. Si aucun de ces peptides n'a encore à ce jour pu accéder – à notre connaissance – à des essais cliniques, cette étape devient aujourd'hui réaliste. Il apparaît cependant encore essentiel de mieux comprendre les interactions entre TM et en particulier leur implication dans la transmission des signalisations cellulaires. De plus, cibler une seule voie de signalisation pour la prise en charge d'une maladie semble souvent insuffisant. C'est dans ce contexte que nous proposons d'étudier l'implication du domaine TM dans deux plateformes de récepteurs : la plateforme NgR et la plateforme IL-10R. Pour ces deux plateformes aucune donnée n'est encore disponible sur la contribution du domaine TM dans l'oligomérisation des récepteurs. Cependant, elles sont impliquées dans le cancer et la SEP et constituent des cibles pouvant supporter et enrichir les approches déjà développées au laboratoire.

1) La plateforme du récepteur NgR dans le contexte de la sclérose en plaques

La première plateforme que nous présenterons, est celle des récepteurs des inhibiteurs associés à la myéline (MAIs). Les trois MAIs sont Nogo-A (également nommé RTN4), MAG et OMgp. Les MAIs sont impliqués dans l'inhibition de l'extension des neurites dans les neurones par une interaction avec le récepteur NgR (également nommé RTN4R). Ce dernier, ne possédant aucun domaine catalytique, doit s'associer avec d'autres co-récepteurs afin de pouvoir activer la voie de signalisation sous-jacente. Quatre co-récepteurs principaux ont été décrits : LINGO1, AMIGO3, p75NTR (également nommé NGFR et TNFRSF16) et TROY (également nommé TNFRSF19) (120). LINGO1 a été décrit dans le développement cérébral murin comme régulant la survie des neurones, la guidance axonale et la différenciation oligodendrocytaire (123–125). Pour AMIGO3, l'expression lors du développement n'est pas décrite, même si sa présence a été détectée dans le cerveau par

hybridation *in situ* (126). Dans des souris adultes, AMIGO3 est exprimé dans le cerveau, l'intestin grêle, la rate et les poumons. AMIGO3 et LINGO1 peuvent tous les deux s'associer à NgR et p75NTR ou TROY pour activer la voie de signalisation après reconnaissance d'un MAI (127). Cette voie induit l'activation de RhoA, une GTPase, active en cas de liaison à un GTP, inactive en cas de liaison à un GDP. Lorsqu'elle est active, RhoA s'oppose à la migration et différenciation oligodendrocytaires et donc à la remyélinisation (**Figure 16**) (125).

Cibler la plateforme des co-récepteurs de NgR peut être une stratégie intéressante dans un objectif de remyélinisation des lésions de SEP en inhibant l'activité de facteurs inhibant la migration et la différenciation des oligodendrocytes. Ainsi, un anticorps bloquant LINGO1 (opicinumab) a montré des effets encourageants dans le modèle murin EAE. Malheureusement, en essai clinique de phase II, l'anticorps ne permet pas d'améliorer l'état des patients (128). Une explication de cet échec est la redondance d'activation de la voie de signalisation. En effet, AMIGO3 peut se substituer à LINGO1 pour activer RhoA (127). De plus, LINGO1 semble être surexprimé plus tardivement qu'AMIGO3, notamment dans des modèles de lésions de la moelle épinière (127). Des études ont également montré dans un modèle d'épilepsie induite par l'acide kainique, que LINGO1 et AMIGO3 sont surexprimés dans la même région cérébrale, mais AMIGO3 plus fortement. De plus, inhiber AMIGO3 réduit les dommages de la myéline (129). Cibler AMIGO3 semble donc être une approche intéressante pour développer des composés en faveur de la remyélinisation. Cependant, dans la sclérose en plaques, une inflammation massive prend place aux sites de lésion. Cibler les mécanismes de remyélinisation risque d'être insuffisant pour contrecarrer la pathologie et il semble primordial d'associer un traitement régulant l'inflammation et le système immunitaire.

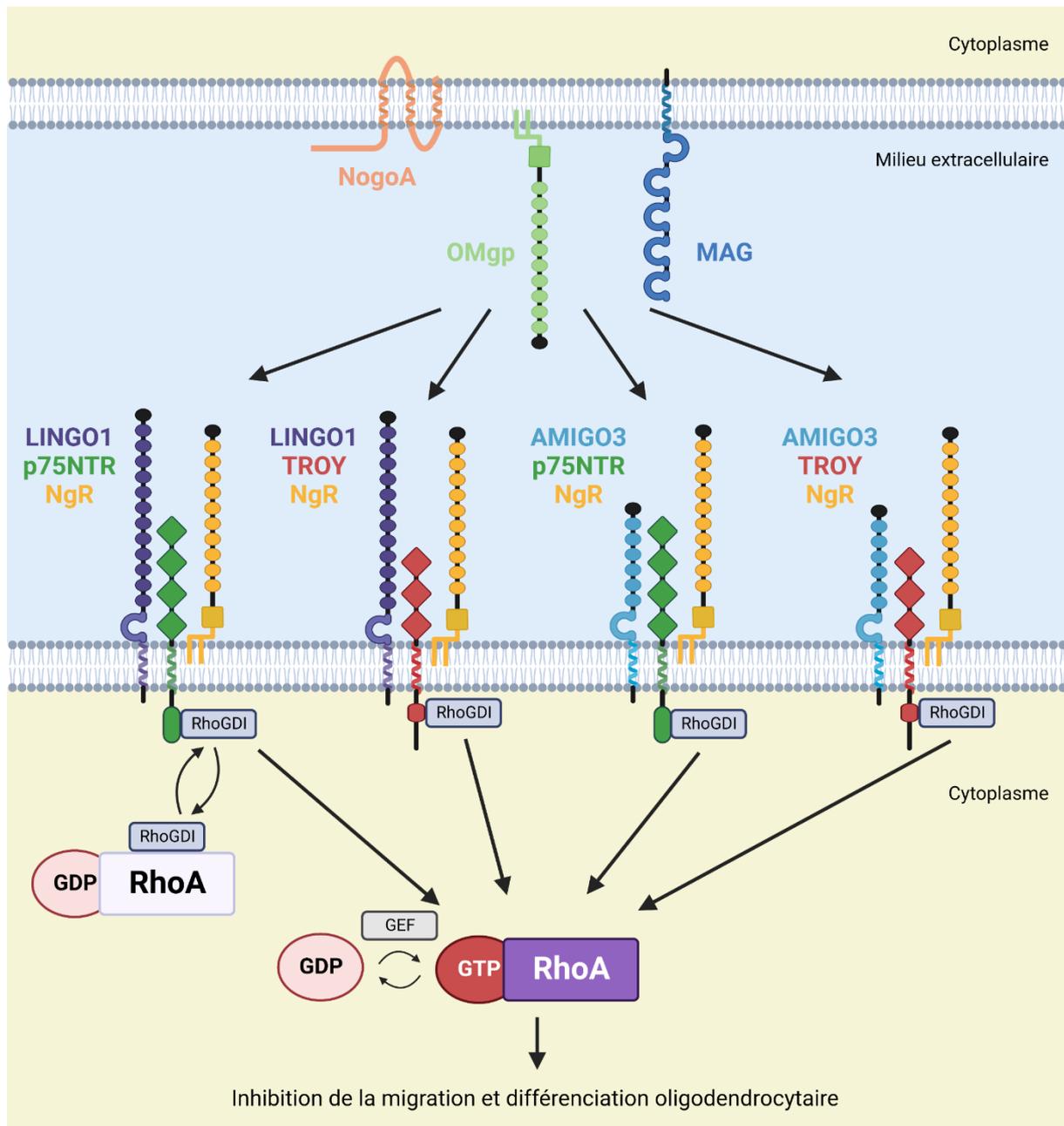


Figure 16 : La plateforme du récepteur NgR.

Les inhibiteurs associés à la myéline (NogoA, OMgp et MAG) sont reconnus par le récepteur NgR. Celui-ci étant dépourvu de domaine catalytique, il s'associe avec d'autres co-récepteurs (LINGO1, AMIGO3, p75NTR et TROY) pour activer la voie de signalisation RhoA. RhoA est activé grâce à la séquestration de RhoGDI au niveau des domaines intracellulaires de p75NTR et TROY. Une fois libéré, RhoA peut remplacer le GDP auquel il est fixé par un GTP grâce au facteur GEF, induisant son activation. L'activation de RhoA induit une inhibition la migration et la différenciation des oligodendrocytes.

(Figure réalisée sur Biorender.com.)

2) La plateforme du récepteur de l'interleukine-10 et son rôle dans la polarisation des macrophages et de la microglie

a) Le récepteur de l'interleukine-10

Parmi l'arsenal inflammatoire présent dans l'organisme, se trouve la deuxième plateforme à laquelle nous nous intéressons : la plateforme du récepteur de l'interleukine-10 (IL-10). L'IL-10 est une cytokine de la classe II, qui inclue les interférons et les cytokines de la famille IL-10, incluant elle-même l'IL-19, l'IL-20, l'IL-22, l'IL-24, l'IL-26, l'IL28A, l'IL28B et l'IL-29 (130). Le récepteur de l'interleukine-10 est constitué de deux sous-unités, l'IL-10R α et l'IL-10R β (Figure 17). La première reconnaît uniquement l'IL-10, tandis que la seconde est commune pour les récepteurs reconnaissant les cytokines IL-10, IL-22, IL-26, IL-28A, IL-28B et IL-29 (130). La sous-unité IL-10R α est la sous-unité effectrice, ayant une forte affinité pour le ligand IL-10 et qui dicte la spécificité, au vu de son expression limitée dans les cellules. La sous-unité IL-10R β quant à elle, est la sous-unité accessoire, permettant la formation des structures induisant l'activation de la voie de signalisation (130). Des recherches récentes par cryomicroscopie électronique ont permis de mieux visualiser comment l'organisation des sous-unités du récepteur se déroule. D'après ces résultats, l'IL-10, qui est sécrétée sous forme d'homodimère, est reconnue par deux sous-unités IL-10R α , ce qui induit l'hétérodimérisation de celles-ci avec des sous-unités IL-10R β . Chaque sous-unité est associée en intracellulaire à une kinase (131). IL-10R α est reliée à JAK1, alors qu'IL-10R β est reliée à TYK2. La reconnaissance du ligand induit la phosphorylation du récepteur par des kinases JAK1 et TYK2, et permet un recrutement du facteur de transcription STAT3 majoritairement (mais aussi STAT1 et STAT5 dans une moindre mesure), qui sera lui-même phosphorylé (130,132–134). Après translocation nucléaire, celui-ci induit les modifications transcriptionnelles à l'origine des effets de l'IL-10 (Figure 17).

L'IL-10 est sécrétée majoritairement par les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, les mastocytes, les cellules NK et les lymphocytes B et T, en réponse à des stimulations par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (*Pattern Recognition Receptors*, PRRs) ou des cytokines pro-inflammatoires (130,135). Le rôle prépondérant de l'IL-10 est de réguler la réponse immunitaire, via un fort effet anti-inflammatoire, en agissant sur de nombreux types cellulaires. En effet, l'IL-10 agit d'abord sur les

cellules de la lignée monocyttaire : monocytes, macrophages et cellules dendritiques. Elle inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires (comme IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN γ , GM-CSF, G-CSF, M-CSF et TNF α) et chimiokines de type CC (comme CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β et CCL5) et de type CXC (comme CXCL1, IL-8/CXCL8 et CXCL10) impliquées dans le recrutement de monocytes, cellules dendritiques, neutrophiles et lymphocytes T (132). IL-10 inhibe aussi l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II) et des signaux de costimulation (comme CD54/ICAM-1, CD80/B7 et CD86/B7.2) (132). L'IL-10 favorise également la phagocytose, mais inhibe la capacité de présentation des antigènes, en particulier sur les cellules dendritiques immatures (132). Concernant les lymphocytes B, l'IL-10 favorise leur survie, prolifération et la production d'anticorps (132,136). Enfin, l'IL-10 modifie l'activité des lymphocytes T (LT), en fonction de leur classe : pour les LT CD4⁺, l'IL-10 inhibe leur prolifération et leur fonction de sécrétion de cytokines ; pour les LT CD8⁺, l'IL-10 au contraire favorise leur recrutement, prolifération et activité cytotoxique (132,135).

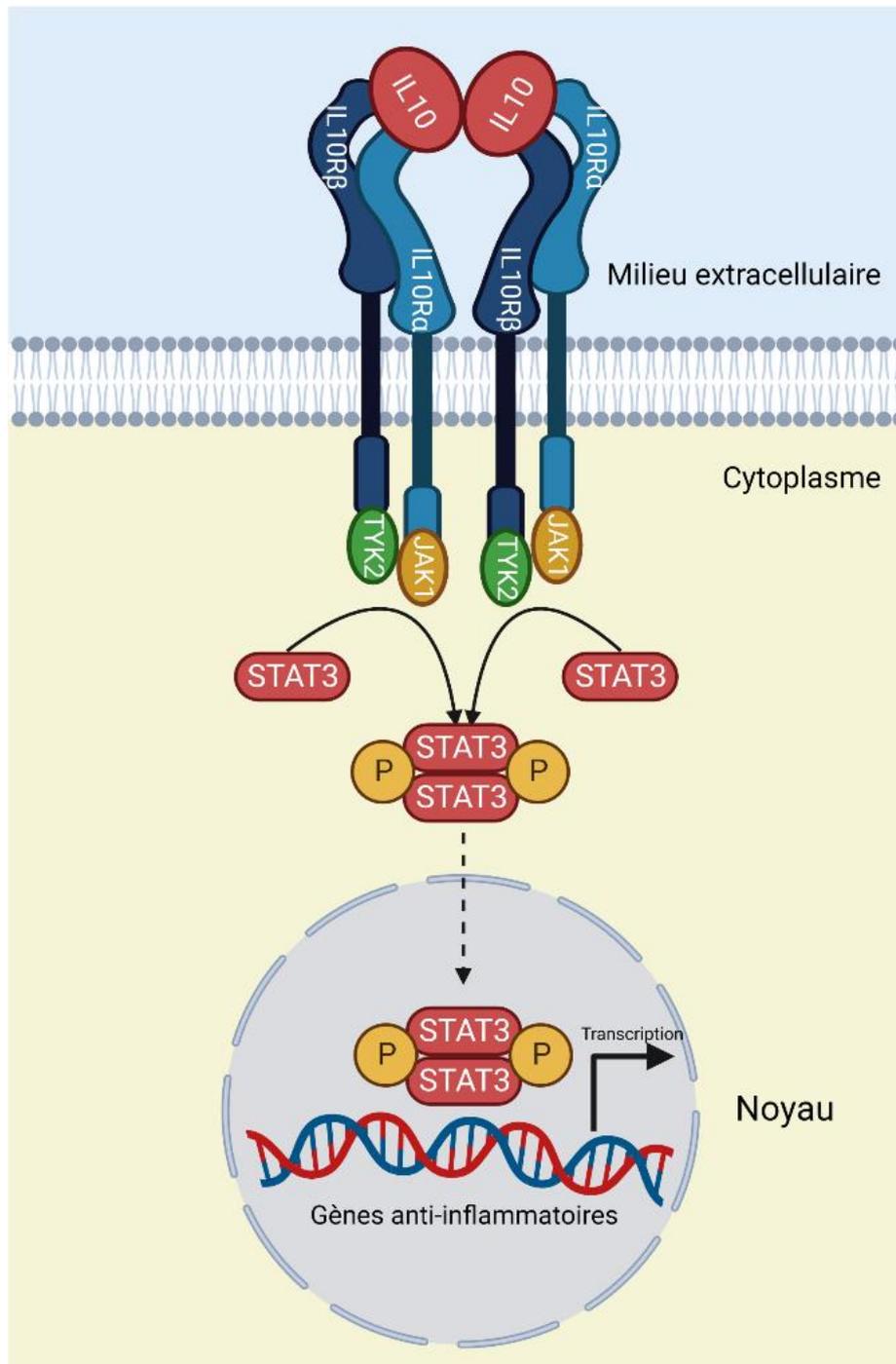


Figure 17 : La plateforme du récepteur IL-10R.

La reconnaissance d'un dimère d'IL-10 par deux sous-unités IL-10R α , induit la dimérisation de celles-ci avec deux sous-unités IL-10R β . Cette activation du récepteur induit son autophosphorylation par les kinases JAK1 et TYK2, permettant le recrutement du facteur de transcription STAT3. Après sa phosphorylation par les mêmes kinases, STAT3 homodimérise et subit une translocation nucléaire. Il induit alors la transcription de gènes anti-inflammatoires.

(Figure réalisée sur Biorender.com, adaptée de Shouval *et al.* (134).)

b) La polarisation des macrophages et de la microglie : mythe ou réalité ?

L'IL-10 impacte fortement l'activité des macrophages, mais aussi de la microglie en réduisant leurs effets pro-inflammatoires. En conséquence, l'IL-10 fait partie des cytokines jouant sur l'état d'activation de ces cellules, également appelé polarisation (137,138). Dans le cadre de cette thèse, nous avons rédigé une revue, discutant de la polarisation des macrophages et de la microglie dans deux pathologies : la SEP et le glioblastome.

Résumé 1 :

Manipuler la polarisation des macrophages/de la microglie pour traiter le glioblastome ou la sclérose en plaques.

Manipulating Macrophage/Microglia Polarization to Treat Glioblastoma or Multiple Sclerosis.

Les macrophages et la microglie sont impliqués dans plusieurs maladies et jouent des rôles divergents dans la physiopathologie. Cette divergence peut s'expliquer par leur capacité à endosser différents états de polarisation. Les extrêmes théoriques de ces états sont appelés M₁ et M₂. M₁ sont des cellules pro-inflammatoires, microbicides et cytotoxiques alors que M₂ sont des cellules anti-inflammatoires, immunorégulatrices et favorables à la progression tumorale. Dans les états pathologiques, ces polarisations sont dérégulées, ainsi la restauration des phénotypes pourrait être une approche thérapeutique intéressante pour traiter certaines pathologies. Dans cette revue, nous nous concentrerons sur les composés ciblant la polarisation des macrophages et de la microglie dans deux pathologies très distinctes : la sclérose en plaques et le glioblastome. La sclérose en plaques est une maladie inflammatoire caractérisée par la démyélinisation et la dégradation des axones. Dans ce cas, les macrophages et la microglie adoptent un phénotype de type M₁, induisant une inflammation. Promouvoir la polarisation opposée de type M₂ pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante. Le glioblastome est une tumeur du cerveau dans laquelle les macrophages et la microglie facilitent la progression, la propagation et l'angiogenèse de la tumeur. Ils font partie des macrophages associés à la tumeur (TAMs) qui adoptent un phénotype anti-inflammatoire, inhibant ainsi l'immunité anti-tumorale. Leur réactivation pourrait être une méthode pour limiter et réduire la progression tumorale. Ces deux pathologies seront utilisées pour illustrer que le ciblage de la polarisation des macrophages et de la microglie est une approche prometteuse avec un large spectre d'applications méritant plus d'attention.

Review

Manipulating Macrophage/Microglia Polarization to Treat Glioblastoma or Multiple Sclerosis

Thomas Kuntzel ¹  and Dominique Bagnard ^{1,2,*} 

¹ UMR7242 Biotechnology and Cell Signaling, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg Drug Discovery and Development Institute (IMS), University of Strasbourg, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France; t.kuntzel@unistra.fr

² Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France

* Correspondence: bagnard@unistra.fr

Abstract: Macrophages and microglia are implicated in several diseases with divergent roles in physiopathology. This discrepancy can be explained by their capacity to endorse different polarization states. Theoretical extremes of these states are called M1 and M2. M1 are pro-inflammatory, microbicidal, and cytotoxic whereas M2 are anti-inflammatory, immunoregulatory cells in favor of tumor progression. In pathological states, these polarizations are dysregulated, thus restoring phenotypes could be an interesting treatment approach against diseases. In this review, we will focus on compounds targeting macrophages and microglia polarization in two very distinctive pathologies: multiple sclerosis and glioblastoma. Multiple sclerosis is an inflammatory disease characterized by demyelination and axon degradation. In this case, macrophages and microglia endorse a M1-like phenotype inducing inflammation. Promoting the opposite M2-like polarization could be an interesting treatment strategy. Glioblastoma is a brain tumor in which macrophages and microglia facilitate tumor progression, spreading, and angiogenesis. They are part of the tumor associated macrophages displaying an anti-inflammatory phenotype, thereby inhibiting anti-tumoral immunity. Re-activating them could be a method to limit and reduce tumor progression. These two pathologies will be used to exemplify that targeting the polarization of macrophages and microglia is a promising approach with a broad spectrum of applications deserving more attention.

Keywords: macrophage; microglia; glioblastoma; multiple sclerosis; polarization; treatments; therapeutic



Citation: Kuntzel, T.; Bagnard, D. Manipulating Macrophage/Microglia Polarization to Treat Glioblastoma or Multiple Sclerosis. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 344. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020344>

Academic Editor:

Katharina Zimmermann

Received: 30 November 2021

Accepted: 28 January 2022

Published: 1 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Macrophages are an important cellular component of the innate immune system and more precisely, a part of the mononuclear phagocytic system. They differentiate from monocytes after entering the tissues. Depending on the tissue, they will have different names such as microglial cells corresponding to the resident macrophages in the central nervous system (CNS). The macrophages can be resident or motile [1]. Concerning the origin of these cells, the first point of view is that all macrophages originate from the circulating monocytes, meaning that they derive from hematopoiesis. However, the newest consensus is that macrophages can directly originate from embryonic precursor cells that have colonized developing tissues before birth [2]. One example is the microglia, which come from the yolk sac [1]. The different populations of macrophages and their origins are presented in Figure 1. Regarding the roles of the macrophages, they perform phagocytosis, but they also have the function of antigen presenting cells (APCs) and they produce and secrete cytokines. Macrophages perform several roles after activation. There are different forms of activation corresponding to the different states of polarization: the classically activated macrophages or M1 macrophages, and the alternatively activated macrophages or M2 macrophages. Each state of polarization has different implications in the roles the macrophages exert. In M1 polarization, they mainly have pro-inflammatory and antitumor effects whereas

in M2 polarization, the macrophages essentially have anti-inflammatory functions [2,3]. These opposite functions have different implications in several diseases, and they constitute potential therapeutic targets. Among them, glioblastoma and multiple sclerosis represent two examples to discuss to what extent manipulating macrophage/microglia polarization may represent an interesting therapeutic approach.

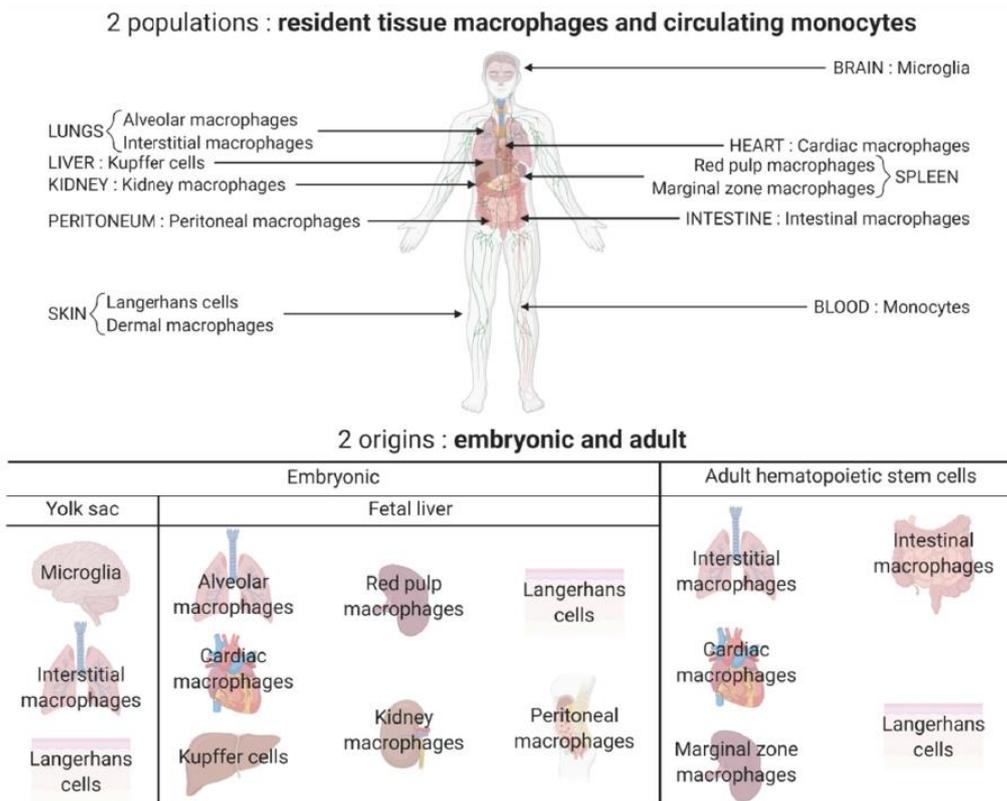


Figure 1. Different populations and origins of macrophages. Two major populations of macrophages coexist in the body: the macrophages that reside and self-renew in the tissues and the ones differentiated from the monocytes circulating in the blood and originating from the hematopoietic stem cells. Most tissue resident macrophages have an embryonic origin and arise either from the yolk sac (for example microglia in the brain) or directly from the fetal liver (for example, Kupffer cells in the liver and kidney macrophages). Some tissue resident macrophages are peripherally derived such as intestinal macrophages. All these tissue resident macrophages constitute a heterogeneous population with tissue-specific functions.

Glioblastoma (GBM) is a malignant brain tumor with a very low survival rate (one year survival ~35%) [4]. It is characterized by a high capacity of invasion, allowing the tumor to infiltrate nearby tissues. The standard of care treatment consists of surgical resection, if possible, combined with radiotherapy and temozolomide, an alkylating agent, but the prognosis remains poor [4]. Bevacizumab, an anti-VEGF antibody, initially seen as an interesting alternative showed limited efficacy and tolerance. New therapeutic possibilities are necessary to increase the patient’s survival rate and quality of life [4]. One approach is to target the tumor associated macrophages (TAMs). TAMs are peripheral macrophages or brain-intrinsic microglial cells recruited by the tumor to support its survival, growth, and migration. Interestingly, these macrophages are mostly in M2 polarization. This means that it is possible to rebalance the polarization state toward M1 in order to obtain pro-

inflammatory and anti-tumor macrophages [5]. However, in inflammatory pathologies such as multiple sclerosis (MS), having only M1 polarized macrophages is associated with a deterioration of the disease. MS is the most frequent autoimmune chronic inflammatory disease of the CNS. It is characterized by the appearance of lesions where demyelination, inflammation, and glial reaction are observed. The classical course of the pathology, also called relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS), is punctuated by episodes of neurologic disability called relapses, which are fully or partially reversible. After 10–20 years, the disease becomes progressive, without recovery periods. About 15% of the patients have a progressive course from onset. Although there are many disease modifying medications that reduce the frequency and severity of relapse, there is no cure for the disease and no medication that prevents or reverses the progressive state [6]. An approach targeting the macrophages/microglia is also relevant for this disease. In fact, the M2 polarized cells are involved in remyelination processes, however, in MS, the macrophages/microglia are mostly in M1 polarization in favor of inflammation [3]. Some medications already on the market target the polarization state, but more are needed to expect effects on the progressive state of the pathology.

Thus, the aim of this review is to discuss the different therapeutic possibilities for the balancing of the polarization of macrophages and microglial cells. The focus will be the treatment of glioblastoma and multiple sclerosis being two archetypic diseases for which this option is becoming realistic. Some of these therapeutic agents are already on the market whereas others are in preclinical or clinical development.

2. The Different Polarization States of Macrophages

The concept of different macrophage activation states has existed since the nineties and in 2000, Mills et al. first termed these activation states as M1 and M2 [7]. Nonetheless, they immediately showed that assuming there are only two types of polarization is an oversimplification [7]. Indeed, M1 and M2 are the extremities of a continuum of phenotypes and possess an important plasticity. M1 polarization corresponds to a pro-inflammatory activity while M2 polarization reflects an anti-inflammatory role. There is a balance between both extremities and an imbalance can lead to pathological states. Mantovani et al. further described this plasticity by showing that the polarized macrophages differed in terms of receptor expression, effector function, and cytokine/chemokine production, depending on which extremity of the continuum the macrophages are in [8]. The polarization is also a dynamic process in so far as it can occur at any point during the inflammation, depending on the tissue microenvironment [9]. The polarization of macrophages can be regulated through three different ways: extrinsic pathways, intrinsic pathways, and the tissue microenvironment. The extrinsic pathways are the methods used *in vitro* with cultured macrophages by stimulating them with M1 or M2 polarizing agents. Intrinsic pathways and the tissue microenvironment are all agents secreted by the body, which influence the type of macrophage population and their polarization. Depending on all these agents, the macrophages will be more or less in a M1-like or a M2-like polarized state [9]. The polarization states of macrophages are summarized in Figure 2.

2.1. The M1 Polarization

Classical activation of macrophages corresponds to M1 polarization. When the macrophages shift toward this polarization, they have an enhanced capacity of secretion of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-15, IL-23, and IL-1 β , their antigen presenting capacity is amplified, their production of reactive nitrogen and oxygen intermediates is augmented and their release of IL-12—in favor of Th1 polarization of CD4+ cells—is also increased. Thus, M1-like macrophages are effector cells, exerting microbicidal and cytotoxic activities [10].

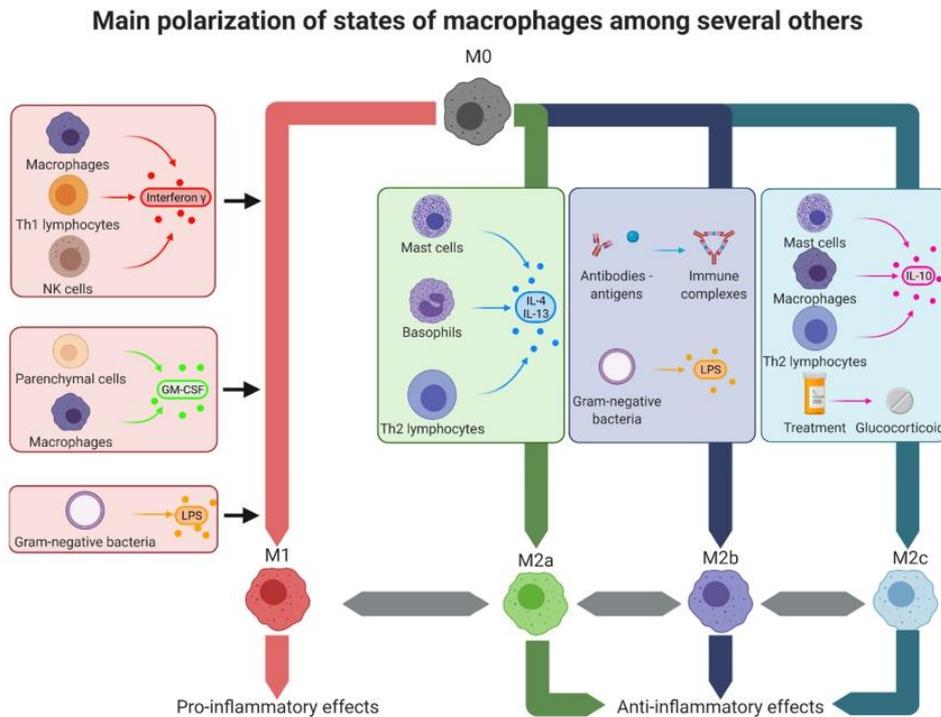


Figure 2. Macrophage polarization states. In the tissues, macrophages can adopt several polarization types corresponding to different activation states. The theoretical extremes of these states are, on one hand, the M1-like macrophages with pro-inflammatory effects, and on the other hand, the M2-like macrophages with anti-inflammatory effects. M1-like macrophages can be obtained by stimulation with interferon- γ , secreted by other M1-like macrophages, Th1 lymphocytes, and NK cells; GM-CSF secreted by M1-like macrophages and parenchymal cells or LPS present on Gram-negative bacteria. M2a alternatively activated macrophages were obtained by stimulation with IL-4 and IL-13 secreted by mast cells, basophils, and Th2 lymphocytes. M2b type II macrophages were obtained after stimulation with immune complexes or LPS. Finally, M2c deactivated macrophages were obtained by stimulation with IL-10 secreted by mast cells, M2-like macrophages, and Th2 lymphocytes or after treatment with glucocorticoids such as dexamethasone. GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, IL: interleukin, LPS: lipopolysaccharide, Th: T helper.

The induction of polarization depends on specific stimuli and for M1-like induction, three major stimuli are described: IFN- γ (interferon- γ), pathogens, and GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor). IFN- γ is the main M1 stimuli, produced by Th1 cells, NK cells, and macrophages. IFN- γ activates, through its receptor IFNGR, STAT1, which induces gene expression for cytokine receptors (e.g., IL15R α , IL6R), cell activation markers (e.g., CD36, CD38, CD69, and CD97), and cell adhesion molecules (e.g., intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1), integrin alpha L (ITGAL), and mucin 1). Pathogens induce the “innate” activation of macrophages through pattern recognition receptors (PRRs). The best-studied example is lipopolysaccharide (LPS), found at the bacterial outer membrane of Gram-negative bacteria, which is recognized by Toll-like receptor 4 (TLR-4). This activation causes the secretion of pro-inflammatory cytokines (e.g., IFN- β , TNF, IL-6, IL-12, and IL-1 β), chemokines (e.g., CCL2, CXCL10), and antigen presentation molecules (e.g., MHC members and co-stimulatory molecules). Finally GM-CSF, produced among others by parenchyma cells and macrophages, enhances, after recognition by its receptor, antigen presentation, phagocytosis, microbicidal capacity, leukocyte chemotaxis and adhesion, and cytokine production (e.g., TNF, IL-6, IL-1 β , G-CSF, and M-CSF) [11].

2.2. The M2 Polarization

Alternatively activated macrophages, or M2 macrophages, correspond to the other extremity of the polarization continuum. These macrophages exert different and sometimes opposite functions such as M1-like macrophages. Indeed, M2-like macrophages prevent the expansion of parasites, perform remodeling and repair of damaged tissue, have immunoregulatory effects, control inflammation, and are in favor of tumor progression by inhibiting the anti-tumoral immunity, promoting tumor survival, and facilitating angiogenesis [1,10,12]. However, the vision of one M2 polarization is oversimplified. Mantovani et al. already showed in 2004 that there were at least three different M2-like states: M2a, M2b, and M2c [13]. M2a, also called alternatively activated macrophages, are induced by IL-4 and IL-13, which are secreted by mast cells, Th2 cells, and basophiles. These cytokines activate STAT6 through the IL-4 receptor. M2a macrophages are also induced by helminth and fungal infections. The resulting effects observed are a decrease in the secretion of pro-inflammatory cytokines (e.g., TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-12, and IL-1 β) and the expression of proteins involved in tissue repair and fibrogenesis [10,14]. M2b or type II macrophages are activated by immune complexes (ICs), TLR agonists such as LPS or IL-1R agonists. Their activation leads to the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β) and anti-inflammatory cytokines (IL-10) and to the loss of IL-12 secretion. They have roles in Th2 activation, in upregulating antigen presentation, and in immunoregulation [11,15]. M2c macrophages, also called deactivated macrophages, are induced by IL-10, glucocorticoids, and TGF- β . They possess strong anti-inflammatory properties and promote phagocytosis of apoptotic cells [15]. A fourth state of polarization has been described in vitro: M2d macrophages, induced by TLR agonists through the adenosine receptor, lead to the loss of secretion of pro-inflammatory cytokines, the induction of the production of anti-inflammatory cytokines and vascular endothelial growth factor (VEGF). Hence, these macrophages have proangiogenic properties and exhibit attributes of TAMs [15].

2.3. The New Concepts about “Polarization”

In these last years, the concept of M1/M2 polarization has become more and more controversial. The concept fits well with the situation in vitro, but these models are unable to mimic the profiles observed in vivo for pathological situations. Moreover, macrophages have the capacity to develop mixed M1/M2 phenotypes, and even if there are differences between both polarizations, there are also similarities and both populations often coexist. This means that rather than focusing only on the study of entire populations of cells, a single-cell analysis could be more relevant [11,16,17]. The M1/M2 model is not adapted for the analysis of macrophages coming from specific tissues and/or from pathological conditions. Single cell RNA sequencing of macrophages shows the coexistence of many different signatures. These signatures correspond to different tissue- and disease-specific activation states and different times of activation process. Quantifying the expression for each cell of a large subset of genes associated with M1-like or M2-like states and a large subset of genes associated with early or late differentiation, is the possibility to refine the activation state of macrophages [17,18]. Notwithstanding, the single-cell RNA sequencing is more in favor of the point of view that “every macrophage is unique” [19]. Finally, it seems to be more interesting to classify the macrophages according to their function: pro-inflammatory or anti-inflammatory and for host defense, wound healing, or immune regulation [20].

The macrophages, through these functions, are of special interest for plenty of diseases and they constitute an interesting target for new therapeutics. Therefore, we will focus on two pathologies of the CNS where macrophages/microglia have different and somehow opposite roles: multiple sclerosis and glioblastoma. In MS, an exacerbation of inflammation is responsible for the lesions whereas in GBM, a hindrance of the anti-tumoral inflammatory mechanisms favors tumoral proliferation and spreading. In MS, macrophages/microglia, polarized in a M1-like phenotype have deleterious effects on the myelin sheath (Figure 3A). In GBM, polarized in a M2-like phenotype, they help the tumor

cells to proliferate (Figure 3B). Re-educating these macrophages/microglia could be an interesting therapeutic option, and finally, targeting the same cells, but in an opposing way is possible for two antipodal diseases.

2 pathologies for 2 effects of microglia/macrophages

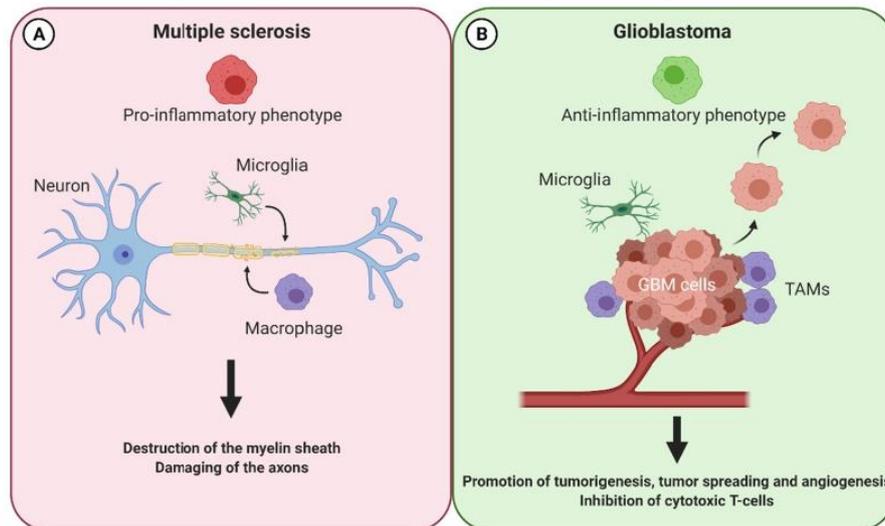


Figure 3. Macrophages have opposing effects in two pathologies of the central nervous system: multiple sclerosis and glioblastoma. In multiple sclerosis (A), macrophages exert a M1-like phenotype and thereby attack and destroy the myelin sheath and damage the axons in the CNS. In glioblastoma (B), these cells adopt the opposite M2-like phenotype favoring an anti-inflammatory milieu. Consequently, tumorigenesis, tumor-spreading, and angiogenesis is promoted whereas cytotoxic T-cells are inhibited. CNS: central nervous system, TAMs: tumor associated macrophages.

3. Macrophages/Microglia in MS

3.1. The M1-M2 Balance Consequences on Multiple Sclerosis

Microglia and macrophages are implicated in the pathophysiology of multiple sclerosis. On one hand, they lead to the destruction of the myelin sheath and the damage of axons by secreting pro-inflammatory cytokines, presenting antigens, and inducing oxidative stress; on the other hand, they promote remyelination, tissue repair, resolve inflammation, and perform phagocytosis of myelin debris. These contrasting effects are thought to correspond to the two major polarization states: M1-like and M2-like, respectively [3,21,22]. In fact, as discussed above, in vivo, the situation is much more complicated: the cells are able to express M1 markers as well as M2 markers simultaneously. The polarization state depends a lot on environmental signals, the length, and the combination of stimuli. It shows once more the plasticity of macrophages and microglial cells, changing from a pro-inflammatory polarization state during the acute phase of the disease, to an anti-inflammatory state during the recovery phase, but also the capacity to stay in an intermediary state between both phenotypes [3,16,22]. Interestingly, in chronic active lesions, M2 markers are lacking: they disappear when an active lesion evolves from an acute to a progressive one [16]. Targeting the imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory functions of macrophages/microglia is a possible treatment option to restore polarization in favor of remyelination.

3.2. Treatments Influencing Polarization for MS Care Already on the Market

An important number of treatments indicated for MS care already exist and are on the market. Among these, some have been shown to indirectly target macrophage and microglia polarization. They are part of two different groups of compounds. The first group

is composed of proteins and peptides including interferon β and glatiramer acetate. The second group consists of small molecules including dimethylfumarate, fingolimod/siponimod, and glucocorticoids.

3.2.1. Proteins/Peptides

Interferon β is a first line background treatment for multiple sclerosis with diverse mechanisms of action. It is an anti-inflammatory cytokine that acts by increasing the production of other anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and IL-4 by decreasing the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-12 and IL-17 by limiting the leukocyte migration across the blood–brain barrier (BBB) and by promoting the production of nerve growth factor (NGF) in favor of neuronal survival and repair [23]. Concerning macrophages and microglia, the modifications of the expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines directly affect their polarization state toward a M2-like phenotype. In MS patients treated with IFN- β , it was observed that the antigen presenting ability and the migration capacity of these cells was diminished and that inhibitory immune checkpoints (in particular B7-H1) were activated [24].

Glatiramer acetate is also a first line background treatment for relapsing-remitting multiple sclerosis. It is a random basic copolymer of four natural occurring amino acids: glutamic acid, lysine, alanine, and tyrosine. Its mechanism of action involves the generation of Th2 and Treg regulatory and anti-inflammatory lymphocytes, but also the induction of regulatory, anti-inflammatory, M2-like macrophages, and microglia [24]. These polarization shifts are accompanied by a diminished secretion of pro-inflammatory cytokines (e.g., TNF α and IL-12) and an augmented secretion of anti-inflammatory cytokines (IL-10 and TGF- β). The drug is also able to induce the phagocytic activity of macrophages and microglia in rats and humans, which allows for the clearance of myelin debris in favor of remyelination [24,25]. Through the APC role of macrophages, it is hypothesized that they are responsible for the amplification of Th2 cells, meaning that for this drug, macrophages and their anti-inflammatory polarization have a central duty [26].

3.2.2. Small Molecules

Dimethylfumarate is also indicated for the background treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. Originally a treatment for psoriasis through the induction of a shift from a Th1 response to a Th2 response, the drug also induces the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 by lymphocytes, but also by macrophages and microglia. Moreover, it inhibits the expression of pro-inflammatory cytokines (e.g., TNF α , IL-1- β , and IL-6) by macrophages and microglia, thus promoting a M2-like phenotype [24,25,27,28].

Fingolimod is a modulator of the sphingosine-1-phosphate receptors indicated in the second line for background treatment of very active forms of multiple sclerosis. Fingolimod treatment leads to the inhibition of the egress of lymphocytes from lymphoid tissues into the circulation, thus preventing their trafficking toward the CNS. Interestingly, macrophages and microglia also express this receptor. It has been shown in human and animal models that fingolimod is able to prevent the activation of an inflammatory phenotype of these cells [24,25,29]. Fingolimod is able to modulate macrophage and microglia activation by lowering their pro-inflammatory cytokine production (e.g., TNF α), thus protecting oligodendrocytes from death and favoring the remyelination process. This mechanism corresponds to a changing of the polarization of macrophages and microglia toward a M2-like phenotype [29–31]. Another modulator of the sphingosine-1-phosphate receptors is the fingolimod-derived compound siponimod. Siponimod is selective for S1P1 and S1P5 receptors, and lowers the risk of adverse cardiac events mediated through the S1P3 receptor subtype [32]. This molecule protects against neurodegeneration by limiting inflammation and the recruitment of immune cells and by preventing neuronal loss. This neuroprotection is partly mediated through the interaction of siponimod with microglia, leading to an inhibition of the secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and CCL5), thereby re-educating them toward an anti-inflammatory phenotype [32–34].

Glucocorticoids are indicated for the treatment of acute relapses of MS, particularly high doses of methylprednisolone. These drugs target glucocorticoid receptors and exert their activity mainly by inhibiting T cell activation and promoting their apoptosis, but also by inhibiting the secretion of pro-inflammatory cytokines and by improving the integrity of the BBB, thus preventing the infiltration of immune cells. These effects also affect monocytes and macrophages by preventing their secretion of pro-inflammatory cytokines (like TNF- α , IL-6 and IFN- γ) and by promoting an anti-inflammatory M2-like polarization while increasing their chemotaxis. This is in favor of the resolution of the inflammation, but also for reparation and remyelination. It was noted that these effects were observed *in vitro* on monocytes from MS patients treated with glucocorticoids [24,35].

3.3. Compounds Influencing Polarization for MS Care: New Perspectives

All the drugs presented above are already on the market and have an authorization for the treatment of multiple sclerosis. Most of the drugs indicated for this pathology show effects on the polarization of macrophages and/or microglia. However, therapeutics specifically targeting these cells are lacking despite their important role in pathophysiology. We now present some drugs under development targeting macrophages, microglia, and their polarization. Two major groups of compounds are being investigated: small molecules with a synthetic origin and natural occurring compounds directly extracted from their natural source. All these compounds are immunomodulators without a unique molecular target.

3.3.1. Synthetic Small Molecules

Lenalidomide is an FDA approved drug derived from thalidomide for the treatment of myelodysplastic syndromes and multiple myeloma. However, it has been shown *in vitro* that lenalidomide possesses repolarizing effects on macrophages. In fact, the drug can skew macrophages toward a M2-like phenotype. This was observed because an upregulation of M2 markers (Arg1, Mrc1) and an increase of the secretion of anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL10, IL-13 and TGF- β) could be detected. Interestingly, lenalidomide does not inhibit the LPS-induced M1-like polarization, meaning that the macrophages express both M1 and M2 markers. Nonetheless, lenalidomide was also tested *in vivo* on the mice model of MS: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), obtained after exposure of the animals to myelin antigens (here a MOG-EAE model). Results show that the effect on macrophages is enough to alter their capacity to activate autoimmune CD4 T cells and to alleviate the symptoms of the disease [36].

Ethyl pyruvate is an analogue of the EMA- and FDA-approved drug dimethylfumarate. Its effect on macrophages/microglia is an inhibition of their secretion of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6) and an inhibition of their antigen presentation capacity [37,38].

Another example is the immunomodulatory molecule laquinimod. The activity of this compound is mediated through the promotion of regulatory T cells, but also the decrease in activation of microglia and the inhibition of the recruitment of macrophages in the CNS [39–41]. Interestingly, laquinimod has already been tested in humans in phase II as well as phase III studies, which showed effects in reducing brain atrophy and limiting disability worsening. Moreover, the orally administered compound seems to be safe and well tolerated [42,43].

A last example is minocycline, an antibiotic of the tetracycline family, which shows neuroprotective effects in RRMS [44]. Its activity is mediated by the inhibition of T-cell migration and activation, but also by the inhibition of the proliferation and M1-like activation of macrophages and microglia by limiting the secretion of pro-inflammatory cytokines (TNF- α) and promoting the secretion of the anti-inflammatory ones (IL-10). An attenuation of the clinical course of EAE has been observed [45–47]. Minocycline has also been tested for its efficacy on humans and it seems to lower the risk of conversion from a clinically isolated syndrome to MS at six months but not at 24 months [48,49]. Another clinical trial assessing the effect of the combination of minocycline and interferon β -1a for RRMS showed no

beneficial effect [50]. More studies are needed to better understand the mechanism of action of minocycline.

3.3.2. Natural Occurring Compounds

An important number of natural occurring molecules have been tested for their repercussions on macrophage and/or microglia polarization. These have been reviewed extensively in [51–53]. Most of these compounds do not target only macrophages/microglia and their polarization. However, we provide some examples of compounds that have been tested for their ability to influence polarization toward an anti-inflammatory phenotype in multiple sclerosis models.

The first example is spermidine, a polyamine found in most organisms. It is biosynthesized from putrescine, which is obtained in the body from the amino-acid ornithine. Spermidine has been shown in vitro to inhibit pro-inflammatory cytokine secretion by LPS-stimulated microglia. It inhibits the expression of iNOS and COX-2, two major pro-inflammatory enzymes and decreases the secretion of NO, PGE₂, IL-6, and TNF- α at the transcriptional level. These effects seem to be mediated through the inhibition of the NF- κ B, PI3K/Akt, and MAPK signaling pathways [54]. Spermidine has also been tested for effects in vivo with the EAE model. After treatment with spermidine, the mice showed decreased EAE clinical scores and the severity of the disease was diminished in both preventive and curative treatment schemes. These repercussions are mediated through macrophages because spermidine is able to inhibit their pro-inflammatory polarization by diminishing the secretion of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-12, and TNF- α and by decreasing their antigen-presentation to lymphocyte capacity. As a consequence, less T-cells are activated and the EAE severity is weaker [55,56]. To our knowledge, no clinical trial has been conducted to assess the effect of spermidine intake on multiple sclerosis.

Resveratrol is a stilbene found in berries, grapes, and nuts. It is one of the most studied natural compounds in multiple sclerosis. Most of the studies agree on the protecting effect of resveratrol in the EAE model. Its administration reduces the severity of the disease in mice and favors remyelination. The activity is mediated through the inhibition of secretion of pro-inflammatory cytokines by macrophages (e.g., IL-6 and TNF- α), but also by promoting the activation of regulatory T cells (TH17) [57–60]. Nevertheless, one study by Sato et al. showed surprising results because resveratrol was responsible for an exacerbation of EAE disease in mice [61]. These counterintuitive results show that it is difficult to work with natural compounds as plants display an important variability in their composition and have a wide scope of different targets, thus the determination of the real effect is challenging.

Another well studied compound is curcumin, a polyphenol extracted from the rhizomes of *Curcuma longa* L. This compound has been shown to ameliorate EAE. There are various mechanisms of action implicated in this neuroprotective effect, but curcumin also regulates microglia activation through limiting its secretion of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-12) as well as monocyte activation by inhibiting their infiltration in the CNS [62–66]. Interestingly, two clinical trials have been conducted to assess the effect of curcumin on MS patients (NCT03150966 and NCT01514370). One shows a neuroprotective effect of curcumin by limiting the inflammation of the CNS in MS patients [67].

Forskolin found in the Indian Coleus, *Plectranthus barbatus* Andrews, is often used as a food supplement or traditional oriental medicine. The effect of forskolin has been tested on the EAE model. The substance presents an anti-inflammatory action on extracted macrophages and microglia: M2-like markers are upregulated (e.g., Arg1 and Mrc1) whereas M1-like markers are downregulated (e.g., CD86 and MHC class II). These effects are mediated through the activation of cAMP and the ERK signaling pathway. Consequently, the proliferation of autoimmune CD4 T cells decreases and finally the neuroinflammation caused by the disease decreases and the recovery phase is promoted [68].

4. Macrophages/Microglia in GBM

4.1. TAMs and M1-M2 Balance

Glioblastoma are the most frequent type of gliomas, but also one of the most aggressive. They are characterized by a very important mitotic activity, high vascular proliferation, and necrosis. Glioblastomas are highly invasive and infiltrate the surrounding tissues, although they do not metastasize [4]. These tumors are also characterized by their high capacity to evade the immune system [69]. Macrophages and microglia have a leading role in this immune evasion capacity and represent the majority of non-neoplastic cells of the tumor microenvironment. These macrophages and microglia possess a specific M2-like polarization and are called tumor associated macrophages or TAMs [5,8,70]. TAMs are in favor of GBM tumorigenesis because they do not support cytotoxic T cell activation and even inhibit their proliferation, as they secrete anti-inflammatory cytokines (e.g., IL-10 and TGF- β) and growth factors (e.g., EGF), thus promoting development and angiogenesis of the tumor [5,69,71,72]. This system is a vicious circle because TAMs are promoted by the tumor itself, which secretes various factors such as IL-6, IL-10, TGF- β , and PGE₂, and in return, TAMs promote the tumor's proliferation and survival [12,69]. A solution to break this circle would be to inhibit the anti-inflammatory phenotype of TAMs and promote a repolarization toward an inflammatory phenotype [72].

4.2. Treatments Influencing Polarization for GBM Care

Targeting TAMs in glioblastoma is an interesting alternative, knowing the fact that they represent up to 30% of the cells constituting the tumor bulk [5]. Contrary to that of MS, no treatment on the market for GBM is currently targeting macrophage/microglia polarization. Thus, some compounds studied for their effect in this field will be reviewed here. These compounds are either small molecules, antibodies, or nucleotides that target five major signaling pathways: CSF1 and its receptor, CD47, CD40, TLRs, and STAT.

4.2.1. Colony Stimulating Factor 1 and Its Receptor

The first and most studied target is colony stimulating factor 1 (CSF1) and its receptor (CSF1R, also called CD115). CSF1R is a tyrosine-kinase receptor activated by the binding of the ligand CSF1, followed by homodimerization of the receptor. This signaling pathway is implicated in the differentiation of monocytes into M2-like, anti-inflammatory macrophages. Thus, inhibiting the activation of the receptor by targeting the ligand or the receptor is an interesting opportunity [73–75]. An important number of compounds were designed, tested in vitro, in vivo, and even clinically. All of these are small molecules or antibodies [74]. The most studied among them is a small molecule inhibitor called pexidartinib (or PLX3397), which can be taken orally and is able to cross the BBB. It showed interesting results in vitro and in mice by blocking glioblastoma progression, proliferation, and evasion [76,77]. Unfortunately, a clinical trial conducted on 37 patients with recurrent glioblastomas showed no effect of the molecule. However, pexidartinib has a good safety profile, is well tolerated by the patients, and is able to reach the tumor tissue [78]. The lack of effects of the treatment alone does not mean that it is not reaching the target or influencing it. An interesting option is to assess the effects of pexidartinib in combination with other known treatments. An enhancement of the efficacy has been shown in vivo on tumor bearing mice by combining PLX3397 and other antiangiogenic tyrosine-kinase inhibitors (dovitinib or vatalanib). An inhibition of tumor cell proliferation and an increase in tumor-cell apoptosis as well as a downregulation of M2 markers in TAMs compared to PLX3397 given alone has been observed [76]. A clinical trial has been conducted to assess the efficacy of the combination of pexidartinib, radiotherapy, and temozolomide (NCT01790503), but the results are not available at this moment [79].

Another well studied molecule is BLZ945, which is also a brain penetrating tyrosine-kinase inhibitor with a strong affinity for CSF1R. This compound is able to inhibit growth, progression, and survival of glioblastoma tumor cells in vivo by “re-educating” the TAMs and increasing phagocytosis of tumor cells. In fact, BLZ945 induces a downregulation of M2

markers in TAMs rather than depleting them [80]. However, Quail and colleagues showed that although BLZ945 strongly induces tumor regression in mice, after a few weeks of treatment, a resistance to the compound appeared and the tumor rebounded. This resistance is mediated through the TAMs. They compensate CSF1R inhibition by upregulating the IGF-1/IGF-1R axis and the PI3K signaling pathway, which are in favor of tumor growth and malignancy. A M2-like pro-tumorigenic phenotype is restored via the upregulation of M2 markers (TGF- β , IL4 and CD206). To avoid this resistance, combinational therapy is needed by combining BLZ645 with inhibitors of the resistance pathways (e.g., IGF-1R inhibitors) [81]. Further studies are needed to assess the effects of BLZ945 in association with other compounds and for the moment, no clinical trial has been conducted for its effect on GBM.

4.2.2. CD47

Another possibility is to target CD47 and inhibit its activation. CD47 is an integrin also called the “don’t eat me” signal found on tumor cells, which inhibits their phagocytosis by macrophages after the binding of CD47 and SIRP α (signal-regulatory protein α) found on macrophages. Inhibition of this axis leads to the induction of phagocytosis of the tumor cells by M1-like and M2-like macrophages. This induction is much more important in M1-like macrophages. Furthermore, the inhibition of the axis also leads to the re-polarization of TAMs from a M2-like to a M1-like phenotype. Inhibition of this axis is obtained by the use of anti-CD47 antibodies. Hu5F9-G4, a monoclonal humanized antibody showed anti-tumor effects on murine and human glioblastoma cell lines and in vivo on grafted mice [82]. Another antibody targeting CD47 has been used after surgical resection of GBM in rats and extended survival of the animals and retarded relapse of the tumor has been observed [83]. A last anti-CD47 antibody has been tested on glioma stem cells: it is also effective to induce phagocytosis of these cells in vitro and in vivo, thereby limiting tumor growth [84].

4.2.3. CD40

The next target is CD40, a costimulatory molecule, member of the tumor-necrosis factor receptor family that is expressed on the surface of immune cells (B cells, dendritic cells, and macrophages), non-immune cells (endothelial and epithelial cells), and on tumor cells. Its activation by the ligand CD40L by activated T-cells, platelets, and macrophages induces the proliferation and differentiation of B cells and macrophages, which is accompanied by the promotion of antigen presentation and anti-tumor immunity [85]. Activating CD40 is a potential mechanism for targeting macrophage polarization, as shown for pancreatic adenocarcinoma. In a murine model of this cancer, a monoclonal anti-CD40 agonist antibody is able to induce tumor regression by repolarizing macrophages toward a pro-inflammatory phenotype [86]. Knowing the fact that in glioblastoma, upregulation of the CD40/CD40L axis is an indicator for better prognosis, it is interesting that in vivo, the use of this anti-CD40 agonist antibody actually shows anti-tumor effects [85,87]. This effect is mediated by pushing the macrophages toward a M1-like phenotype [88].

4.2.4. Toll-like Receptors (TLRs)

Toll-like receptors (TLRs) are also a studied target. This family of receptors is part of the pattern recognition receptors (PRRs) involved in the initiation of innate immune response by recognizing microbial-associated molecular patterns (MAMPs) and danger-associated molecular patterns (DAMPs) present on microorganisms. Their activation induces cytokine secretion, opsonization, phagocytosis, activation of the complement system, and proliferation [89]. Although there is a discrepancy regarding the role of TLRs in tumors, some agonists have been tested for their effects on glioblastoma. The most studied among them are phosphorothioate oligodeoxynucleotides (ODN) containing unmethylated cytosine-guanosine motifs (CpG) and targeting TLR9. These immunostimulatory substances are able to induce tumor death and to increase the survival of grafted rats and mice through an

effect on the immune system. Indeed, in immunodeficient mice, the effect of ODN is abrogated [90,91]. CpG-ODNs were also appraised for their effects on humans. In two different phase I clinical trials, it was shown in patients with recurrent GBM that CpG-ODNs are generally well tolerated, except in some cases of lymphopenia, mild fever, seizures, and transient neurological worsening. It was also observed that the survival of patients was slightly extended compared to patients treated with temozolomide [92,93]. However, in a phase II trial, CpG-ODNs injected directly in the brain tumors of patients with recurrent GBM only showed modest activity. The radiological responses were low, but the number of long-term survivors was higher than in other studies. This example shows an important limit in the use of compounds targeting macrophages and the immune system in general: the considerable patient- and tumor-dependent response to the compounds [94]. Another limitation of these compounds as well as other TLR agonists (e.g., imidazoquinolines) is the absence of specificity, which can be the source of side effects. As a matter of fact, their activity is not only mediated through macrophages, but also through NK cells, dendritic cells (DCs), and T cells [89,91,95].

4.2.5. Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs)

Signal transducers and activators of transcription (STATs) also serve as targets for the repolarization of macrophages/microglia. STAT3 is implicated in the M2-polarization process and its inhibition is an interesting option to favor a pro-inflammatory and anti-tumoral state. Such an inhibitor is the small molecule WP1066. This compound is able to activate macrophages/microglia and to drive them toward a pro-inflammatory state. Results *in vitro* and *in vivo* showed that WP1066 is able to reduce glioblastoma viability and growth [12,96,97]. Its efficacy is mediated through the induction of the expression of costimulatory molecules (CD80 and CD86) by macrophages and microglia, the secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-2, IL-12, and IL-15), and the induction of the proliferation of effector T-cells [98]. Two phase I clinical trials to study WP1066 and its effect on gliomas including glioblastomas are currently recruiting (NCT01904123 and NCT04334863).

4.2.6. Other Targets

Aside these well studied targets and compounds, many others constitute some promising routes for investigation. Among them, we can cite the target CXCR4 inhibition by a cyclic peptide inducing a switch of macrophages toward a M1-like phenotype associated with a reduction in the proliferation and dissemination of human GBM cells *in vitro* and *in vivo* [99]. Another compound we can cite is amphotericin B, an antifungal medicine, which is able to enhance the capacity of macrophages and microglia to impede brain tumor-initiating cell proliferation and survival. A prolonged survival was then observed in grafted mice [100]. A last interesting mechanism is the use of a bispecific neutralizing antibody (vanucizumab) targeting angiopoietin-2 and VEGF. The antibody is able to reprogram macrophages and microglia toward an anti-tumoral phenotype, thereby delaying GBM growth and prolonging survival of grafted mice. Interestingly, using the antibody directed against both targets showed better effects than targeting VEGF alone (which is the mechanism of action of the FDA-approved drug bevacizumab for GBM). Additionally, knowing the fact that vanucizumab is safe for use in humans (NCT01688206 clinical trial), it constitutes an interesting compound for further studies [101].

All of the above cited compounds target M2-like macrophages and microglia to induce a repolarization toward a M1-like state. However, another mechanism has also been studied: inhibiting the recruitment of TAMs with an anti-inflammatory phenotype. One example is cyclosporin A, which permits limiting the infiltration of these cells, but its lack of selectivity is responsible for important side effects including the development of tumors [102]. A more selective option is to use an antibody directed against one specific target. One example is an anti-CCL2 (or anti-MCP1) antibody that is able to extend modestly, albeit significantly, the survival of GBM tumor-bearing mice in which a diminution in the number of TAMs in the tumor microenvironment has been observed [103].

5. Conclusions

Multiple sclerosis and glioblastoma are two very different diseases. However, in both cases, the immune system has an important role. In MS, an auto-immune mechanism leads to an inflammatory reaction directed against one's own body and is responsible for demyelination and neurodegeneration [6]. In GBM, local inhibition of the immune system and a tolerance driven by the tumor itself drives the tumor survival and proliferation [5]. Targeting the immune system is an interesting choice. In the first pathology, the exacerbated immune response should be regulated whereas in the second pathology, it should be re-activated against the tumor cells. Critical contributors of the immune system are the cells from the monocyte lineage, particularly macrophages and microglia. Both are implicated in the pathophysiology of MS and GBM due to their capacity to endorse different phenotypes of activation. On one hand, their classical mode of activation or M1-like phenotype has a pro-inflammatory profile and it has been shown that this phenotype is prevalent in active MS lesions [3]. On the other hand, their alternative mode of activation or M2-like phenotype with an anti-inflammatory profile is predominant in cancerous diseases [70]. Knowing these facts, we wanted to review the treatments for both effects on the market or under development, which can specifically influence the polarization of macrophages and/or microglia, in order to re-educate them. For MS (Figure 4), we showed that most of the immunomodulating treatments target these cells by inhibiting their pro-inflammatory attributes and promoting a repolarization toward an anti-inflammatory phenotype. Other synthetic or natural occurring compounds are also under development with the purpose to re-educate macrophages and microglia.

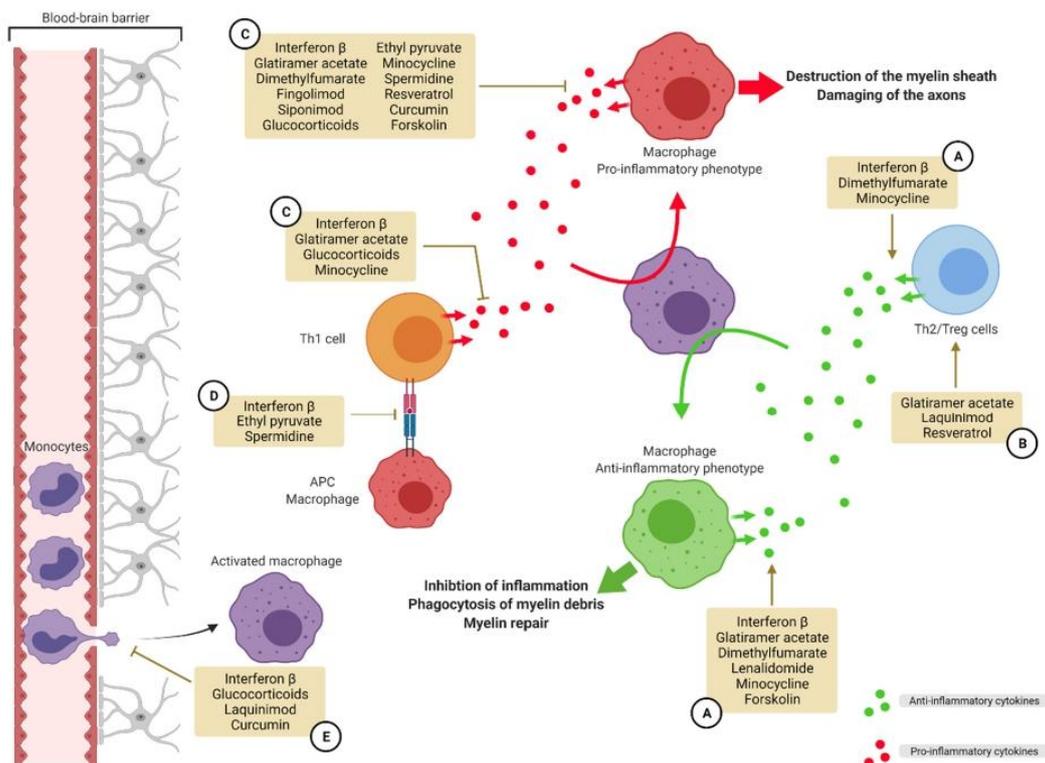


Figure 4. Targeting macrophage polarization in multiple sclerosis. In MS, macrophages adopt a M1-like phenotype promoting inflammation. A strategy for the resolution of inflammation and myelin sheath destruction is to target this polarization and push the macrophages toward a M2-like anti-inflammatory phenotype. Several compounds on the market and in development use different

methods to re-educate macrophages. One strategy is to promote the secretion of anti-inflammatory cytokines by macrophages and Th2/Treg lymphocytes (A). Another strategy is to promote the activation of Th2 and Treg lymphocytes (B). Another way to achieve this purpose is to inhibit the secretion of pro-inflammatory cytokines by macrophages and Th1 lymphocytes (C). Preventing antigen presentation by macrophages is another strategy (D). A last strategy is to limit extravasation of monocytes into the CNS (E). APC: antigen presenting cell, MS: multiple sclerosis, Th: T helper, Treg: regulatory T cells.

For GBM (Figure 5), small molecules, antibodies, and nucleotides are under development with the aim to re-activate macrophages and microglia, thereby favoring anti-tumoral immunity. For the moment, no compound has been approved on the market with a mode of action specifically targeting the polarization of macrophages/microglia.

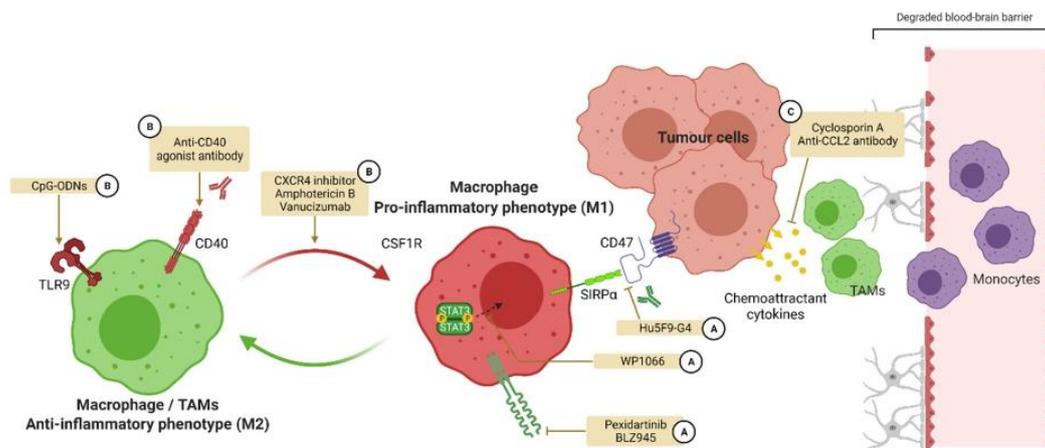


Figure 5. Targeting macrophage polarization in glioblastoma. In GBM, macrophages adopt a M2-like phenotype inhibiting inflammation and anti-tumoral immunity. A strategy for the reactivation of this immunity is to target the polarization of macrophages in order to promote M1 activation. A first strategy is to inhibit targets promoting M2 polarization such as CSF1R and STAT3 or the recognition of CD47 by SIRP α (A). Another strategy is to activate targets favoring M1 polarization such as TLR9 and CD40 (B). A last strategy is to inhibit the attraction of M2 polarized TAMs from the circulation toward the CNS (C). CSF1R: colony-stimulating factor 1 receptor, SIRP α : signal regulatory protein α , TAMs: tumor associated macrophages, TLR: Toll-like receptor.

However, considering the results of the studies reviewed here, we believe that it is a promising approach deserving more attention and research. New methods could be used to alter macrophage/microglia polarization. An example of an original method that showed promising results in models for both pathologies is the use of membrane targeting peptides (MTPs). For GBM, two MTPs have been developed: one targeting plexin-A1 and another targeting neuropilin-1 [104,105]. For MS, the peptide targeting plexin-A1 has been shown to promote remyelination [106]. These compounds are able to modulate the activation of a specific receptor by binding specifically to its transmembrane (TM) domain. They can either inhibit the activation of the receptor by interfering with the correct oligomerization or favor its activation by inducing conformational changes [107,108]. Knowing the fact that some receptors such as CSF1R are implicated in the mechanism of polarization, therefore, it is conceivable to design such peptides to block or improve these receptors and thereby favor one or the other polarization.

Author Contributions: Conceptualization, T.K. and D.B.; Investigation, T.K.; Writing—original draft preparation, T.K.; Writing—review and editing, T.K. and D.B.; Visualization, T.K.; Supervision, D.B.; Project administration, D.B.; Funding acquisition, D.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work of the Strasbourg Drug Discovery and Development Institute (IMS), as part of the Interdisciplinary Thematic Institute (ITI) 2021–2028 program of the University of Strasbourg, CNRS, and Inserm, was supported by IdEx Unistra (ANR-10-IDEX-0002) and by the SFRI-STRAT'US project (ANR-20-SFRI-0012) under the framework of the French Investments for the Future Program.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Figures 1–5 were created with BioRender.com and last accessed on 31 January 2022. The authors thank Dafni Birmipili, Imane Charmarke-Askar, Lucas Pham-Van, and Caroline Spenlé for helping in the preparation and review of this work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Shrivastava, R.; Shukla, N. Attributes of alternatively activated (M2) macrophages. *Life Sci.* **2019**, *224*, 222–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Parisi, L.; Gini, E.; Baci, D.; Tremolati, M.; Fanuli, M.; Bassani, B.; Farronato, G.; Bruno, A.; Mortara, L. Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? *J. Immunol. Res.* **2018**, *2018*, 8917804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chu, F.; Shi, M.; Zheng, C.; Shen, D.; Zhu, J.; Zheng, X.; Cui, L. The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* **2018**, *318*, 1–7. [[CrossRef](#)]
- Omuro, A.; DeAngelis, L.M. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review. *JAMA* **2013**, *310*, 1842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hambardzumyan, D.; Gutmann, D.H.; Kettenmann, H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat. Neurosci.* **2016**, *19*, 20–27. [[CrossRef](#)]
- Reich, D.S.; Lucchinetti, C.F.; Calabresi, P.A. Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 169–180. [[CrossRef](#)]
- Mills, C.D.; Kincaid, K.; Alt, J.M.; Heilman, M.J.; Hill, A.M. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 6166–6173. [[CrossRef](#)]
- Mantovani, A.; Sozzani, S.; Locati, M.; Allavena, P.; Sica, A. Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* **2002**, *23*, 549–555. [[CrossRef](#)]
- Murray, P.J. Macrophage Polarization. *Annu. Rev. Physiol.* **2017**, *79*, 541–566. [[CrossRef](#)]
- Arora, S.; Dev, K.; Agarwal, B.; Das, P.; Syed, M.A. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiology* **2018**, *223*, 383–396. [[CrossRef](#)]
- Martinez, F.O.; Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Rep.* **2014**, *6*, 13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wei, J.; Gabrusiewicz, K.; Heimberger, A. The Controversial Role of Microglia in Malignant Gliomas. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, *2013*, 285246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mantovani, A.; Sica, A.; Sozzani, S.; Allavena, P.; Vecchi, A.; Locati, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **2004**, *25*, 677–686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Röszer, T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediat. Inflamm.* **2015**, *2015*, 816460. [[CrossRef](#)]
- Shapouri-Moghaddam, A.; Mohammadian, S.; Vazini, H.; Taghadosi, M.; Esmaeili, S.-A.; Mardani, F.; Seifi, B.; Mohammadi, A.; Afshari, J.T.; Sahebkar, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 6425–6440. [[CrossRef](#)]
- Vogel, D.Y.; Vereyken, E.J.; Glim, J.E.; Heijnen, P.D.; Moeton, M.; van der Valk, P.; Amor, S.; Teunissen, C.E.; van Horsen, J.; Dijkstra, C.D. Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. *J. Neuroinflamm.* **2013**, *10*, 809. [[CrossRef](#)]
- Li, C.; Menoret, A.; Farragher, C.; Ouyang, Z.; Bonin, C.; Holvoet, P.; Vella, A.T.; Zhou, B. Single-cell transcriptomics-based MacSpectrum reveals macrophage activation signatures in diseases. *JCI Insight* **2019**, *4*, e126453. [[CrossRef](#)]
- Saliba, A.-E.; Li, L.; Westermann, A.J.; Appenzeller, S.; Stapels, D.A.C.; Schulte, L.N.; Helaine, S.; Vogel, J. Single-cell RNA-seq ties macrophage polarization to growth rate of intracellular Salmonella. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*, 16206. [[CrossRef](#)]
- Hume, D.A. The Many Alternative Faces of Macrophage Activation. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 370. [[CrossRef](#)]
- Mosser, D.M.; Edwards, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 958–969. [[CrossRef](#)]
- Luo, C.; Jian, C.; Liao, Y.; Huang, Q.; Wu, Y.; Liu, X.; Zou, D.; Wu, Y. The role of microglia in multiple sclerosis. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2017**, *13*, 1661–1667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Peferoen, L.A.N.; Vogel, D.Y.S.; Ummenthum, K.; Breur, M.; Heijnen, P.D.A.M.; Gerritsen, W.H.; Peferoen-Baert, R.M.B.; van der Valk, P.; Dijkstra, C.D.; Amor, S. Activation Status of Human Microglia Is Dependent on Lesion Formation Stage and Remyelination in Multiple Sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2015**, *74*, 48–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Kieseier, B.C. The Mechanism of Action of Interferon- β in Relapsing Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* **2011**, *25*, 491–502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Mishra, M.K.; Yong, V.W. Myeloid cells—Targets of medication in multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **2016**, *12*, 539–551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Nally, F.K.; De Santi, C.; McCoy, C.E. Nanomodulation of Macrophages in Multiple Sclerosis. *Cells* **2019**, *8*, 543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Molnarfi, N.; Prod'homme, T.; Schulze-Topphoff, U.; Spencer, C.M.; Weber, M.S.; Patarroyo, J.C.; Lalive, P.H.; Zamvil, S.S. Glatiramer acetate treatment negatively regulates type I interferon signaling. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2015**, *2*, e179. [[CrossRef](#)]
27. Schilling, S.; Goelz, S.; Linker, R.; Luehder, F.; Gold, R. Fumaric acid esters are effective in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis and suppress macrophage infiltration. *Clin. Exp. Immunol.* **2006**, *145*, 101–107. [[CrossRef](#)]
28. Wierinckx, A.; Brevé, J.; Mercier, D.; Schultzberg, M.; Drukarch, B.; Van Dam, A.-M. Detoxification enzyme inducers modify cytokine production in rat mixed glial cells. *J. Neuroimmunol.* **2005**, *166*, 132–143. [[CrossRef](#)]
29. Di Dario, M.; Colombo, E.; Govi, C.; De Feo, D.; Messina, M.J.; Romeo, M.; Sangalli, F.; Moiola, L.; Rodegher, M.; Martino, G.; et al. Myeloid cells as target of fingolimod action in multiple sclerosis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2015**, *2*, e157. [[CrossRef](#)]
30. Jackson, S.J.; Giovannoni, G.; Baker, D. Fingolimod modulates microglial activation to augment markers of remyelination. *J. Neuroinflamm.* **2011**, *8*, 76. [[CrossRef](#)]
31. Aoki, M.; Kondo, A.; Matsunaga, N.; Honda, A.; Okubo, Y.; Takabe, K.; Ogawa, R. The Immunosuppressant Fingolimod (FTY720) for the Treatment of Mechanical Force-Induced Abnormal Scars. *J. Immunol. Res.* **2020**, *2020*, 7057195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Behrangi, N.; Fischbach, F.; Kipp, M. Mechanism of Siponimod: Anti-Inflammatory and Neuroprotective Mode of Action. *Cells* **2019**, *8*, 24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Gentile, A.; Musella, A.; Bullitta, S.; Fresegna, D.; De Vito, F.; Fantozzi, R.; Piras, E.; Gargano, F.; Borsellino, G.; Battistini, L.; et al. Siponimod (BAF312) prevents synaptic neurodegeneration in experimental multiple sclerosis. *J. Neuroinflamm.* **2016**, *13*, 207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kipp, M. Does Siponimod Exert Direct Effects in the Central Nervous System? *Cells* **2020**, *9*, 1771. [[CrossRef](#)]
35. Fischer, H.J.; Finck, T.L.K.; Pellkofer, H.L.; Reichardt, H.M.; Lühder, F. Glucocorticoid Therapy of Multiple Sclerosis Patients Induces Anti-inflammatory Polarization and Increased Chemotaxis of Monocytes. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1200. [[CrossRef](#)]
36. Weng, Q.; Wang, J.; Wang, J.; Wang, J.; Sattar, F.; Zhang, Z.; Zheng, J.; Xu, Z.; Zhao, M.; Liu, X.; et al. Lenalidomide regulates CNS autoimmunity by promoting M2 macrophages polarization. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 251. [[CrossRef](#)]
37. Miljković, D.; Blaževski, J.; Petković, F.; Djedović, N.; Momčilović, M.; Stanisavljević, S.; Jevtić, B.; Mostarica Stojković, M.; Spasojević, I. A Comparative Analysis of Multiple Sclerosis–Relevant Anti-Inflammatory Properties of Ethyl Pyruvate and Dimethyl Fumarate. *J. Immunol.* **2015**, *194*, 2493–2503. [[CrossRef](#)]
38. He, Y.; An, J.; Yin, J.-J.; Sui, R.-X.; Miao, Q.; Ding, Z.-B.; Han, Q.-X.; Wang, Q.; Ma, C.-G.; Xiao, B.-G. Ethyl pyruvate enhances spontaneous remyelination by targeting microglia phagocytosis. *Int. Immunopharmacol.* **2019**, *77*, 105929. [[CrossRef](#)]
39. Brück, W.; Wegner, C. Insight into the mechanism of laquinimod action. *J. Neurol. Sci.* **2011**, *306*, 173–179. [[CrossRef](#)]
40. Kieseier, B.C. Defining a role for laquinimod in multiple sclerosis. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **2014**, *7*, 195–205. [[CrossRef](#)]
41. Mishra, M.K.; Wang, J.; Keough, M.B.; Fan, Y.; Silva, C.; Sloka, S.; Hayardeny, L.; Brück, W.; Yong, V.W. Laquinimod reduces neuroaxonal injury through inhibiting microglial activation. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2014**, *1*, 409–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Comi, G.; Jeffery, D.; Kappos, L.; Montalban, X.; Boyko, A.; Rocca, M.A.; Filippi, M. Placebo-Controlled Trial of Oral Laquinimod for Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 1000–1009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. On behalf of the BRAVO Study Group; Vollmer, T.L.; Sorensen, P.S.; Selmaj, K.; Zipp, F.; Havrdova, E.; Cohen, J.A.; Sasson, N.; Gilgun-Sherki, Y.; Arnold, D.L. A randomized placebo-controlled phase III trial of oral laquinimod for multiple sclerosis. *J. Neurol.* **2014**, *261*, 773–783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Brundula, V.; Rewcastle, N.B.; Metz, L.M.; Bernard, C.C.; Yong, V.W. Targeting leukocyte MMPs and transmigration. *Brain* **2002**, *125*, 1297–1308. [[CrossRef](#)]
45. Giuliani, F. Minocycline attenuates T cell and microglia activity to impair cytokine production in T cell-microglia interaction. *J. Leukoc. Biol.* **2005**, *78*, 135–143. [[CrossRef](#)]
46. Nikodemova, M.; Watters, J.J.; Jackson, S.J.; Yang, S.K.; Duncan, I.D. Minocycline Down-regulates MHC II Expression in Microglia and Macrophages through Inhibition of IRF-1 and Protein Kinase C (PKC) $_{\alpha/\beta II}$. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 15208–15216. [[CrossRef](#)]
47. Kobayashi, K.; Imagama, S.; Ohgomori, T.; Hirano, K.; Uchimura, K.; Sakamoto, K.; Hirakawa, A.; Takeuchi, H.; Suzumura, A.; Ishiguro, N.; et al. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e525. [[CrossRef](#)]
48. Metz, L.M.; Li, D.K.B.; Traboulsee, A.L.; Duquette, P.; Eliasziw, M.; Cerchiaro, G.; Greenfield, J.; Riddehough, A.; Yeung, M.; Kremenutzky, M.; et al. Trial of Minocycline in a Clinically Isolated Syndrome of Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 2122–2133. [[CrossRef](#)]
49. Marchand, D.K.; Butcher, R. *Minocycline for Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis and Clinically Isolated Syndrome: A Review of Clinical Effectiveness and Guidelines*; CADTH Rapid Response Reports; Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health: Ottawa, ON, USA, 2019.

50. Sørensen, P.S.; Sellebjerg, F.; Lycke, J.; Färkkilä, M.; Créange, A.; Lund, C.G.; Schlupe, M.; Frederiksen, J.L.; Stenager, E.; Pflieger, C.; et al. Minocycline added to subcutaneous interferon β -1a in multiple sclerosis: Randomized RECYCLINE study. *Eur. J. Neurol.* **2016**, *23*, 861–870. [[CrossRef](#)]
51. Saqib, U.; Sarkar, S.; Suk, K.; Mohammad, O.; Baig, M.S.; Savai, R. Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. *Oncotarget* **2018**, *9*, 17937–17950. [[CrossRef](#)]
52. Wang, Y.; Smith, W.; Hao, D.; He, B.; Kong, L. M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds. *Int. Immunopharmacol.* **2019**, *70*, 459–466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Schmitz, K.; Barthelmes, J.; Stolz, L.; Beyer, S.; Diehl, O.; Tegeder, I. “Disease modifying nutraceuticals” for multiple sclerosis. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *148*, 85–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Choi, Y.; Park, H. Anti-inflammatory effects of spermidine in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *J. Biomed. Sci.* **2012**, *19*, 31. [[CrossRef](#)]
55. Yang, Q.; Zheng, C.; Cao, J.; Cao, G.; Shou, P.; Lin, L.; Velletri, T.; Jiang, M.; Chen, Q.; Han, Y.; et al. Spermidine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis through inducing inhibitory macrophages. *Cell Death Differ.* **2016**, *23*, 1850–1861. [[CrossRef](#)]
56. Guo, X.; Harada, C.; Namekata, K.; Kimura, A.; Mitamura, Y.; Yoshida, H.; Matsumoto, Y.; Harada, T. Spermidine Alleviates Severity of Murine Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **2011**, *52*, 2696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Ghaiad, H.R.; Nooh, M.M.; El-Sawalhi, M.M.; Shaheen, A.A. Resveratrol Promotes Remyelination in Cuprizone Model of Multiple Sclerosis: Biochemical and Histological Study. *Mol. Neurobiol.* **2017**, *54*, 3219–3229. [[CrossRef](#)]
58. Schwager, J.; Richard, N.; Widmer, F.; Raederstorff, D. Resveratrol distinctively modulates the inflammatory profiles of immune and endothelial cells. *BMC Complement. Altern. Med.* **2017**, *17*, 309. [[CrossRef](#)]
59. Buttari, B.; Profumo, E.; Segoni, L.; D’Arcangelo, D.; Rossi, S.; Facchiano, F.; Saso, L.; Businaro, R.; Iuliano, L.; Riganò, R. Resveratrol Counteracts Inflammation in Human M1 and M2 Macrophages upon Challenge with 7-Oxo-Cholesterol: Potential Therapeutic Implications in Atherosclerosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*, 257543. [[CrossRef](#)]
60. Imler, T.J.; Petro, T.M. Decreased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis during resveratrol administration is associated with increased IL-17⁺IL-10⁺ T cells, CD4⁺ IFN- γ ⁺ cells, and decreased macrophage IL-6 expression. *Int. Immunopharmacol.* **2009**, *9*, 134–143. [[CrossRef](#)]
61. Sato, F.; Martinez, N.E.; Shahid, M.; Rose, J.W.; Carlson, N.G.; Tsunoda, I. Resveratrol Exacerbates Both Autoimmune and Viral Models of Multiple Sclerosis. *Am. J. Pathol.* **2013**, *183*, 1390–1396. [[CrossRef](#)]
62. Qureshi, M.; Al-Suhaimi, E.A.; Wahid, F.; Shehzad, O.; Shehzad, A. Therapeutic potential of curcumin for multiple sclerosis. *Neurol. Sci.* **2018**, *39*, 207–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Ghanaatian, N.; Lashgari, N.; Abdolghaffari, A.H.; Rajaei, S.M.; Panahi, Y.; Barreto, G.E.; Butler, A.E.; Sahebkar, A. Curcumin as a therapeutic candidate for multiple sclerosis: Molecular mechanisms and targets. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 12237–12248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Esmaeilzadeh, E.; Soleimani, M.; Zare-Abdollahi, D.; Jameie, B.; Khorram Kohrshid, H.R. Curcumin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in a C57BL/6 mouse model. *Drug Dev. Res.* **2019**, *80*, 629–636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Ghasemi, F.; Bagheri, H.; Barreto, G.E.; Read, M.I.; Sahebkar, A. Effects of Curcumin on Microglial Cells. *Neurotox. Res.* **2019**, *36*, 12–26. [[CrossRef](#)]
66. Lu, L.; Qi, S.; Chen, Y.; Luo, H.; Huang, S.; Yu, X.; Luo, Q.; Zhang, Z. Targeted immunomodulation of inflammatory monocytes across the blood-brain barrier by curcumin-loaded nanoparticles delays the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biomaterials* **2020**, *245*, 119987. [[CrossRef](#)]
67. Dolati, S.; Ahmadi, M.; Aghebti-Maleki, L.; Nikmaram, A.; Marofi, F.; Rikhtegar, R.; Ayromlou, H.; Yousefi, M. Nanocurcumin is a potential novel therapy for multiple sclerosis by influencing inflammatory mediators. *Pharmacol. Rep.* **2018**, *70*, 1158–1167. [[CrossRef](#)]
68. Veremeyko, T.; Yung, A.W.Y.; Dukhinova, M.; Kuznetsova, I.S.; Pomytkin, I.; Lyundup, A.; Strelakova, T.; Barteneva, N.S.; Ponomarev, E.D. Cyclic AMP Pathway Suppress Autoimmune Neuroinflammation by Inhibiting Functions of Encephalitogenic CD4 T Cells and Enhancing M2 Macrophage Polarization at the Site of Inflammation. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 50. [[CrossRef](#)]
69. Rolle, C.E.; Sengupta, S.; Lesniak, M.S. Mechanisms of Immune Evasion by Gliomas. In *Glioma*; Yamanaka, R., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer: New York, NY, USA, 2012; Volume 746, pp. 53–76. ISBN 978-1-4614-3145-9.
70. Hui, L.; Chen, Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett.* **2015**, *368*, 7–13. [[CrossRef](#)]
71. Ruffell, B.; Affara, N.I.; Coussens, L.M. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.* **2012**, *33*, 119–126. [[CrossRef](#)]
72. Solinas, G.; Germano, G.; Mantovani, A.; Allavena, P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **2009**, *86*, 1065–1073. [[CrossRef](#)]
73. Ao, J.-Y.; Zhu, X.-D.; Chai, Z.-T.; Cai, H.; Zhang, Y.-Y.; Zhang, K.-Z.; Kong, L.-Q.; Zhang, N.; Ye, B.-G.; Ma, D.-N.; et al. Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Blockade Inhibits Tumor Growth by Altering the Polarization of Tumor-Associated Macrophages in Hepatocellular Carcinoma. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16*, 1544–1554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Cannarile, M.A.; Weisser, M.; Jacob, W.; Jegg, A.-M.; Ries, C.H.; Rüttinger, D. Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy. *J. Immunother. Cancer* **2017**, *5*, 53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

75. Zhu, Y.; Knolhoff, B.L.; Meyer, M.A.; Nywening, T.M.; West, B.L.; Luo, J.; Wang-Gillam, A.; Goedegebuure, S.P.; Linehan, D.C.; DeNardo, D.G. CSF1/CSF1R Blockade Reprograms Tumor-Infiltrating Macrophages and Improves Response to T-cell Checkpoint Immunotherapy in Pancreatic Cancer Models. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 5057–5069. [CrossRef] [PubMed]
76. Yan, D.; Kowal, J.; Akkari, L.; Schuhmacher, A.J.; Huse, J.T.; West, B.L.; Joyce, J.A. Inhibition of colony stimulating factor-1 receptor abrogates microenvironment-mediated therapeutic resistance in gliomas. *Oncogene* **2017**, *36*, 6049–6058. [CrossRef] [PubMed]
77. Coniglio, S.J.; Eugenin, E.; Dobrenis, K.; Stanley, E.R.; West, B.L.; Symons, M.H.; Segall, J.E. Microglial Stimulation of Glioblastoma Invasion Involves Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Colony Stimulating Factor 1 Receptor (CSF-1R) Signaling. *Mol. Med.* **2012**, *18*, 519–527. [CrossRef]
78. Butowski, N.; Colman, H.; De Groot, J.F.; Omuro, A.M.; Nayak, L.; Wen, P.Y.; Cloughesy, T.F.; Marimuthu, A.; Haidar, S.; Perry, A.; et al. Orally administered colony stimulating factor 1 receptor inhibitor PLX3397 in recurrent glioblastoma: An Ivy Foundation Early Phase Clinical Trials Consortium phase II study. *Neuro-Oncology* **2016**, *18*, 557–564. [CrossRef]
79. A Phase 1b/2 Study of PLX3397 + Radiation Therapy + Temozolomide in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma—Study Results—ClinicalTrials.gov. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01790503> (accessed on 11 June 2021).
80. Pyonteck, S.M.; Akkari, L.; Schuhmacher, A.J.; Bowman, R.L.; Sevenich, L.; Quail, D.F.; Olson, O.C.; Quick, M.L.; Huse, J.T.; Teijeiro, V.; et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1264–1272. [CrossRef]
81. Quail, D.F.; Bowman, R.L.; Akkari, L.; Quick, M.L.; Schuhmacher, A.J.; Huse, J.T.; Holland, E.C.; Sutton, J.C.; Joyce, J.A. The tumor microenvironment underlies acquired resistance to CSF-1R inhibition in gliomas. *Science* **2016**, *352*, aad3018. [CrossRef]
82. Zhang, M.; Hutter, G.; Kahn, S.A.; Azad, T.D.; Gholamin, S.; Xu, C.Y.; Liu, J.; Achrol, A.S.; Richard, C.; Sommerkamp, P.; et al. Anti-CD47 Treatment Stimulates Phagocytosis of Glioblastoma by M1 and M2 Polarized Macrophages and Promotes M1 Polarized Macrophages In Vivo. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0153550. [CrossRef]
83. Zhu, H.; Leiss, L.; Yang, N.; Rygh, C.B.; Mitra, S.S.; Cheshier, S.H.; Weissman, I.L.; Huang, B.; Miletic, H.; Bjerkvig, R.; et al. Surgical debulking promotes recruitment of macrophages and triggers glioblastoma phagocytosis in combination with CD47 blocking immunotherapy. *Oncotarget* **2017**, *8*, 12145–12157. [CrossRef]
84. Li, F.; Lv, B.; Liu, Y.; Hua, T.; Han, J.; Sun, C.; Xu, L.; Zhang, Z.; Feng, Z.; Cai, Y.; et al. Blocking the CD47-SIRP α axis by delivery of anti-CD47 antibody induces antitumor effects in glioma and glioma stem cells. *Oncotarget* **2018**, *7*, e1391973. [CrossRef] [PubMed]
85. Chonan, M.; Saito, R.; Shoji, T.; Shibahara, I.; Kanamori, M.; Sonoda, Y.; Watanabe, M.; Kikuchi, T.; Ishii, N.; Tominaga, T. CD40/CD40L expression correlates with the survival of patients with glioblastomas and an augmentation in CD40 signaling enhances the efficacy of vaccinations against glioma models. *Neuro-Oncology* **2015**, *17*, 1453–1462. [CrossRef] [PubMed]
86. Beatty, G.L.; Chiorean, E.G.; Fishman, M.P.; Saboury, B.; Teitelbaum, U.R.; Sun, W.; Huhn, R.D.; Song, W.; Li, D.; Sharp, L.L.; et al. CD40 Agonists Alter Tumor Stroma and Show Efficacy Against Pancreatic Carcinoma in Mice and Humans. *Science* **2011**, *331*, 1612–1616. [CrossRef] [PubMed]
87. Walker, P.R.; Migliorini, D. The CD40/CD40L axis in glioma progression and therapy. *Neuro-Oncology* **2015**, *17*, 1428–1430. [CrossRef] [PubMed]
88. Kosaka, A.; Ohkuri, T.; Okada, H. Combination of an agonistic anti-CD40 monoclonal antibody and the COX-2 inhibitor celecoxib induces anti-glioma effects by promotion of type-1 immunity in myeloid cells and T-cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **2014**, *63*, 847–857. [CrossRef] [PubMed]
89. Abarca-Merlin, D.M.; Maldonado-Bernal, C.; Alvarez-Arellano, L. Toll-Like Receptors as Therapeutic Targets in Central Nervous System Tumors. *BioMed Res. Int.* **2019**, *2019*, 5286358. [CrossRef]
90. Grauer, O.M.; Molling, J.W.; Bennink, E.; Toonen, L.W.J.; Suttmuller, R.P.M.; Nierkens, S.; Adema, G.J. TLR Ligands in the Local Treatment of Established Intracerebral Murine Gliomas. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 6720–6729. [CrossRef]
91. Carpentier, A.F.; Xie, J.; Mokhtari, K.; Delattre, J.Y. Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2000**, *6*, 2469–2473.
92. Ursu, R.; Taillibert, S.; Banissi, C.; Vicaut, E.; Bailon, O.; Le Rhun, E.; Guillamo, J.-S.; Psimaras, D.; Tibi, A.; Sacko, A.; et al. Immunotherapy with CpG-ODN in neoplastic meningitis: A phase I trial. *Cancer Sci.* **2015**, *106*, 1212–1218. [CrossRef]
93. Carpentier, A.; Laigle-Donadey, F.; Zohar, S.; Capelle, L.; Behin, A.; Tibi, A.; Martin-Duverneuil, N.; Sanson, M.; Lacomblez, L.; Taillibert, S.; et al. Phase 1 trial of a CpG oligodeoxynucleotide for patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncology* **2006**, *8*, 60–66. [CrossRef]
94. Carpentier, A.; Metellus, P.; Ursu, R.; Zohar, S.; Lafitte, F.; Barrie, M.; Meng, Y.; Richard, M.; Parizot, C.; Laigle-Donadey, F.; et al. Intracerebral administration of CpG oligonucleotide for patients with recurrent glioblastoma: A phase II study. *Neuro-Oncology* **2010**, *12*, 401–408. [CrossRef] [PubMed]
95. Schön, M.P.; Schön, M. TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene* **2008**, *27*, 190–199. [CrossRef] [PubMed]
96. Iwamaru, A.; Szymanski, S.; Iwado, E.; Aoki, H.; Yokoyama, T.; Fokt, I.; Hess, K.; Conrad, C.; Madden, T.; Sawaya, R.; et al. A novel inhibitor of the STAT3 pathway induces apoptosis in malignant glioma cells both in vitro and in vivo. *Oncogene* **2007**, *26*, 2435–2444. [CrossRef] [PubMed]
97. Carvalho da Fonseca, A.C.; Badie, B. Microglia and Macrophages in Malignant Gliomas: Recent Discoveries and Implications for Promising Therapies. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, *2013*, 264124. [CrossRef]

98. Hussain, S.F.; Kong, L.-Y.; Jordan, J.; Conrad, C.; Madden, T.; Fokt, I.; Priebe, W.; Heimberger, A.B. A Novel Small Molecule Inhibitor of Signal Transducers and Activators of Transcription 3 Reverses Immune Tolerance in Malignant Glioma Patients. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 9630–9636. [[CrossRef](#)]
99. Mercurio, L.; Ajmone-Cat, M.A.; Cecchetti, S.; Ricci, A.; Bozzuto, G.; Molinari, A.; Manni, I.; Pollo, B.; Scala, S.; Carpinelli, G.; et al. Targeting CXCR4 by a selective peptide antagonist modulates tumor microenvironment and microglia reactivity in a human glioblastoma model. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2016**, *35*, 55. [[CrossRef](#)]
100. Sarkar, S.; Döring, A.; Zemp, F.J.; Silva, C.; Lun, X.; Wang, X.; Kelly, J.; Hader, W.; Hamilton, M.; Mercier, P.; et al. Therapeutic activation of macrophages and microglia to suppress brain tumor-initiating cells. *Nat. Neurosci.* **2014**, *17*, 46–55. [[CrossRef](#)]
101. Kloepper, J.; Riedemann, L.; Amoozgar, Z.; Seano, G.; Susek, K.; Yu, V.; Dalvie, N.; Amelung, R.L.; Datta, M.; Song, J.W.; et al. Ang-2/VEGF bispecific antibody reprograms macrophages and resident microglia to anti-tumor phenotype and prolongs glioblastoma survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 4476–4481. [[CrossRef](#)]
102. Russo, C.D.; Cappoli, N. Glioma associated microglia/macrophages, a potential pharmacological target to promote antitumor inflammatory immune response in the treatment of glioblastoma. *Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2018**, *5*, 36. [[CrossRef](#)]
103. Zhu, X.; Fujita, M.; Snyder, L.A.; Okada, H. Systemic delivery of neutralizing antibody targeting CCL2 for glioma therapy. *J. Neurooncol.* **2011**, *104*, 83–92. [[CrossRef](#)]
104. Jacob, L.; Sawma, P.; Garnier, N.; Meyer, L.A.T.; Fritz, J.; Hussenet, T.; Spenlé, C.; Goetz, J.; Vermot, J.; Fernandez, A.; et al. Inhibition of PlexA1-mediated brain tumor growth and tumor-associated angiogenesis using a transmembrane domain targeting peptide. *Oncotarget* **2016**, *7*, 57851–57865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Nasarre, C.; Roth, M.; Jacob, L.; Roth, L.; Koncina, E.; Thien, A.; Labourdette, G.; Poulet, P.; Hubert, P.; Crémel, G.; et al. Peptide-based interference of the transmembrane domain of neuropilin-1 inhibits glioma growth in vivo. *Oncogene* **2010**, *29*, 2381–2392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Binamé, F.; Pham-Van, L.D.; Spenlé, C.; Jolivel, V.; Birmipili, D.; Meyer, L.A.; Jacob, L.; Meyer, L.; Mensah-Nyagan, A.G.; Po, C.; et al. Disruption of Semaphorin 3A/Plexin-A1 inhibitory signalling in oligodendrocytes as a therapeutic strategy to promote remyelination. *EMBO Mol. Med.* **2019**, *11*, e10378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Albrecht, C.; Appert-Collin, A.; Bagnard, D.; Blaise, S.; Romier-Crouzet, B.; Efremov, R.G.; Sartelet, H.; Duca, L.; Maurice, P.; Bennisroune, A. Transmembrane Peptides as Inhibitors of Protein-Protein Interactions: An Efficient Strategy to Target Cancer Cells? *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 519. [[CrossRef](#)]
108. Alves, D.S.; Westerfield, J.M.; Shi, X.; Nguyen, V.P.; Stefanski, K.M.; Booth, K.R.; Kim, S.; Morrell-Falvey, J.; Wang, B.-C.; Abel, S.M.; et al. A novel pH-dependent membrane peptide that binds to EphA2 and inhibits cell migration. *eLife* **2018**, *7*, e36645. [[CrossRef](#)]

Objectifs de la thèse

Les preuves s'accumulent sur l'implication du domaine transmembranaire dans l'oligomérisation et l'activation de nombreux récepteurs membranaires. Comprendre comment le segment TM influe sur ces phénomènes passe par l'identification du code de leurs interactions. Ces connaissances permettent par la suite de cibler le segment TM, qui se présente comme une opportunité pour réguler l'activité des récepteurs, en particulier lorsqu'ils sont impliqués dans des dérégulations pathologiques. Ainsi, des peptides de synthèse mimant en tout ou en partie les domaines TM apparaissent comme un nouveau type d'agent pharmacologique modulant les interactions protéine-protéine. Alors que plus de deux tiers des récepteurs à un segment TM présentent des motifs de dimérisation de type (G, A, S)_{xxx}(G, A, S), les règles d'association des segments TM ne sont encore pas totalement élucidées (139,140). Au-delà d'un aspect fondamental pour la compréhension des interactions entre protéines membranaires, l'étude des interactions entre domaines TM offre la possibilité de développer de nouveaux composés thérapeutiques dans de nombreuses pathologies et pour des cibles encore peu travaillées. Les objectifs de cette thèse s'inscrivent dans cet effort global de compréhension des interactions des segments TM et de leur application pour la conception de composés peptidiques thérapeutiques. Le travail présenté ici porte sur deux plateformes de récepteurs impliquées dans des processus pathologiques complexes avant d'ouvrir vers une approche généraliste posant les bases d'une utilisation systématique des peptides TM comme agents pharmacologiques :

- 1) Le premier objectif de cette thèse est ainsi de déterminer l'implication du domaine TM dans l'oligomérisation et l'activation de deux plateformes de récepteurs : la plateforme NgR (plateforme réunissant des récepteurs avec des motifs de type G_{xxx}G et des mécanismes de redondance et de compensation de signalisation dans des contextes de maladies du système nerveux) et la plateforme du récepteur de l'interleukine-10 (plateforme tétramérique dont les domaines TM des sous unités ne présentent pas de motifs connus de dimérisation, analysée dans le contexte de l'inflammation).

- 2) Le second objectif est de mesurer de manière systématique l'interaction entre domaines TM de tous les récepteurs humains à activité tyrosine kinase, dans le but de produire l'interactome complet pour cette famille de récepteurs sans *a priori* sur les séquences et motifs de dimérisation portés par les segments transmembranaires. Cette approche systématique permettra dans le futur de mieux comprendre le code des interactions des segments TM et d'identifier d'éventuels motifs non connus à ce jour.

Résultats

I. Implication du domaine TM d'AMIGO3 dans la plateforme du récepteur NgR par l'étude du peptide MTP-AMIGO3

Résumé 2 :

L'inhibition d'AMIGO3 par un peptide empêche l'action des facteurs inhibiteurs associés à la myéline et promeut la remyélinisation.

Peptide-based inhibition of AMIGO3 antagonizes myelin associated inhibitory factors and promotes remyelination.

AMIGO3 est une protéine transmembranaire contribuant à la signalisation des facteurs inhibiteurs associés à la myéline. Elle est considérée comme une cible thérapeutique dans les maladies démyélinisantes en raison de son rôle délétère sur la myélinisation. Nous avons analysé le schéma complexe de dimérisation d'AMIGO3 avec LINGO1, p75^{NTR} et TROY constituant la plateforme de récepteur des facteurs inhibiteurs de la myéline. Nous avons découvert que le domaine transmembranaire d'AMIGO3 est impliqué dans des interactions sélectives conduisant à l'activation de RhoA dans les oligodendrocytes. L'inhibition de la fonction d'AMIGO3 par un peptide synthétique mimant le domaine transmembranaire a perturbé la dimérisation et empêché les effets répulsifs de NogoA sur les oligodendrocytes. Le peptide a également favorisé la conservation des marqueurs oligodendrocytaires dans des tranches organotypiques soumises à une démyélinisation induite par la lysophosphatidylcholine. L'administration *in vivo* du peptide antagoniste d'AMIGO3 a présenté un effet protecteur sur la myéline dans le modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale sans action anti-inflammatoire. AMIGO3 est donc une cible médicamenteuse avec un potentiel thérapeutique prometteur pour favoriser la régénération de la myéline dans le contexte de la sclérose en plaques.

Peptide-based inhibition of AMIGO3 antagonizes myelin inhibitory factors and promotes remyelination

Lucas D Pham-Van^{#1}, Thomas Kuntzel^{#1}, Caroline Spenlé¹, Imane Charmarke-Askar¹, Dafni Birmpili¹, Chayma El Khamlichi², Séverine Morriset Lopez² and Dominique Bagnard^{*1, 3}

*Corresponding author

#Equal contribution

1: UMR7242 Biotechnology and Cell signalling, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg Drug Discovery and Development Institute (IMS), University of Strasbourg, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France.

2: UPR 4301, Centre de Biophysique Moléculaire, Centre National de la Recherche Scientifique, University of Orléans, 45071 Orléans, France.

3: Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France.

Abstract

AMIGO3 is a transmembrane protein that contributes to the signalling of inhibitory factors associated with the myelin. It is considered a therapeutic target in demyelinating diseases due to its negative role on myelination. We analysed the complex dimerization pattern of AMIGO3 with LINGO1, p75NTR and TROY constituting the myelin inhibitory factors receptor platform. We found that the transmembrane domain of AMIGO3 is involved in selective interactions leading to RhoA activation in oligodendrocytes. Inhibition of AMIGO3 function with a synthetic peptide mimicking the transmembrane domain disrupted dimerization and reversed the repulsive effects of NogoA on oligodendrocytes. The peptide also promoted the retention of oligodendrocyte markers in organotypic slices subjected to lysophosphatidylcholine-induced demyelination. *In vivo* administration of the AMIGO3 antagonist peptide showed a protective effect on myelin in the experimental autoimmune

encephalomyelitis model without anti-inflammatory action. AMIGO3 is a drug target with therapeutic potential to promote myelin regeneration in multiple sclerosis.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a neuroinflammatory disease characterized by massive loss of myelin. The consequences for the patients are permanent disabilities correlated with impaired nerve conduction and neuronal loss. Although available treatments decrease relapse occurrence and severity, there is currently no drug promoting myelin regeneration. Indeed, remyelination failure is the major hurdle in MS management. This lack of myelin repair results in part from microenvironmental changes preventing oligodendrocyte progenitor cells (OPC) to migrate and differentiate into myelinating oligodendrocytes to restore myelin sheath (1–3). Previous work identified the promising leucine-rich repeat (LRR) transmembrane protein LINGO1 to promote oligodendrocytes differentiation (4–8). This membrane receptor assembles into a platform with other cell surface receptors, NgR1 and p75NTR or TROY (4,8,9). Upon binding of myelin associated inhibitors (MAIs), this platform leads to RhoA activation, a negative regulator of actin cytoskeleton, leading to the inhibition of cell migration. LINGO1 antagonist decreases clinical severity in the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mouse model of MS by promoting oligodendrocytes maturation to protect axons (6). Despite promising preclinical results, a recent clinical trial using the LINGO1 fully humanized antibody, failed to show a significant improvement in disability compared to placebo in patients with relapsing remitting multiple sclerosis (10). One possible explanation could be the relatively late pattern of LINGO1 overexpression in the course of the disease (8,11). This delay could decrease treatment efficiency during the early stages of the disease. In addition, antibodies display poor ability to enter the CNS. Although the blood brain barrier is leaky in MS, antibody diffusion at the lesion site could be insufficient to recruit new remyelinating OPC. Strikingly, the expression of the LINGO1 partner AMIGO3 is increased at day one following CNS injury (8). AMIGO3 is so far poorly described but is considered as a potential target for neurological and dysmyelinating disorders (11). This is mostly due to its function as a coreceptor of NgR1/p75NTR, acting as a substitute of LINGO1 to signal axon growth cone collapse. Moreover, knock-down of AMIGO3 in dorsal root ganglia is favouring axon regrowth (12). Hence, Ahmed and collaborators strongly suggested that AMIGO3 is involved in dysmyelinating diseases (8).

Here, we investigated the role of AMIGO3 in MS context while disentangling its complex interaction with the LINGO1-NgR1/p75NTR receptor platform. We designed and validated an antagonist peptide targeting the AMIGO3 transmembrane domain using *in silico* approaches and a bioluminescence energy transfer method. *In vitro* studies showed that blocking AMIGO3 counteracted the anti-migratory effect of MAIs in oligodendrocytes. Finally, we report that AMIGO3 antagonist MTP-AMIGO3 decreases EAE severity. Taken together, these data present AMIGO3 as a new target to enhance remyelination in MS. In addition, our study shows the contribution of the AMIGO3 transmembrane domain in homo- and heterodimerization with the MAIs platform receptors, paving the way for the application of membrane targeting peptides in pathological contexts involving abnormal inhibitory signalling in the CNS.

Materials and methods

In silico simulation tools

For *in silico* simulations, two tools were used: PREDDIMER and PDBePISA. The first was developed by A.A. Polyansky and P.E. Volynsky in the R.G. Efremov lab (13). It permits to predict the structure of dimeric transmembrane helices. From the TM sequences, it can reconstruct dimer structures, rank and filter them with a scoring function (F_{SCOR}), generate three-dimension structures and display the hydrophobicity of the helices and their interacting interfaces on two dimensional maps (13). The second tool, PDBePISA (Protein Data Bank of Europe, Proteins, Interfaces, Structures and Assemblies) was developed by E. Krissinel and K. Henrick (14). It allows the exploration of macromolecule interfaces based on several physicochemical properties (free energy of complex formation, solvation energies, interaction surface, hydrogen bonds, hydrophobicity) and to determine the buried surface area (BSA) of each amino acid (14).

Cell culture

Oli-neu cells developed by Jung and co-workers were kindly provided by Dr Trotter's laboratory. Cells were cultivated on a poly-L-lysine coating with medium containing 2% horse serum, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), with 0.2% (w/v) sodium bicarbonate, 0.01mg/ml transferrin, 520nM thyroxine, 220nM sodium selenite, 100µM putrescine, 500nM triiodothyronine, 200nM progesterone and 0.01mg/ml insulin at 37°C with 5% CO₂ (2,15).

HEK293 cells were grown in DMEM, 10% of foetal bovine serum (FBS), 2mM L-glutamine, penicillin (100U/ml) and streptomycin (100µg/ml).

Animal experimentation

All experiments were performed in accordance with the French animal protection laws and were approved by the Animal Care Committee of the University of Strasbourg (APAFIS number #22687 2019102813393158). SJL/J female mice purchased from Janvier Labs and Charles River were used for EAE. All mice were 8 weeks of age and fed in a controlled environment (25°C) with free access to food and water and housed on a 12h/12h day/night cycle. All experiments were conducted in blind conditions regarding mice treatments. At the end of the protocols, mice were euthanized and spinal cords were collected for histological examination.

Peptides

MTP-AMIGO3 corresponds to the human extended transmembrane domain of AMIGO3 given by UNIPROT (entry Q86WK7, FNTGFTLLG CAVGLVLLLYLFAPPCRKK) from F₃₈₁ to R₄₀₈. MTP-PlexinA1 published previously by the lab (2,16) was used as a negative control. The sequence corresponds to the transmembrane domain of PlexinA1 (UNIPROT entry P70206, TLPAIVGIGGGGLLLLVIVAVLIAYKRK). Peptides were produced by Peptide Specialty Laboratories GmbH (Germany) by Fmoc chemistry. Peptide powders were solubilized at 1mg/mL in 72mM lithium dodecyl sulfate (LDS, vehicle). For *in vitro* experiments, peptides were used at the 10⁻⁷M final concentration. In EAE, treatment was diluted in PBS (Phosphate-Buffered Saline) at 50µg/kg and administrated every 3 days.

BRET assay

The sequences of the receptors to test were cloned into plasmids, encoding either for the Renilla luciferase Rluc (as a donor, plasmid pRL-CMV E2261, Promega) or the enhanced Yellow Fluorescent Protein eYFP (as an acceptor, plasmid pEYFP-N1, 6006-1, Clontech). Plates for transfection were prepared using a Biomek FX^P pipetting robot (Beckman Coulter). In each well of 96 well-plates (Greiner), a combination of an Rluc and eYFP expressing plasmid diluted at right concentration in 20µL Tris-EDTA (TE) buffer (Sigma) was deposited with 8µL CaCl₂ (Sigma) and 26µL BES (Sigma). HEK293 cells were seeded in a 1/200 collagen I-coated (4mg/mL, Sigma) 96 well-plate (Corning) at 20,000 cells per well in DMEM High glucose supplemented with 10%

inactivated FBS. All the following steps were performed using the FX^P pipetting robot. 24h after seeding, cells were transfected with the transfection medium prepared upstream. After four hours, transfection medium was removed and cells were washed with PBS. DMEM High glucose (4.5 g/L) without sodium pyruvate and phenol red (Sigma), supplemented with 10% inactivated FBS and 1% L-glutamine (Sigma) was then added for 24h. Afterwards, medium was removed, cells were again washed with PBS and medium was replaced by HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Sigma). Using a Biomek NX^P pipetting robot (Beckman Coulter), coelenterazine H (Interchim) at a final concentration of 5µM was added. Finally, BRET signal was assessed by measuring bioluminescent and fluorescent signals at 37°C at 485 ± 10nm and 535 ± 12nm respectively, using a Victor Light (Perkin) reader. BRET ratio was calculated using the following formula:

$$BRET\ ratio = \left(\frac{Fluorescence\ signal\ (eYFP)_{test}}{Bioluminescence\ signal\ (Rluc)_{test}} - \frac{Fluorescence\ signal\ (eYFP)_{ctrl\ Rluc}}{Bioluminescence\ signal\ (Rluc)_{ctrl\ Rluc}} \right) \times 1000.$$

Where “test” corresponds to the co-transfected condition and “ctrl Rluc” to the Rluc transfected alone condition (background signal) (17).

Final BRET ratio is expressed in milliBRET units (mBu). BRET_{max} corresponds to the maximal BRET ratio recorded in mBu and BRET₅₀ corresponds to 50% of the BRET_{max} signal. Fluorescence was also assessed with EnVision Multimode plate reader (Perkin Elmer) at 535nm after excitation at 485nm to control transfection efficacy.

RhoA activity assay

Oli-neu cells were plated on six well plates at 300 000 cells per well in 1mL medium. Four hours before cell lysis, the cell medium was removed and replaced by medium without horse serum to avoid serum induced RhoA activation. For kinetic assay, RhoA stimulation was performed by NogoA addition in the medium 5, 15 or 30 min before cell lysis (supplementary figure 2C). Functional assays were performed after 15 minutes incubation corresponding to the highest RhoA activity. Peptides were incubated one hour at 10⁻⁷M and NogoA (100ng/mL) was added 15min prior to cell lysis. RhoA activation was monitored using RhoA G-LISA activation assay (kit BK-124, Cytoskeleton) following the manufacturer's instructions. OD_{490nm} was used to monitor RhoA activity.

Proximity ligation assay

Oli-neu cells were seeded at 20,000 cells per well on Lab-Tek Permanox slides overnight, and then treated with appropriate peptide at 10^{-7} M for one hour. After fixation with 2% paraformaldehyde for ten minutes, cells were permeabilized with PBS/0.1% Triton X-100 for ten minutes. For heterodimers detection, primary antibodies (AMIGO3 21278-1-AP, Proteintech; p75NTR ab245134, Abcam and TROY AF72, R&D) were incubated together by pair overnight at 4°C in PBS. For AMIGO3 homodimer and for AMIGO3-LINGO1 heterodimer, primary antibodies were coupled with PLA probes prior to incubation with the Duolink in Situ Probemaker Plus and Minus (Sigma, Duo92010 and Duo92009; LINGO1 ab23631, Abcam coupled with PLA minus probe). The proximity ligation assay was then performed according to the manufacturer's recommendations with the "detection orange" kit (Sigma). Quantification of the dots was performed using ImageJ software.

Cell migration assay

Migration of Oli-neu cells was assessed using Transwell CIM-Plate 16 (8µm pore size filter, ACEA Biosciences) with xCELLigence RTCA DP Instrument (ACEA Biosciences). MTP-AMIGO3 (10^{-7} M), MTP-PlexinA1 (10^{-7} M) or equivalent volume of vehicle were incubated with cells one hour prior to the assay. 10 000 Oli-neu cells were seeded in the upper chamber in 150µL of medium. Chemoattraction was performed using 160µL of medium supplemented with 2% of foetal bovine serum (FBS) in the lower chamber. NogoA (Biotechne) was added to the chamber at 100ng/ml. Migration flux was analysed after six hours of migration according to the manufacturer's recommendation. Data were normalized with the positive control migration, corresponding to 2% serum, without NogoA.

EAE PLP

SJL/J female mice (nine weeks old) were immunized with the kit developed by Hooke laboratories (EK-2120). Emulsion of Myelin proteolipid protein PLP₁₃₉₋₁₅₁ fragment (HSLGKWLGHDPKF) in CFA (complete Freund's adjuvant) was administered as four subcutaneous injections of 50µL in the flank according to the manufacturer's protocol. Mice received 0.4µg of pertussis toxin intraperitoneally at the day of immunization. Sham mice (=adjuvant control mice) received only pertussis toxin and CFA without PLP. Clinical score was performed on 16 mice (vehicle n=8; MTP-AMIGO3 50µg/kg n=8). EAE was assessed clinically in blind conditions on a daily basis according to the

following criteria: 0, no symptoms; 0.5, partial limp tail; 1, complete limp tail; 1.5, hind limb ataxia; 2, hind limb paresis; 2.5, partial hind limb paralysis; 3, complete hind limb paralysis; 3.5, hind limb paralysis and fore limb paresis; 4, hind and fore limb paralysis; 5, moribund. To evaluate myelin integrity and AMIGO3 expression in oligodendrocytes, a second experiment was conducted on the same conditions to collect spinal cords at the peak. We collected the spinal cord of four vehicle and four MTP-AMIGO3 (50µg/kg) treated animals, 13 days post-immunization. We also collected sera to determine the inflammatory status of the animals.

O4⁺ cells isolation from mouse brains

To compare the variations of gene expression of AMIGO3 in oligodendrocytes, naive and EAE mice with a score of at least 1.5, were euthanized by intraperitoneal injection of a lethal dose of a ketamine-xylazine solution. Then, mice were transcardially perfused with ice-cold PBS to wash-out the blood capillaries. The brains were resected and kept in a cold HBSS, 2% FBS solution until further use. The brains were dissociated into single-cell suspensions using the Adult Brain Dissociation kit provided by Miltenyi (130-107-677) and O4 positive cells were isolated with anti-O4 microbeads provided by Miltenyi (130-096-670) following manufacturer's instructions. The purity of the isolated cell fraction was evaluated by flow cytometry (BD Accuri™ C6-Plus) using an O4 antibody (Miltenyi) (supplementary figure 3A).

RNA extraction and quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated from the isolated O4 positive cells using TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific). The RNA extraction was continued with a classic phenol-chloroform extraction. cDNA was synthesized using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) and qPCR was performed using the Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System with TaqMan Real-time PCR Master Mix (4440040) and the *Amigo3* probe (Mm00623866_s1). *Gapdh* was used as a housekeeping gene (Mm99999915_g1). The relative gene expression ratio was calculated based on the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Organotypic slices

Brain slices were obtained from 15 days postnatal mice provided by Janvier Labs (C57BL/6J). After decapitation, the brains were kept in HBSS (Sigma) with 6,5mg/ml glucose, on ice and included in a 5% agarose (Sigma) solution. Coronal slices were made with a vibratome (Leica VT 1000S) in the same media. Slices of 380µm of

thickness were placed on 0.4µm inserts (Millipore) in 6 well-plates with 1mL of media added below the inserts and cultivated in the incubator at 37°C and 5% CO₂. The slices were cultivated in: neurobasal medium (Sigma), 25% horse serum (Sigma), 1% penicillin streptomycin (Gibco), 6.5mg/ml glucose (Gibco), 12mM glutamine (Gibco). Kinetic expression of CNP and MBP markers was analysed at 4 hours until 20 days (see supplementary figure 4) after lysophosphatidylcholine (LPC) treatment (Sigma). The slices were treated with MTP-AMIGO3 (10⁻⁷M) or the vehicle, one day before treating them with 0.5mg/ml LPC for 18 hours. The culture media was then completely removed after LPC treatment and fresh media with the peptide was added to the well. Each two days, half of the media was removed and fresh media containing the peptide was added to the culture. Control slices were treated only with the vehicle (LDS), at an equivalent volume as for peptide treatment, or with vehicle/LPC 0.5mg/ml. After five days in culture, the RNA extraction was conducted. The lysis of the slices was done in TRIzol with ceramic beads using the Minilys tissue homogenizer for 30 seconds. The homogenates were centrifuged at 13 000rpm for ten minutes and the supernatants were then kept for a classical RT-qPCR analysis. 2^{-ΔΔCT} method was used for the analysis of the expression of *Cnp*, *Mbp* and *Mog* markers.

ELISA assay

Blood samples were collected at end point of the *in vivo* study (day 13) in EDTA tubes. The quantification of the IL-6 concentration in sera was performed using the Quantikine ELISA KIT for mouse IL-6 (R&D) according to the manufacturer's instruction.

Statistical analysis

Graphs were created in Prism 7 (GraphPad), and data are presented as mean ± SEM. Comparisons of one factor between two groups were analysed by unpaired *t*-test for normal distribution or Mann–Whitney test otherwise. Multiple comparisons were analysed with ANOVA and appropriate post analysis. Significance was defined for values of * *p*< 0.05, ** *p*< 0.01, *** *p*< 0.001 and **** *p*<0.0001. The number of animals per group for *in vivo* experiments was determined using the LaMorte (Boston University Medical Centre) sample size calculation method with an anticipated effect of -30% with α=0.05 and a power of 0.95. Grubb test analysis was performed to exclude significant outliers in an experimental group. Animals were randomly assigned to experimental groups and assessed in blind conditions in regard to the treatments.

Results

Prediction of AMIGO3 interactions

The interactions of AMIGO3 with other receptors is poorly described. The existence of a GxxxG motif in the TM domain of AMIGO3 prompted us to analyse whether the AMIGO3 TM domain exhibits interaction capabilities. We focused our analysis on the putative interaction with the few receptors described as potential interactors. This includes LINGO1, p75NTR and TROY. We generated contact interaction maps using the PREDDIMER routine developed by the Efremov lab (13) (figure 1A, B). All three receptors exhibited max F_{SCOR} above 2.6 (figure 1C), a threshold which has been empirically determined as representative of high probability of biological interaction. The detailed analysis of the interaction interfaces with the Protein Data Bank in Europe PISA software identified the cysteine in position 391 and the glycines 390 and 394 as the amino acids with the highest buried surface area value, meaning that they might be highly implicated in the interaction (figure 1D).

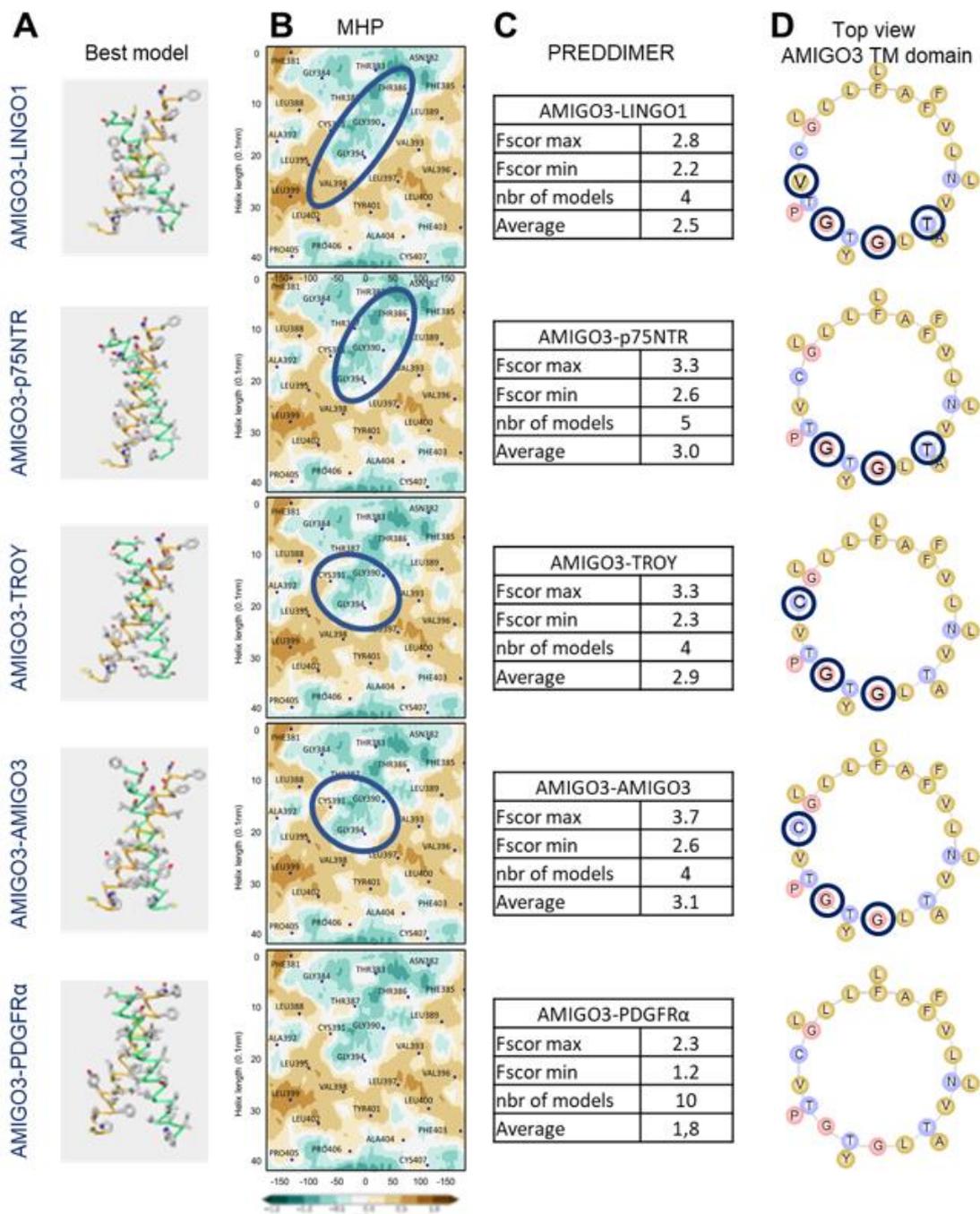


Figure 1: Prediction of AMIGO3 TM interactions using PREDDIMER software.

- (A) Three dimensional models of the best configuration predicted by PREDDIMER of AMIGO3 TM interactions with TM domains of LINGO1, p75NTR, TROY, AMIGO3 or PDGFR α .
- (B) AMIGO3 TM domain side view generated by PREDDIMER. Colours correspond to the amino acid molecular hydrophobicity potential (MHP). Predicted amino acids implicated in the interaction are circled in blue (PISA, buried surface area above 90%).
- (C) Summary of the models generated by PREDDIMER.
- (D) AMIGO3 helical view. Electrically charged amino acids are represented in purple, polar uncharged amino acids in blue, special cases in red and hydrophobic ones in yellow. Predicted amino acids implicated in the interaction are circled in blue (PISA, buried surface area above 90%).

AMIGO3 interacts with LINGO1, TROY and p75NTR.

To validate the existence of the predicted interactions, we performed a BRET assay. The full-length receptors were tagged with Rluc as a donor or with eYFP as an acceptor of energy transfer to determine the BRET ratio exemplifying dimerization. The saturation curves showed that AMIGO3 interacts in a specific manner with LINGO1, TROY and p75NTR receptors but not with the negative controls (GABA_B and PDGFR α). The best interactions were observed for AMIGO3 homodimerization and for heterodimerization with LINGO1, with a similar amplitude. Interactions of AMIGO3 with p75NTR and TROY exhibited specific BRET ratio but with reduced amplitude (-50%, figure 2A). Strikingly, when co-expressing the full length AMIGO3 receptor as a donor with the AMIGO3 TM domain only as an acceptor, we found a specific interaction while the expression of unrelated PDGFR α TM domain produced a mild and nonspecific (linear) signal (figure 2B). Then, we conducted single (C392I), double (G390V_G394V) and triple (G390V_C391I_G394V) mutations to further address the specificity of the interaction. All three mutation patterns affecting the amino acids involved in the interaction interface as predicted, induced a loss of dimerization similar to the one obtained with PDGFR α TM domain (figure 2B). Hence, we monitored to what extent the exogenous addition of a synthetic peptide mimicking the TM domain of AMIGO3 (MTP-AMIGO3) could affect dimerization of AMIGO3 with its partners. As seen in figure 3, MTP-AMIGO3 significantly reduced AMIGO3-LINGO1 interaction (-13%, $p=0.0096$), AMIGO3-p75NTR interaction (-12%, $p=0.0095$), AMIGO3-TROY interaction (-10%, $p<0.0001$) and AMIGO3-AMIGO3 homo-interaction (-16%, $p<0.0001$). Overall, these data indicate that AMIGO3 interacts with the other membrane receptors LINGO1, TROY and p75NTR. This interaction involved the TM domain of AMIGO3 and can be disrupted by the use of a peptide mimicking the TM domain of AMIGO3.

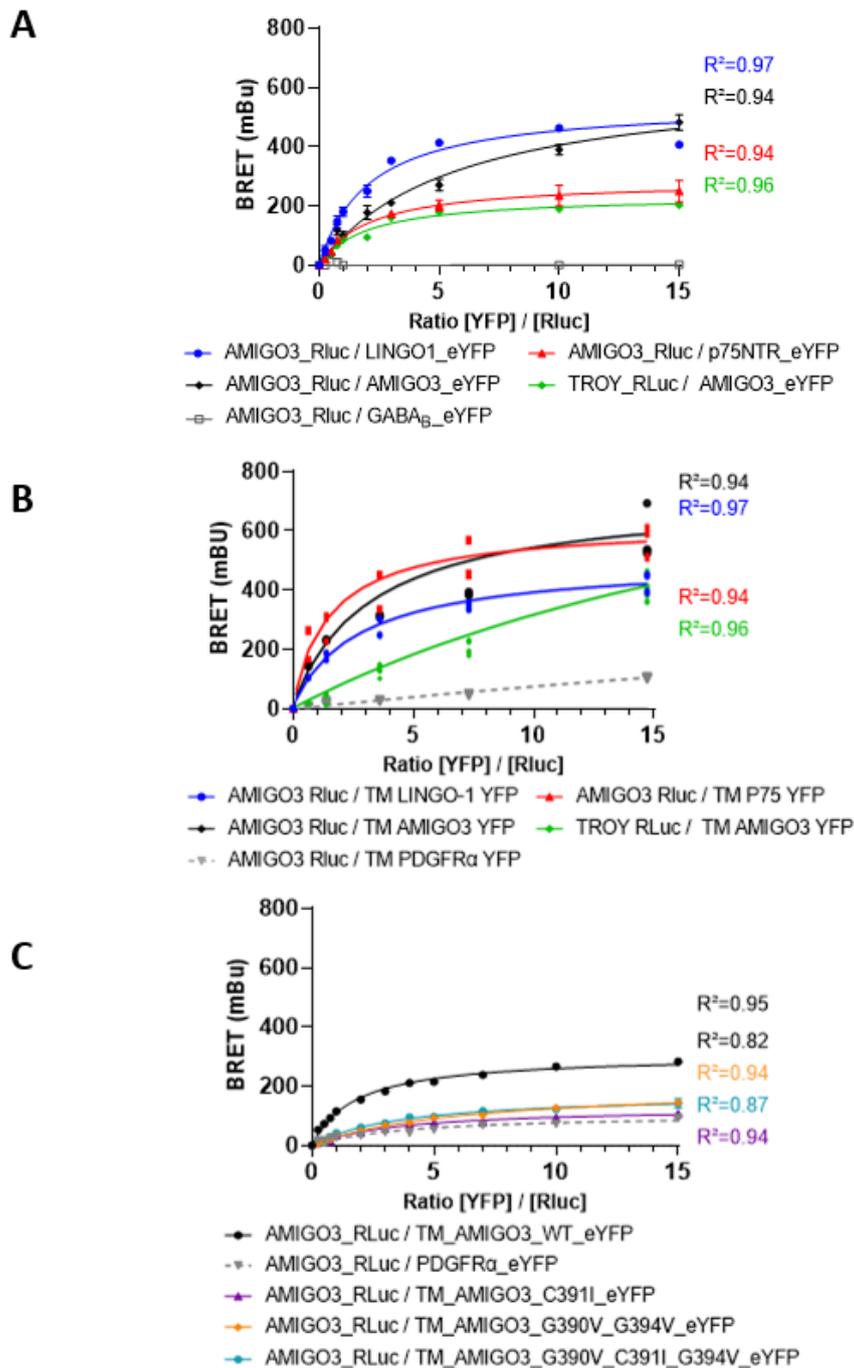


Figure 2: BRET validation of interactions between AMIGO3 and its co-receptors.

- (A) BRET saturation assay to monitor full length receptor dimerization of AMIGO3, LINGO1, p75NTR, TROY and GABA_B.
- (B) BRET saturation assay to monitor AMIGO3_RLuc full length dimerization with transmembrane domains of AMIGO3, LINGO1, p75NTR, TROY and PDGFR α .
- (C) BRET saturation assay to identify the motif of interaction between AMIGO3_RLuc full length and TM_AMIGO3. The glycines identified previously by PREDDIMER have been mutated into a valine and the cysteine into an isoleucine.

R^2 are the coefficients of determination of the one site specific binding non-linear fit curves.

N=3, experiments in duplicates.

AMIGO3-Rluc / LINGO1-YFP AMIGO3-Rluc / p75NTR-YFP TROY-Rluc / AMIGO3-YFP AMIGO3-Rluc / AMIGO3-YFP

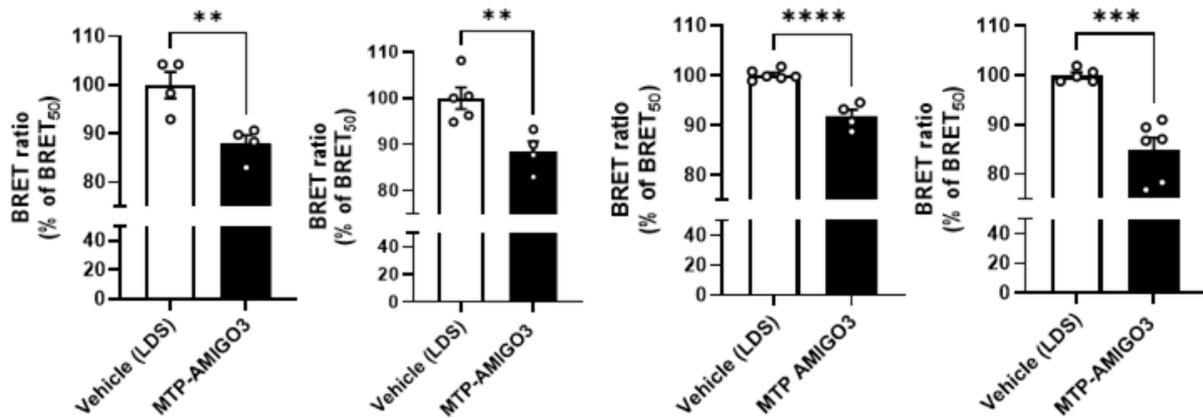


Figure 3: BRET assay to monitor the interactions between AMIGO3, LINGO1, p75NTR, TROY and AMIGO3 in the presence of MTP-AMIGO3

Full length receptor dimerization in the presence of LDS or MTP-AMIGO3 (10^{-7} M). Cells were transfected with the appropriate ratio of Rluc/YFP corresponding to BRET₅₀ value. After cell transfection, HEK293 cells were incubated overnight with the peptide or vehicle before BRET signal measurement.

**** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$, two-tailed parametric unpaired *t* test. AMIGO3-LINGO1 $p = 0.0096$; AMIGO3-p75NTR $p = 0.0095$; AMIGO3-TROY $p < 0.0001$; AMIGO3-AMIGO3 $p < 0.0001$.

Data are presented as mean \pm SEM, N=3 in duplicates.

MTP-AMIGO3 rescues oligodendrocyte migration in the presence of NogoA

To assess the contribution of AMIGO3 in the process of oligodendrocyte migration inhibition, we analysed the dimerization status of all dimers in the Oli-neu cells, previously demonstrated as a good model of oligodendrocytes (2). A proximity ligation assay showed that the addition of MTP-AMIGO3 reduced all dimers assembly: AMIGO3-LINGO1 interaction (-47%, $p = 0.0005$), AMIGO3-p75NTR interaction (-50%, $p = 0.0006$), AMIGO3-TROY interaction (-75%, $p = 0.0003$) and AMIGO3-AMIGO3 homo-interaction (-40%, $p = 0.0087$) (figure 4). Consistently, we found that MTP-AMIGO3 significantly reduced (-46%, $p < 0.0001$) NogoA-dependent Rho-GTP activity (figure 5A). Hence, this impact on NogoA signalling is sufficient to rescue Oli-neu cell migration in the presence of NogoA (figure 5B). This counteracting effect is specific of the NogoA pathway because the use of the unrelated peptide MTP-PlexA1 previously described to cancel Sema3A-mediated inhibition of Oli-neu migration was ineffective in this NogoA-dependent system (figure 5A, B).

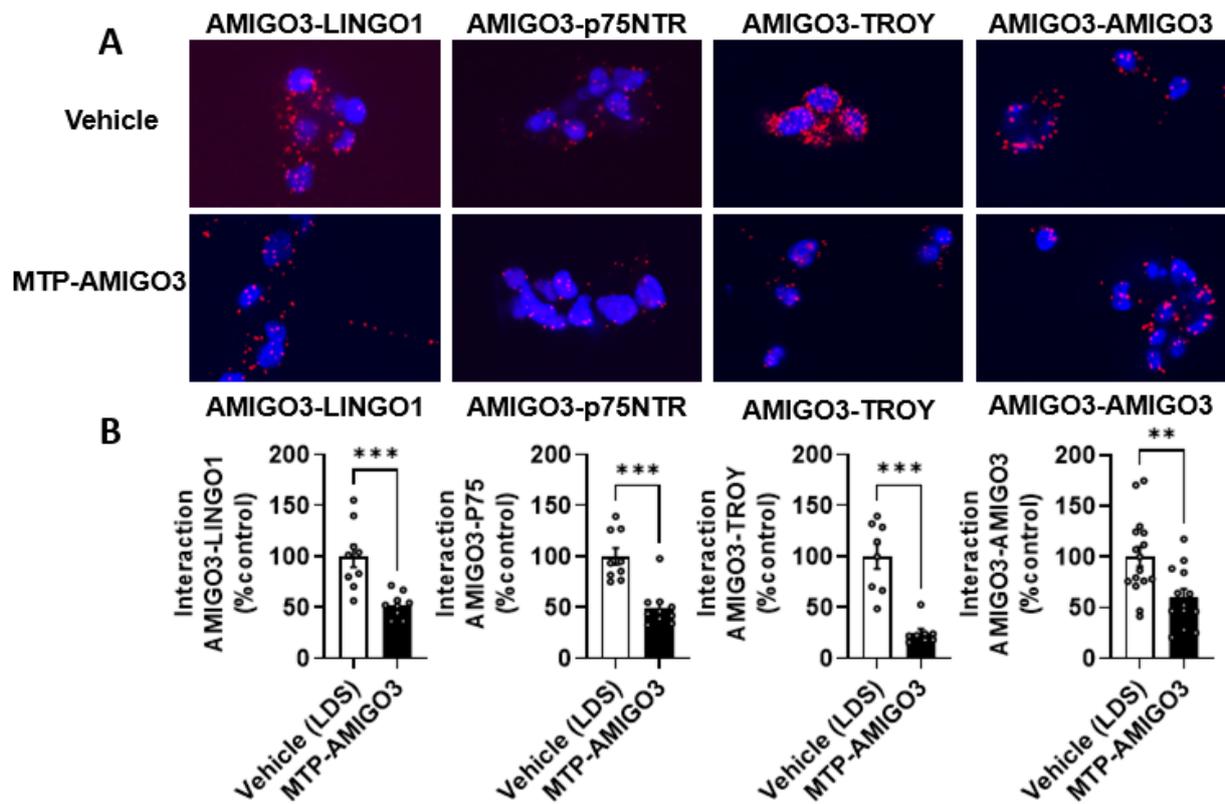


Figure 4: PLA to monitor the interactions between AMIGO3, LINGO1, p75NTR, TROY and AMIGO3 in the presence of MTP-AMIGO3.

(A) Proximity ligation assay analysis was performed to quantify AMIGO3 dimers with LINGO1, p75NTR, TROY and AMIGO3 per cells, treated with either MTP-AMIGO3 (10^{-7} M) or vehicle (LDS). Representative microphotographs illustrating the different experimental conditions.

(B) Quantification of the effect of MTP-AMIGO3 on dimer formation. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; Mann Whitney test. Data are presented as mean \pm SEM, N=8 or 16.

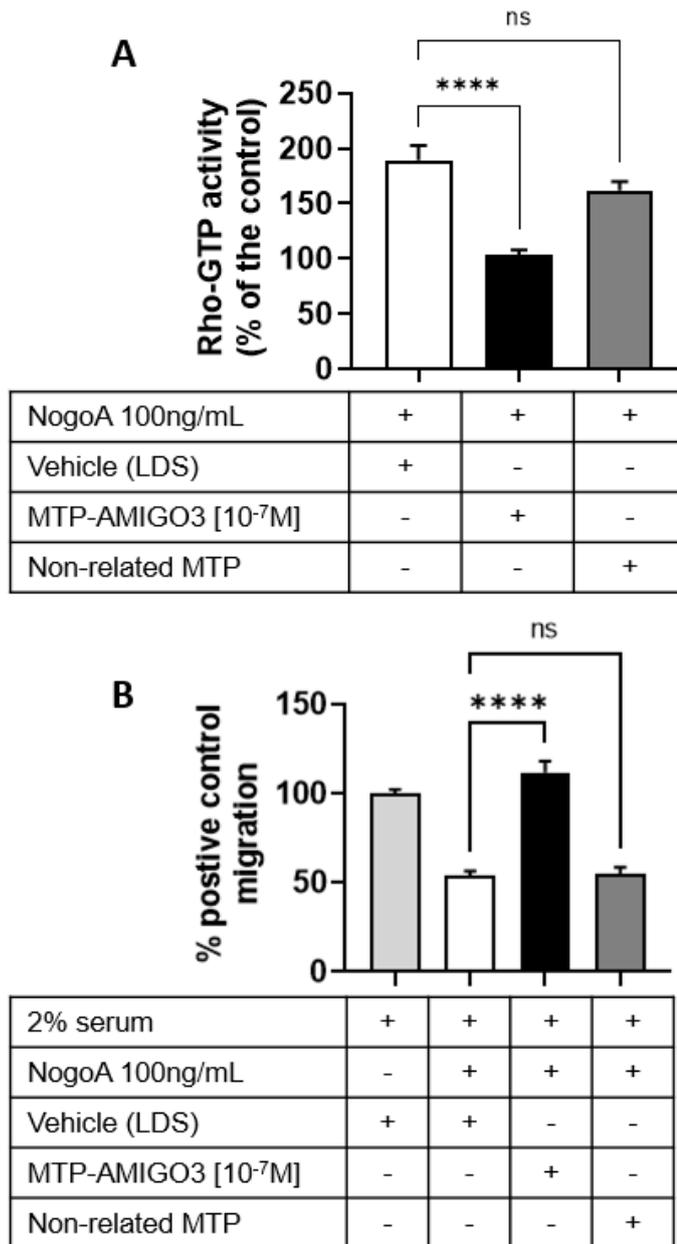


Figure 5: Evaluation of NogoA-induced RhoA activation in the presence of MTP-AMIGO3.

(A) G-LISA assay was performed to quantify Rho-GTP activity in Oli-neu cells stimulated with NogoA and then treated with either MTP-AMIGO3 (10⁻⁷M) or a non-related MTP (10⁻⁷M) or the vehicle. N=5.

(B) Oli-neu migration assay in the presence of NogoA. MTP were pre-incubated with MTP-AMIGO3, non-related MTP at 10⁻⁷M or vehicle alone. Results are expressed as a percentage of positive control migration. N=3.

**** p<0.0001; *** p<0.001; ns=not significant, one-way ANOVA test with Dunnett's multiple comparison test.

Data are presented as mean ± SEM.

MTP-AMIGO3 promotes oligodendrocyte differentiation in a context of demyelination

To address whether MTP-AMIGO3 could exert a beneficial effect in a demyelinating context, we analysed oligodendrocyte number and differentiation in an *ex vivo* model of organotypic brain slices. As seen in supplementary figure 4, these postnatal slices exhibit an expression pattern of oligodendrocyte markers *Cnp* and *Mbp* that can be monitored with RT-qPCR at different time points. Importantly, the addition of LPC known to provoke demyelinating lesions, induced a dramatic loss of *Cnp*, *Mbp* and *Mog* within five days (-71%, $p=0.0160$ for *Cnp*, -97%, $p=0.0019$ for *Mbp* and -99%, $p=0.0038$ for *Mog*, figure 6). This was followed by a progressive re-expression of the markers including an overexpression of *Mbp* at day 15 (supplementary figure 4). When repeating such experiments in the presence of MTP-AMIGO3, we found that the peptide was able to abolish the drop of *Cnp*, *Mbp* and *Mog* expression, compared to the LPC treated condition ($p=0.0170$ for *Cnp*, $p=0.0208$ for *Mbp* and $p=0.0072$ for *Mog*). This suggests that the inhibition of AMIGO3 dimerization prevents its capacity to trigger demyelination (figure 6).

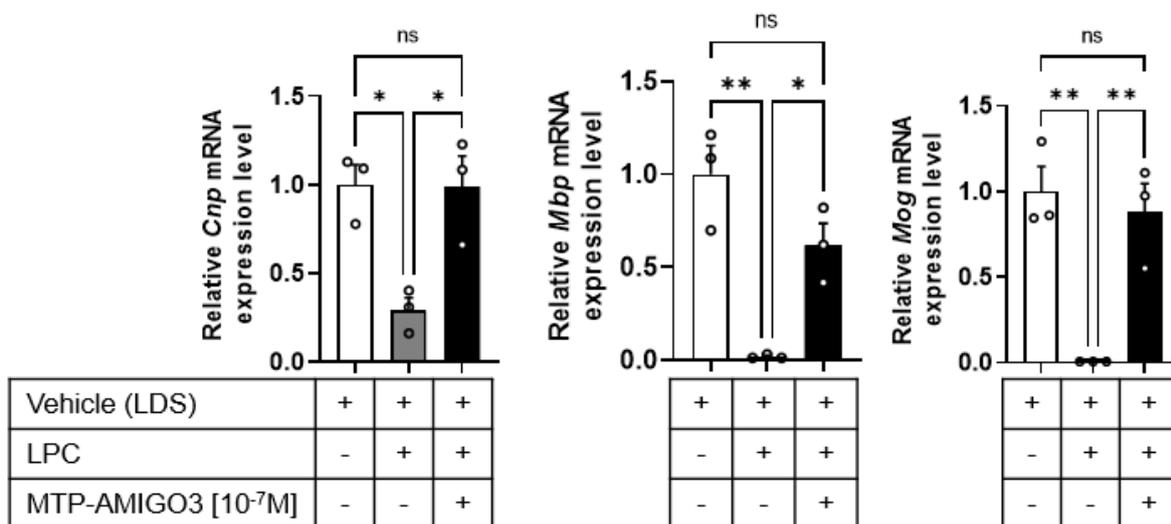


Figure 6: LPC induced demyelination in organotypic brain slices.

Cnp, *Mbp* and *Mog* mRNA expression in organotypic brain slices normalized to *Gapdh*. MTP-AMIGO3 at the final concentration of 10^{-7} M is added to the slice one day before LPC. *Cnp*, *Mbp* and *Mog* analysis is performed five days after LPC addition corresponding to the demyelination peak. Data are compared to the vehicle condition.

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns=not significant, one-way ANOVA test with Tukey's multiple comparison test.

Data are presented as mean \pm SEM, N=3 in triplicates.

MTP-AMIGO3 improves clinical scores in the EAE multiple sclerosis model

Previous studies using similar TM domain peptides showed the possibility to use membrane targeting peptides *in vivo* (2,16). Here, we challenged the biological activity of MTP-AMIGO3 in the context of the multiple sclerosis model EAE-PLP. The MTP-AMIGO3 treatment was administrated one day after EAE induction and was continued every three days for a total of three weeks at a dose of 50µg/kg. Blood sampling at the peak of the disease (day 13) showed that the overall inflammation status, determined as the IL-6 activity, was similar in both experimental groups thereby excluding an anti-inflammatory effect of MTP-AMIGO3 (figure 7A). However, we found that MTP-AMIGO3 significantly reduced the severity of the clinical symptoms (figure 7B). As exemplified in figure 7C, the fraction of animals exhibiting a severe clinical score (>2) was 50% reduced with MTP-AMIGO3 (8/8 in the control group and 4/8 in the MTP-AMIGO3 group, $p=0.031$).

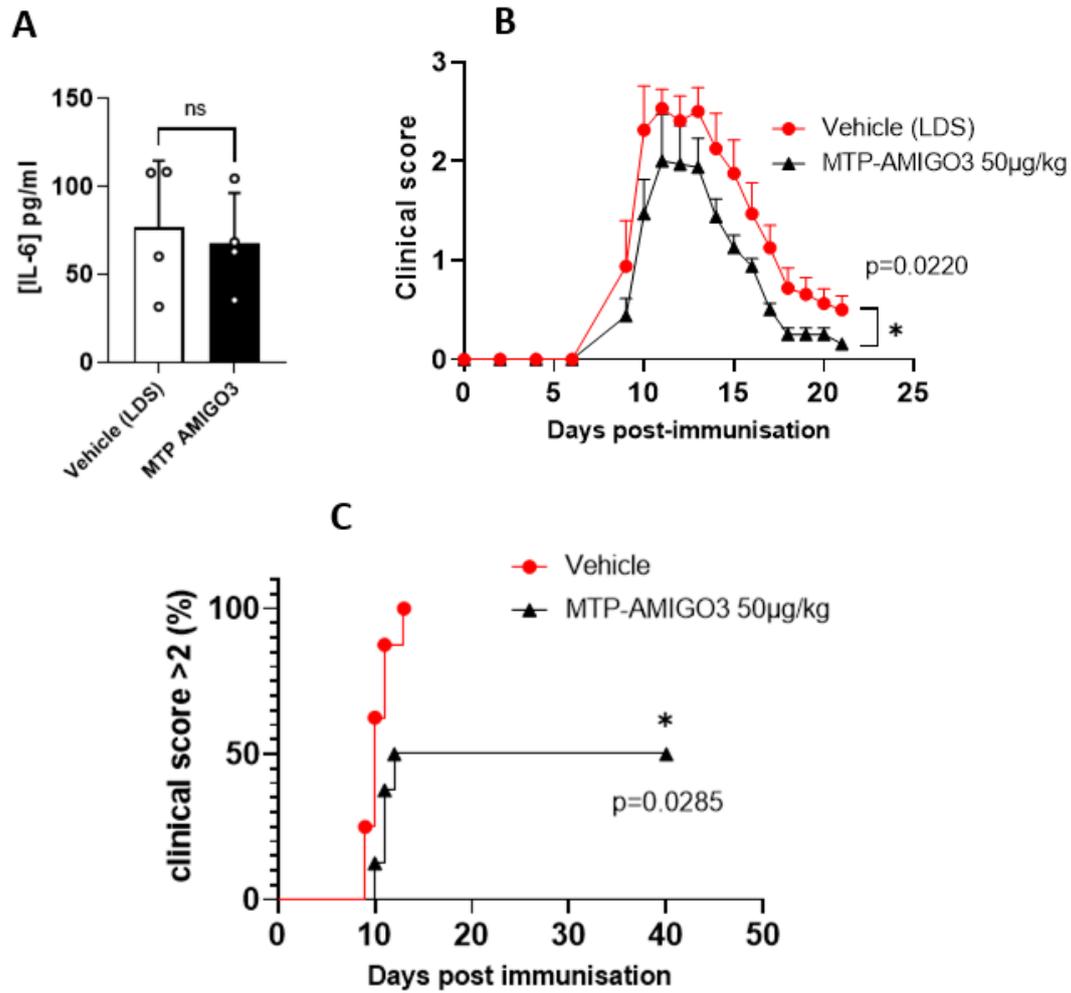


Figure 7: MTP AMIGO3 on the EAE PLP mouse model.

- (A) Quantification of circulating IL-6 in mouse blood samples at the peak of the disease., ns=not significant, Mann Whitney test. Data are presented as mean \pm SEM, N=4 per group.
- (B) Analysis of the clinical signs of the disease after MTP-AMIGO3 treatment (50µg/kg) or in the vehicle group. * p<0.05, Two-way ANOVA test. Data are presented as \pm SEM, N=8 in the vehicle group and N=8 in the MTP-AMIGO3 group.
- (C) Determination of the number of mice with a clinical score above 2. * p<0.05, Log-rank (Mantel-Cox) test for survival curves.

Discussion

AMIGO3 is a leucine-rich repeat containing membrane receptor closely related to LINGO1, which is a potent inhibitor of axon growth and myelination (18). AMIGO3 is expressed in astrocytes, neurons, and oligodendrocytes (8,19) and is considered as a substitute of LINGO1, explaining the lack of success of clinical trials targeting LINGO1 as a therapy for demyelinating diseases. In this context, we explored the dimerization capability of AMIGO3 with the membrane receptors defining the signalling platform of myelin inhibitory factors, LINGO1-p75NTR/TROY. Because of the existence of a canonical GxxxG motif in the transmembrane domain of AMIGO3 we anticipated its possible involvement in homo- and/or heterodimerization. The prediction tools PREDDIMER and PDBePISA enabled us to identify interacting motives on the same side of the helix of AMIGO3 TM domain. These motives include a GCxxG motif for the homodimerization of AMIGO3 and the heterodimerization with TROY, a TxxxGxxxG motif for the dimerization with p75NTR and a TxxxGxxxG motif for the dimerization with LINGO1. PREDDIMMER forces the alignments of predicted helices and the best F_{SCOR} can be used as an indicator of the probability of real biological interactions. Our empirical approach with several single pass transmembrane receptors showed that only scores above 2.6 are translating into biological interactions (2,16,20–22). Here, we obtained maximum F_{SCOR} above 2.6 for all the tested pairs of receptors, suggesting the high capacity of the AMIGO3 TM domain to dimerize. However, the simulation of the AMIGO3 TM domain interaction with PDGFR α TM domain retrieved a low F_{SCOR} (2.3), defining a negative control in which buried surface areas of all amino acids did not reach a sufficient value to indicate interactions. To address the biological relevance of the predictions, we performed a BRET assay at the whole target receptor level but also at the TM domain of the receptors level. This approach confirmed that full length AMIGO3 homodimerizes and exhibits interactions with full length LINGO1, p75NTR and TROY proteins. These interactions also involve the TM domain for homodimerization and heterodimerization with LINGO1, p75NTR and TROY. No specific signals were obtained for the interactions with the negative control PDGFR α TM domain. This last result is further confirming the specificity of the other interactions measured. Point mutations in the AMIGO3 TM domain revealed that a single mutation of the cysteine C₃₉₁ was sufficient to lose homodimerization. The two glycines G₃₉₀ and G₃₉₄ were also shown as required for homodimerization. Furthermore, it was possible

to modulate the interactions of full-length proteins by introducing in the BRET system a synthetic version of the AMIGO3 TM domain (MTP-AMIGO3), confirming the possibility to modulate its interactions. A proximity ligation assay confirmed the ability of MTP-AMIGO3 to disrupt homo- and heterodimers formed by AMIGO3. Furthermore, MTP-AMIGO3 was able to significantly disrupt AMIGO3-TROY heterodimer, suggesting that blocking AMIGO3 TM domain also impacts whole protein interactions not requiring the TM domain, presumably through conformational changes. The observed disruption of dimers is consistent with the suppression of NogoA-mediated Rho-GTP inhibition in oligodendrocytes, thereby counteracting the inhibitory effect of this key MAI. The inhibition of NogoA signalling cancelled the inhibitory effect on oligodendrocytes migration. These effects were specifically related to the addition of MTP-AMIGO3 because the use of another MTP with pro-remyelination capacities, targeting Plexin-A1 (2), was unable to cancel the repercussions of NogoA. Hence, using organotypic slices, we found that MTP-AMIGO3 exerted a protective effect on oligodendrocytes by compensating the decrease of expression of *Cnp* and *Mbp* in slices subjected to LPC-mediated demyelination. In this model, LPC induces a progressive loss of the oligodendrocyte (CNP) and the myelin (MBP) markers, with a maximum five days after incubation. This depletion is followed by a restoration of normal levels of *Cnp* and *Mbp* after twenty days. MTP-AMIGO3 was added to the culture medium at the same day as LPC and exerted a protective effect by impeding the dramatic loss of *Cnp* and *Mbp*. Taken together, these results are consistent with the proposed role of AMIGO3 in the negative control of myelination. The association of AMIGO3 with the other members of the MAIs signalling platform contributes to trigger inhibitory signals leading to defects of the migration and differentiation of oligodendrocytes. Because MTP-AMIGO3 was able to cancel NogoA and LPC effects *in vitro*, we decided to investigate whether this property could be sufficient *in vivo* to protect against induced demyelination. In addition, the collection of tissues and the sorting of oligodendrocytes from mouse EAE and naive brains showed that AMIGO3 was upregulated at the peak of the disease in the EAE model, demonstrating the contribution of AMIGO3 in the disease development (supplementary figure 3B). Thus, we administrated the peptide MTP-AMIGO3 one day after EAE induction every three days and monitored the development of clinical symptoms reflecting multiple sclerosis. In this EAE model, we found that the animals treated with MTP-AMIGO3 exhibited a general reduction of the clinical scores during the whole period of the treatment.

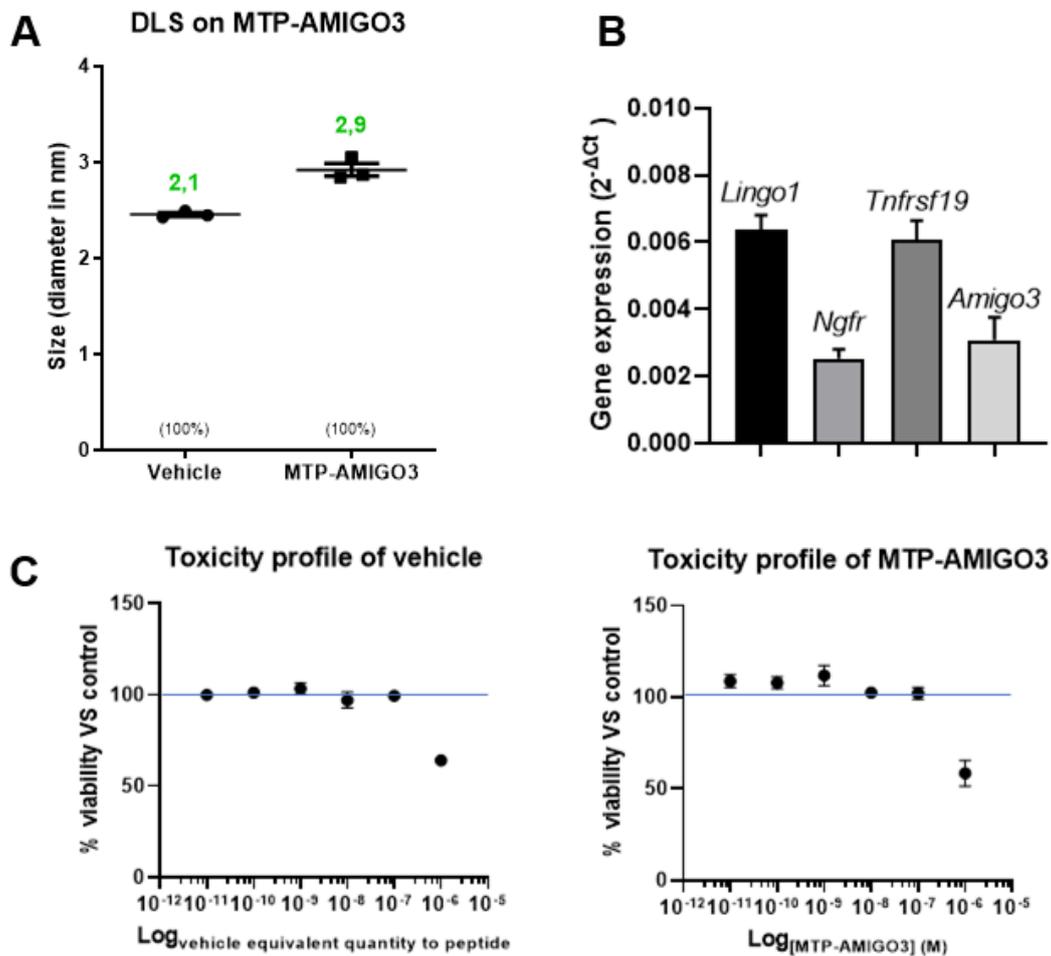
Moreover, the severity of the disease was 50% reduced when compared to control animals. However, as no impact on the general inflammatory status of the animals was observed, the induction of the inflammatory lesions leading to clinical symptoms could not be prevented.

As a conclusion, our study clarified the pattern of interactions of AMIGO3 with MAIs signalling receptors. We found that the TM domain of AMIGO3 is involved in homo- and hetero-interactions. The peptide mimicking the AMIGO3 TM domain (MTP-AMIGO3) turns out to be a potent inhibitor of these interactions and thus a potent inhibitor of MAI. Consistently, MTP-AMIGO3 showed a therapeutic potential by reducing the clinical symptoms of EAE mice receiving a low dose of the peptide (50µg/kg) every three days for four weeks. While it remains to clarify whether the therapeutic effects are due to a neuroprotective effect or a direct pro-remyelination capability, the whole study strengthens the idea that AMIGO3 is an interesting therapeutic target deserving further investigation in the context of demyelinating diseases.

References

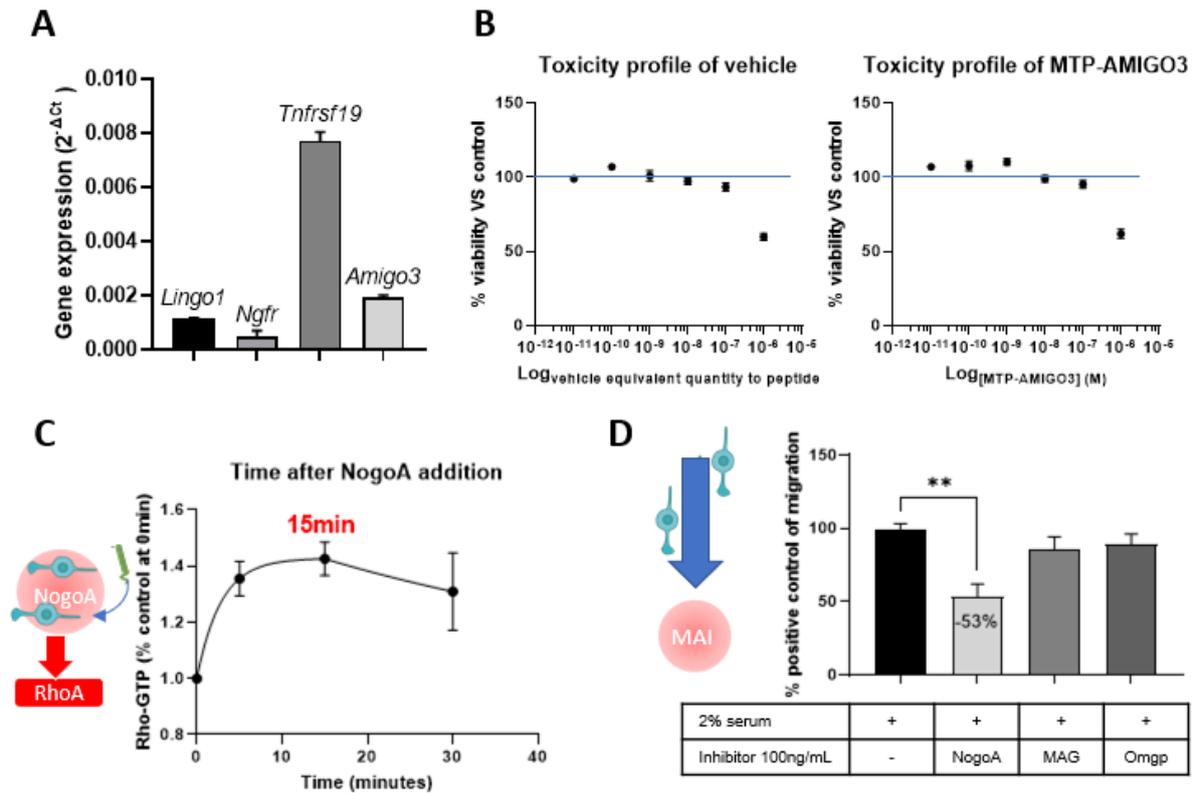
1. Williams A, Piaton G, Aigrot MS, Belhadi A, Théaudin M, Petermann F, et al. Semaphorin 3A and 3F: key players in myelin repair in multiple sclerosis? *Brain J Neurol.* 2007;130(Pt 10):2554-65.
2. Biname F, Pham-Van L, Spenle C, Jolivel V, Birmpili D, Meyer L, et al. Disruption of Sema3A/Plexin-A1 inhibitory signalling in oligodendrocytes as a therapeutic strategy to promote remyelination. *EMBO Mol Med.* 2019;11(11):e10378.
3. Binamé F, Pham-Van LD, Bagnard D. Manipulating oligodendrocyte intrinsic regeneration mechanism to promote remyelination. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2021;78(13):5257-73.
4. Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, et al. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci.* 2004;7(3):221-8.
5. Mi S, Miller RH, Lee X, Scott ML, Shulag-Morskaya S, Shao Z, et al. LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci.* 2005;8(6):745-51.
6. Mi S, Hu B, Hahm K, Luo Y, Kam Hui ES, Yuan Q, et al. LINGO-1 antagonist promotes spinal cord remyelination and axonal integrity in MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med.* 2007;13(10):1228-33.
7. Jepson S, Vought B, Gross CH, Gan L, Austen D, Frantz JD, et al. LINGO-1, a transmembrane signaling protein, inhibits oligodendrocyte differentiation and myelination through intercellular self-interactions. *J Biol Chem.* 2012;287(26):22184-95.
8. Ahmed Z, Douglas MR, John G, Berry M, Logan A. AMIGO3 is an NgR1/p75 co-receptor signalling axon growth inhibition in the acute phase of adult central nervous system injury. *PLoS One.* 2013;8(4):e61878.
9. Sun L, Liu S, Sun Q, Li Z, Xu F, Hou C, et al. Inhibition of TROY promotes OPC differentiation and increases therapeutic efficacy of OPC graft for spinal cord injury. *Stem Cells Dev.* 2014;23(17):2104-18.
10. Cadavid D, Mellion M, Hupperts R, Edwards KR, Calabresi PA, Drulović J, et al. Safety and efficacy of opicinumab in patients with relapsing multiple sclerosis (SYNERGY): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol.* 2019;18(9):845-56.

11. Foale S, Berry M, Logan A, Fulton D, Ahmed Z. LINGO-1 and AMIGO3, potential therapeutic targets for neurological and dysmyelinating disorders? *Neural Regen Res.* 2017;12(8):1247-51.
12. Almutiri S, Berry M, Logan A, Ahmed Z. Non-viral-mediated suppression of AMIGO3 promotes disinhibited NT3-mediated regeneration of spinal cord dorsal column axons. *Sci Rep.* 2018;8(1):10707.
13. Polyansky AA, Chugunov AO, Volynsky PE, Krylov NA, Nolde DE, Efremov RG. PREDDIMER: a web server for prediction of transmembrane helical dimers. *Bioinformatics.* 2014;30(6):889-90.
14. Krissinel E, Henrick K. Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. *J Mol Biol.* 2007;372(3):774-97.
15. Jung M, Krämer E, Grzenkowski M, Tang K, Blakemore W, Aguzzi A, et al. Lines of murine oligodendroglial precursor cells immortalized by an activated neu tyrosine kinase show distinct degrees of interaction with axons in vitro and in vivo. *Eur J Neurosci.* 1995;7(6):1245-65.
16. Jacob L, Sawma P, Garnier N, Meyer LAT, Fritz J, Hussenet T, et al. Inhibition of PlexA1-mediated brain tumour growth and tumour-associated angiogenesis using a transmembrane domain targeting peptide. *Oncotarget.* 2016;7(36):57851-65.
17. Cobret L, De Tauzia ML, Ferent J, Traiffort E, Hénaoui I, Godin F, et al. Targeting the cis-dimerization of LINGO-1 with low MW compounds affects its downstream signalling. *Br J Pharmacol.* 2015;172(3):841-56.
18. Song XJ, Han W, He R, Li TY, Xie LL, Cheng L, et al. Alterations of Hippocampal Myelin Sheath and Axon Sprouting by Status Convulsion and Regulating Lingo-1 Expression with RNA Interference in Immature and Adult Rats. *Neurochem Res.* 2018;43(3):721-35.
19. Kuja-Panula J, Kiiltomäki M, Yamashiro T, Rouhiainen A, Rauvala H. AMIGO, a transmembrane protein implicated in axon tract development, defines a novel protein family with leucine-rich repeats. *J Cell Biol.* 2003;160(6):963-73.
20. Roth L, Nasarre C, Dirrig-Grosch S, Aunis D, Crémel G, Hubert P, et al. Transmembrane Domain Interactions Control Biological Functions of Neuropilin-1. *Mol Biol Cell.* 2008;19(2):646-54.
21. Arpel A, Sawma P, Spenlé C, Fritz J, Meyer L, Garnier N, et al. Transmembrane domain targeting peptide antagonizing ErbB2/Neu inhibits breast tumor growth and metastasis. *Cell Rep.* 2014;8(6):1714-21.
22. Arpel A, Gamper C, Spenlé C, Fernandez A, Jacob L, Baumlin N, et al. Inhibition of primary breast tumor growth and metastasis using a neuropilin-1 transmembrane domain interfering peptide. *Oncotarget.* 2016;7(34):54723-32.



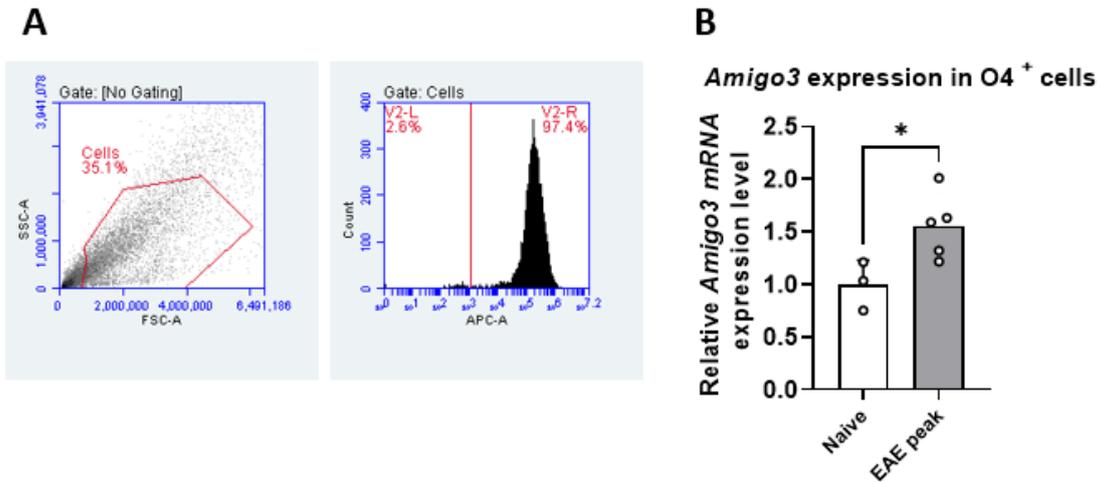
Supplementary figure 1: MTP-AMIGO3 validation and analysis of HEK293 cells: expression of MIF and toxicity of MTP-AMIGO3.

- (A) Quality control of the micelles size in the vehicle and MTP-AMIGO3 by dynamic light scattering (DLS). Green values represent the micelles size. Numbers in brackets represent the fraction of the solution displaying this micelles size.
- (B) Expression of *Lingo1*, *Ngfr* (p75NTR), *Tnfrsf19* (TROY) and *Amigo3* in the HEK293 cell line analysed by RT-qPCR. *Gapdh* was used as housekeeping gene to normalize expression, N=2.
- (C) Assessment of peptide toxicity on HEK293 cells using MTT assay. Cells were incubated during four hours before MTT addition.



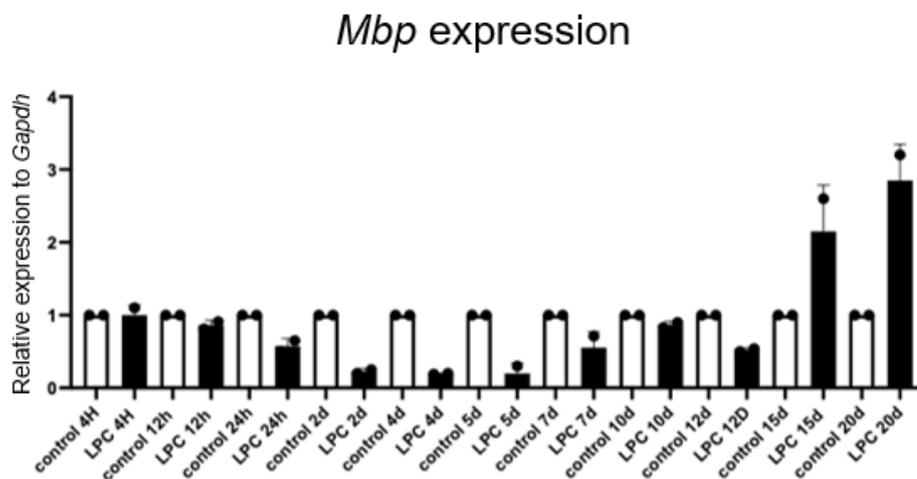
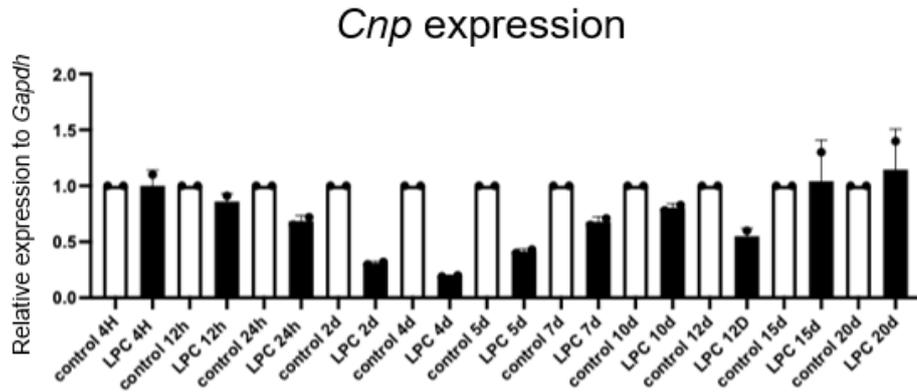
Supplementary figure 2: Analysis of Oli-neu cells: expression of MIF, toxicity of MTP-AMIGO3 and effect of NogoA.

- (A) Expression of *Lingo1*, *Ngfr*, *Tnfrsf19* and *Amigo3* in the Oli-neu cell line analysed by RT-qPCR. *Gapdh* was used as housekeeping gene to normalize expression. N=2.
- (B) Assessment of peptide toxicity on Oli-neu cells using MTT assay. Cells were incubated during four hours before MTT addition.
- (C) G-LISA assay was conducted to determine RhoA activation after NogoA incubation on Oli-neu cells.
- (D) Migration of Oli-neu cells was assessed in response to 2% serum and in the presence of NogoA, MAG or Omgp. ** p<0.01, Kruskal-Wallis test for multiple comparisons. Data are presented as mean ± SEM, N=3.



Supplementary figure 3: Characterisation of the O4⁺ extracted cells.

- (A) O4 positive oligodendrocytes were isolated from adult murine brains of naive and EAE mice at the peak of the disease. The purity of the isolated fraction was assessed by flow cytometry using an O4 antibody.
- (B) RT-qPCR analysis showed a significant upregulation of the gene expression of *Amigo3* in the oligodendrocytes of EAE mice compared to the naive condition. *Gapdh* was used as housekeeping gene to normalize expression. * $p < 0.05$, two-tailed parametric unpaired *t* test. Data are presented as mean \pm SEM, N=3.



Supplementary figure 4: Expression of *Cnp* and *Mbp* after LPC induced demyelination in organotypic brain slices.

Demyelination is induced by addition of LPC at 0.5 mg/mL in the medium. *Cnp* and *Mbp* expression are analysed by RT-qPCR. *Gapdh* was used as housekeeping gene to normalize expression. 3 slices per condition, N=2.

II. Implication du domaine TM dans l'oligomérisation du récepteur de l'interleukine-10

Résumé 3 :

Implication du domaine transmembranaire dans l'oligomérisation de la plateforme du récepteur de l'interleukine-10.

Implication of transmembrane domain in interleukine-10 receptor platform oligomerisation.

L'interleukine-10 (IL-10) possède un rôle anti-inflammatoire et de régulation immunitaire par sa fixation sur le récepteur IL-10 (IL-10R). Les deux sous-unités (IL-10R α et IL-10R β) s'organisent pour former un hétérotétramère capable d'induire l'activation du facteur de transcription STAT3. Parmi toutes les conséquences, cette cascade de signalisation est capable de moduler la polarisation des macrophages et de la microglie et donc leurs activités. Ces polarisations ont des implications profondes dans de nombreuses pathologies car un dérèglement des activités des macrophages est souvent observé. Les preuves sur les nombreux rôles dans l'oligomérisation et l'activation de récepteurs membranaires du segment transmembranaire, nous ont encouragés dans cet article, à étudier l'implication du domaine TM dans l'oligomérisation du récepteur de l'IL-10. Nous avons également ciblé ce domaine TM de l'IL-10R avec des peptides mimant les séquences TM des sous-unités dans le but de rééquilibrer la polarisation des macrophages et de la microglie dans deux pathologies dans lesquelles ces cellules sont connues pour être impliquées : la sclérose en plaques et le glioblastome. Les résultats démontrent pour la première fois que les domaines TM des deux sous-unités participent à l'activation du récepteur et sont caractérisés par des acides aminés définissant un motif non canonique de dimérisation. L'approche de ciblage avec des peptides TM semble adaptée pour moduler la polarisation par son action sur les capacités de dimérisation des domaines TM, mais n'est pas suffisante pour contrecarrer la progression des deux pathologies sélectionnées.

Implication of transmembrane domain in interleukine-10 receptor platform oligomerisation.

Thomas Kuntzel¹, Caroline Spenlé¹, Dafni Birmpili¹, Lucas D. Pham-Van¹, Aurélien Riou¹, Aurore Loeuillet¹, Imane Charmarke-Askar¹ and Dominique Bagnard^{*1,2}

*Corresponding author

1: UMR7242 Biotechnology and Cell signalling, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg Drug Discovery and Development Institute (IMS), University of Strasbourg, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France.

2: Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France.

Abstract

Interleukin-10 (IL-10) exerts anti-inflammatory and immune regulatory roles through its fixation to the IL-10 receptor (IL-10R). The two subunits (IL-10R α and IL-10R β) organise themselves to form a heterotetramer capable to induce the activation of the transcription factor STAT3. Amongst all the consequences, this signalling cascade is able to modulate the polarisation of macrophages and microglia and thereby their activities. Those polarisations have profound implications in several diseases as a dysregulation of macrophages activities is often observed. We analysed the activation patterns of the IL-10R, especially the contribution of the transmembrane (TM) domain of the IL-10R α and IL-10R β subunits, as evidence accumulates that this short domain has tremendous implications in receptor oligomerisation and activation. We also addressed whether targeting the TM domain of IL-10R with peptides mimicking the TM sequences of the subunits could be an option to rebalance macrophage and microglia polarisation in two diseases in which these cells are known to be implicated: multiple sclerosis and glioblastoma. The results demonstrate for the first time, that the TM domains of the two subunits participate in the activation of the receptor and are characterised by specific amino acids essential for the interaction. The TM peptide targeting approach appears to be suitable for modulating polarization through its action

on the dimerization capabilities of the TM domains but is not sufficient to counteract the progression of the two selected pathologies.

Introduction

The IL-10 receptor is composed of a heterodimer of two subunits: IL-10R α , which is exclusive and has a high affinity for IL-10 and IL-10R β , which has low-affinity and is shared with other receptors (1). IL-10 is secreted as a homodimer, interacting with two copies of the heterodimeric receptor complex (2). These interactions have been demonstrated by cryogenic electron microscopy for the extracellular domain of the receptor (3). For the transmembrane part of the receptor however, no data are showing its implication in the oligomerisation of the subunits, nor the transduction of the signal. After recognition of the ligand, the receptor induces the activation of intracellular kinases, leading to the activating phosphorylation of the transcription factor STAT3 (1,4). This signalling is responsible for anti-inflammatory consequences on the cells, like inhibition of the secretion of pro-inflammatory cytokines by monocytes, macrophages and CD4⁺ T cells. IL-10 signalling also favours survival, proliferation and activation of B cells and CD8⁺ T cells (5,6).

Macrophage polarisation is a long-described phenomenon conducive to debate. These immune cells have the ability to endorse several phenotypes with opposite effects. The extremes of these phenotypes are called M1 for pro-inflammatory macrophages and M2 for anti-inflammatory ones (7). This description is oversimplified and in reality, polarisation has a high plasticity and macrophages adopt a phenotype situated on a continuum between these extremes (8). However, in pathological situations, circulating and resident macrophages are often implicated with a dysregulation of their polarisation state. An imbalance between the M1 and M2 markers of polarisation is described. In multiple sclerosis (MS) for example, macrophages and microglia are partly responsible for the destruction of the myelin sheath and the damaging of the axons. In this case, it has been shown that the imbalance of M1 and M2 markers is in favour of M1, pro-inflammatory markers (9,10). In glioblastoma, tumour associated macrophages (TAMs) favour tumorigenesis, promote angiogenesis and proliferation of tumour cells. Interestingly, their phenotype tends toward a M2-like, anti-inflammatory activity (10–12). To define a phenotype for these cells, several markers are used depending on their effects. For the definition of M2-like polarisations, markers with anti-inflammatory activities are assessed. One of these markers is IL-10

and its receptor, known for their strong anti-inflammatory effect (13,14). Targeting the polarisation state of macrophages could be beneficial in these pathological states, by inhibiting the detrimental activities they display.

Here, we assessed the implication of the TM domain in IL-10R oligomerisation and determined if it can be targeted in order to interfere with its signalling. We then established if modifying the activation of IL-10R is translated into biological consequences.

Materials and methods

In silico simulation tools

For *in silico* simulations, two tools were used: PREDDIMER and PDBePISA. The first was developed by A.A. Polyansky and P.E. Volynsky in the R.G. Efremov lab (15). It permits to predict the structure of dimeric transmembrane helices. From the TM sequences, it can reconstruct dimer structures, rank and filter them with a scoring function (F_{SCOR}), generate three-dimension structures and display the hydrophobicity of the helices and their interacting interfaces on two dimensional maps (15). The second tool, PDBePISA (Protein Data Bank of Europe, Proteins, Interfaces, Structures and Assemblies) was developed by E. Krissinel and K. Henrick (16). It allows the exploration of macromolecule interfaces based on several physicochemical properties (free energy of complex formation, solvation energies, interaction surface, hydrogen bonds, hydrophobicity) and to determine the buried surface area (BSA) of each amino acid (16).

Cell culture

RAW264.7 and BV-2 cells were cultured in a 10cm petri dish filled with DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) High glucose (4,5 g/L) with stable glutamine and sodium pyruvate (Dutscher), supplemented with 10% inactivated foetal bovine serum (FBS, Gibco) and 1% penicillin-streptomycin (10,000U/mL-10mg/mL, PanBiotech), in an incubator at 37°C with 5% CO₂.

HEK-293 cells were cultured in a 10cm diameter petri dish filled with DMEM High glucose (4,5 g/L) with stable glutamine and sodium pyruvate, supplemented with 10% inactivated foetal bovine serum, in an incubator at 37°C with 5% CO₂.

Peptides

Peptides were synthesized by the Peptide Specialty Laboratories GmbH by solid phase peptide synthesis (Fmoc chemistry). The peptide corresponding to the TM sequence of IL-10R α : KGDLVISMLLFCGILVCLVLQWYIRKR (in one-letter code) is referred as MTP-IL-10R α . The peptide corresponding to the TM sequence of IL-10R β : KGDAIILIVSVLVVFLFLLGRKR (in one-letter code) is referred as MTP-IL-10R β . Peptides purity estimated by RP-HPLC was more than 90% according to manufacturer indication. Peptide powders were solubilized at $3 \cdot 10^{-4}$ M in dimethylsulfoxide (DMSO, Eurisotop). For *in vitro* experiments, this stock solution was further diluted in DMSO and medium. For the EAE PLP *in vivo* experiment this stock solution was diluted in Phosphate-Buffered Saline (PBS) at 10 μ g/kg. For orthotopic grafting *in vivo* experiments, peptides were solubilized at 1mg/mL in 72mM lithium dodecyl sulfate (LDS, Sigma) and further diluted in PBS for a use at 10 μ g/kg.

BRET assay

The sequences of the receptors to test were cloned into plasmids, encoding either for the Renilla luciferase Rluc (as a donor, plasmid pRL-CMV E2261, Promega) or the enhanced Yellow Fluorescent Protein eYFP (as an acceptor, plasmid pEYFP-N1, 6006-1, Clontech). Plates for transfection were prepared using a Biomek FX^P pipetting robot (Beckman Coulter). In each well of 96 well-plates (Greiner), a combination of an Rluc and eYFP expressing plasmid diluted at right concentration in 20 μ L Tris-EDTA (TE) buffer (Sigma) was deposited with 8 μ L CaCl₂ (Sigma) and 26 μ L BES (Sigma). HEK293 cells were seeded in a 1/200 collagen I-coated (4mg/mL, Sigma) 96 well-plate (Corning) at 20,000 cells per well in DMEM High glucose supplemented with 10% inactivated FBS. All the following steps were performed using the FX^P pipetting robot. 24h after seeding, cells were transfected with the transfection medium prepared upstream. After four hours, transfection medium was removed and cells were washed with PBS. DMEM High glucose (4.5 g/L) without sodium pyruvate and phenol red (Sigma), supplemented with 10% inactivated FBS and 1% L-glutamine (Sigma) was then added for 24h. Afterwards, medium was removed, cells were again washed with PBS and medium was replaced by HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Sigma). Using a Biomek NX^P pipetting robot (Beckman Coulter), coelenterazine H (Interchim) at a final concentration of 5 μ M was added. Finally, BRET signal was assessed by measuring bioluminescent and fluorescent signals at 37°C at 485 ± 10 nm and $535 \pm$

12nm respectively, using a Victor Light (Perkin) reader. BRET ratio was calculated using the following formula:

$$BRET\ ratio = \left(\frac{Fluorescence\ signal\ (eYFP)_{test}}{Bioluminescence\ signal\ (Rluc)_{test}} - \frac{Fluorescence\ signal\ (eYFP)_{ctrl\ Rluc}}{Bioluminescence\ signal\ (Rluc)_{ctrl\ Rluc}} \right) \times 1000.$$

Where “test” corresponds to the co-transfected condition and “ctrl Rluc” to the Rluc transfected alone condition (background signal) (17).

Final BRET ratio is expressed in milliBRET units (mBu). BRET_{max} corresponds to the maximal BRET ratio recorded in mBu and BRET₅₀ corresponds to 50% of the BRET_{max} signal. Fluorescence was also assessed with EnVision Multimode plate reader (Perkin Elmer) at 535nm after excitation at 485nm to control transfection efficacy. For BRET saturation assays, the concentration of Rluc plasmid remains the same in each condition, whereas an increasing concentration of eYFP plasmid is added. If the BRET ratio curves obtained are not linear, with a R²>0.70, the signal obtained is specific. On the contrary, if the curve is linear, the result obtained is not specific, and corresponds to BRET of collision.

MTT assay

The potential toxicity of MTP peptides is assessed by an MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay. RAW264.7 or BV-2 cells were seeded at 5000 cells per well in 100µL of medium in a 96-well plate. The conditions tested are DMSO at a concentration of 0.5% and each peptide, at a concentration of 10⁻⁷M. The plate is then incubated at 37°C for the desired exposure time (4h or 24h). A 5mg/mL MTT solution (Sigma) is diluted 1/50 with GBSS (Gey's Balanced Salt Solution, Sigma). After removing the medium from each well, 100µL of this MTT-GBSS solution is deposited per well. The plate is then incubated for 4h at 37°C. Then, 100µL of isopropanol (VWR chemicals) is deposited to dissolve the purple crystals formed by the MTT reagent. The mixture in each well is aspirated-refilled to allow complete dissolution of the crystals. Finally, the optical density of each well of the plate is read by spectrophotometry (MultiskanGo, ThermoScientific) at 570nm.

Proximity ligation assay

For proximity ligation assay (Duo-Link) RAW264.7 or BV-2 cells were seeded at 20,000 cells per well on Lab-Tek Permanox slides overnight and then treated with the appropriate peptide at 10⁻⁷M for one hour. After fixation with 2% PFA for 10 minutes, cells were permeabilized with PBS/0.1% Triton X-100 for 10 minutes. For heterodimers

detection, primary antibodies (IL-10Ra OAAF01119, Aviva and IL-10Rb AF5368, R&D) were incubated together by pair overnight at 4°C diluted at 1/100 in PBS. The next day, the secondary antibodies (PLA probe anti goat MINUS 5X and PLA probe anti rabbit PLUS 5X, Sigma), diluted 1/5 in PBS, are deposited for one hour at 37°C. The proximity ligation assay was then performed according to the manufacturer's recommendations with the "detection orange" kit (Sigma). Quantification of the dots was performed using ImageJ software.

Western-blot

For assessing of STAT3 phosphorylation, RAW264.7 or BV-2 cells were seeded in 6 well-plates and treated for 1h with the appropriate peptide and 15min with 100ng/mL IL-10 (Miltenyi). Proteins were extracted using PBS-Triton 1%, proteinase inhibitors and phosphatases inhibitors (Sigma). Proteins were separated in a 4-20% SDS-PAGE gel (Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) and transferred onto a nitrocellulose membrane (Trans-Blot Turbo System, BioRad). The blots were soaked in blocking solution (Tris-Buffered Saline (TBS), 0.1% Tween-20, BSA (bovine serum albumin, 5%) for 30 minutes at room temperature. Primary antibody (Anti-STAT3 antibody (ab119352) 1/1000 or Anti-STAT3 (phospho Y705) antibody (ab76315) 1/2000) was incubated overnight at 4°C in TBS, 0.1% Tween-20, BSA 5%. After several washes, secondary antibody (Goat anti-mouse IgG HRP conjugate for STAT3 and Goat anti-rabbit IgG HRP (HorseRadish Peroxidase) conjugate, Bio-Rad, 1/3000) was incubated for 1 hour at room temperature. The revelation step was performed using Clarity Enhanced Chemiluminescence Blotting Substrates (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. Images of the immunoblots were acquired and analysed thanks to Chemidoc Touch Imaging System (Bio-Rad) and normalized with the stain-free method.

Animal procedures

SJL/J female mice were obtained from Janvier Labs and C57BL/6 mice from Charles River Labs. The animals were kept in accordance with French animal protection laws and were approved by the Animal Care Committee of the University of Strasbourg. All mice were kept in a controlled environment (25°C) with free access to food and water and housed on a 12 hours day/night cycle. Mice were allowed to acclimatize to the animal house facility for at least one week before experimentation.

EAE PLP

The study was approved by the local animal care committee (APAFIS#22687-2019102813393158). To induce a relapsing remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the Hooke EAE-PLP (ProteoLipid Protein) induction kit was used according to manufacturer's instructions (EK-2120). Briefly, at 8-9 weeks old, SJL/J mice were anesthetised with isoflurane and immunized subcutaneously with 0.1mg of Myelin Proteolipid protein (PLP₁₃₉₋₁₅₁) peptide emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA) and intraperitoneally with 50ng Pertussis toxin (PTX). Treatment with MTP-IL-10R α at 10 μ g/kg or vehicle was performed every three days during the whole experiment, starting 2 days post-immunization. To assess disease severity, mice were scored daily, from day 7 post-induction, on a 5-point grading scale. 0, no symptoms; 0.5, partial limp tail; 1, complete limp tail; 1.5, hind limb ataxia; 2, hind limb paresis; 2.5, partial hind limb paralysis; 3, complete hind limb paralysis; 3.5, hind limb paralysis and fore limb paresis; 4, hind and fore limb paralysis; 5, moribund.

Cell separation

Firstly, mice were euthanized by intraperitoneal injection of a lethal dose of a ketamine-xylazine solution. Then, mice were transcardially perfused with ice-cold PBS to wash-out the blood capillaries. Afterwards, brains were dissociated into single-cell suspensions using the adult brain dissociation kit (Miltenyi Biotec) based on a combination of enzymatic and mechanical dissociation protocol. Briefly, tissues are sliced into eight sagittal sections and placed in tubes containing an enzyme cocktail. Each sample was then dissociated for 30 min at 37°C on the gentleMACS Octo Dissociator with Heaters (Miltenyi Biotec) using the 37C_ABDK_01 program. Then, myelin and debris were removed with Debris Removal solution (Miltenyi Biotec) provided in the Adult Brain Dissociation kit (Miltenyi Biotec). The resulting cell suspension was labelled with a CD11b antibody (130-119-155, Miltenyi Biotec) and placed on a MACS® column placed in the magnetic field of a MACS separator. CD11b⁺ cells were eluted and resuspended in TRIzol (Invitrogen) and kept at -80°C until further use.

RNA extraction and quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated from the CD11b⁺ isolated cell fractions using TRIzol according to the manufacturer's instructions. The RNA extraction was continued with a classic phenol-chloroform extraction. After DNase treatment (Roche), cDNA was synthesized

from 500 ng total RNA using the HighCapacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) and qPCR was performed using the Biorad CFX Connect Real-Time System with TaqMan Real-time PCR Master Mix (4444557, Thermo-Fisher) and the *I10ra* (Mm00434151_m1 and *I10rb* (Mm00434157_m1) probes. *Gapdh* (Mm99999915_g1) was used as a housekeeping gene. The relative gene expression ratio was calculated based on the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Orthotopic brain grafting of glioblastoma cells

The study was approved by the local animal care committee (APAFIS#14058-2018031317278197). GL261 murine glioblastoma cells expressing the luciferase were cultivated before implantation. Eight weeks old C57BL/6 mice were anesthetized with isoflurane. 50 000 cells in 1 μ L HBSS were implanted using a stereotaxic set up in the left striatum. Three days after grafting, the mice were injected intraperitoneally either with the vehicle (LDS) or MTP-IL-10R β at 10 μ g/kg, three times a week. Once a week, mice were imaged to measure qualitatively the presence and development of tumours, using NightOWL *in vivo* imaging system (Berthold). The images obtained were used to calculate an adaptation of the RECIST criteria as shown previously (18). This criterion enables to evaluate the response of a cancerous disease to a treatment, as following: PD (Progressive disease, > +20% increase compared to averaged growth of control tumours), SD (Stable Disease, +20% < x < -30% growth decrease compared to averaged growth of control tumours), PR (Partial Response, -30% < x < -100% growth decrease compared to averaged growth of control tumours), and CR (Complete response, > -100% growth decrease compared to averaged growth of control tumours).

Statistics

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software) and are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Parametric data were analysed using Student's *t* test for two groups and one-way ANOVA followed by Dunnett's post-test for multiple comparisons to the control or Tukey's post-test for multiple pair-wise comparisons. Survival data were analysed using log-rank (Mantel-Cox) test.

Results

Prediction of the interactions of the IL-10 receptor subunits

The interactions of the transmembrane domains of the subunits of the IL-10 receptor are poorly described. The implication of this receptor in the polarisation of macrophages and its role in pathological states led us to study its transmembrane domain, as it could be an interesting therapeutic target. We generated three-dimensional interacting models using the PREDDIMER software. From previous work in the lab, we had determined that an F_{scor} value above 2.6 is indicative for real biological interactions (19). The results in figure 1 show that the TM sequences of the receptor have similar interaction scores for the IL-10R α homodimer (figure 1A) and for the heterodimer with IL-10R β (figure 1B) whereas, the score is weaker for the IL-10R β homodimer (figure 1C). According to these results, the most probable TM oligomers are IL-10R α homodimers and IL-10R α / IL-10R β heterodimers. Afterwards, we determined the Buried Surface Area (BSA) for each amino acid of the TM sequences of the subunits interacting, to identify the amino acids highly implicated in the interaction. From these results we predicted for the IL-10R α subunit the interaction interfaces involving the amino acids L₂₄₈, G₂₅₁, I₂₅₂, C₂₅₅ and L₂₅₈ (LxxGIxxCxxL interface) for the homodimerization (figure 1A) and L₂₄₈, G₂₅₁, V₂₅₄ and L₂₅₈ (LxxGxxVxxxL interface) for the heterodimerization with IL-10R β (figure 1B). Strikingly, the predicted homodimerization motif of IL-10R α is 60% similar to the motif for the heterodimerization with IL-10R β (figure 1B). In consequence, IL-10R α can only form one interaction at once. For the IL-10R β subunit, the homodimerization is possible through two interfaces, sharing only the amino acid S₂₃₀. The first involves the amino acids I₂₂₆, V₂₂₉, S₂₃₀, V₂₃₃ and F₂₃₇ (IxxVSxxVxxxF interface) and the second L₂₂₇, S₂₃₀, V₂₃₁ and V₂₃₄ (LxxSVxxV interface, figure 1C). The second interface is 100% similar to the interface used for the heterodimerization with IL-10R α (figure 1B). According to these results, IL-10R β is able to form heterodimers and homodimers at the same time. The results of the predictions indicate that the TM domain of IL-10R α interacts either with another IL-10R α TM domain or with an IL-10R β TM domain. IL-10R β can interact with two subunits at the same time but is more likely to form heterodimers.

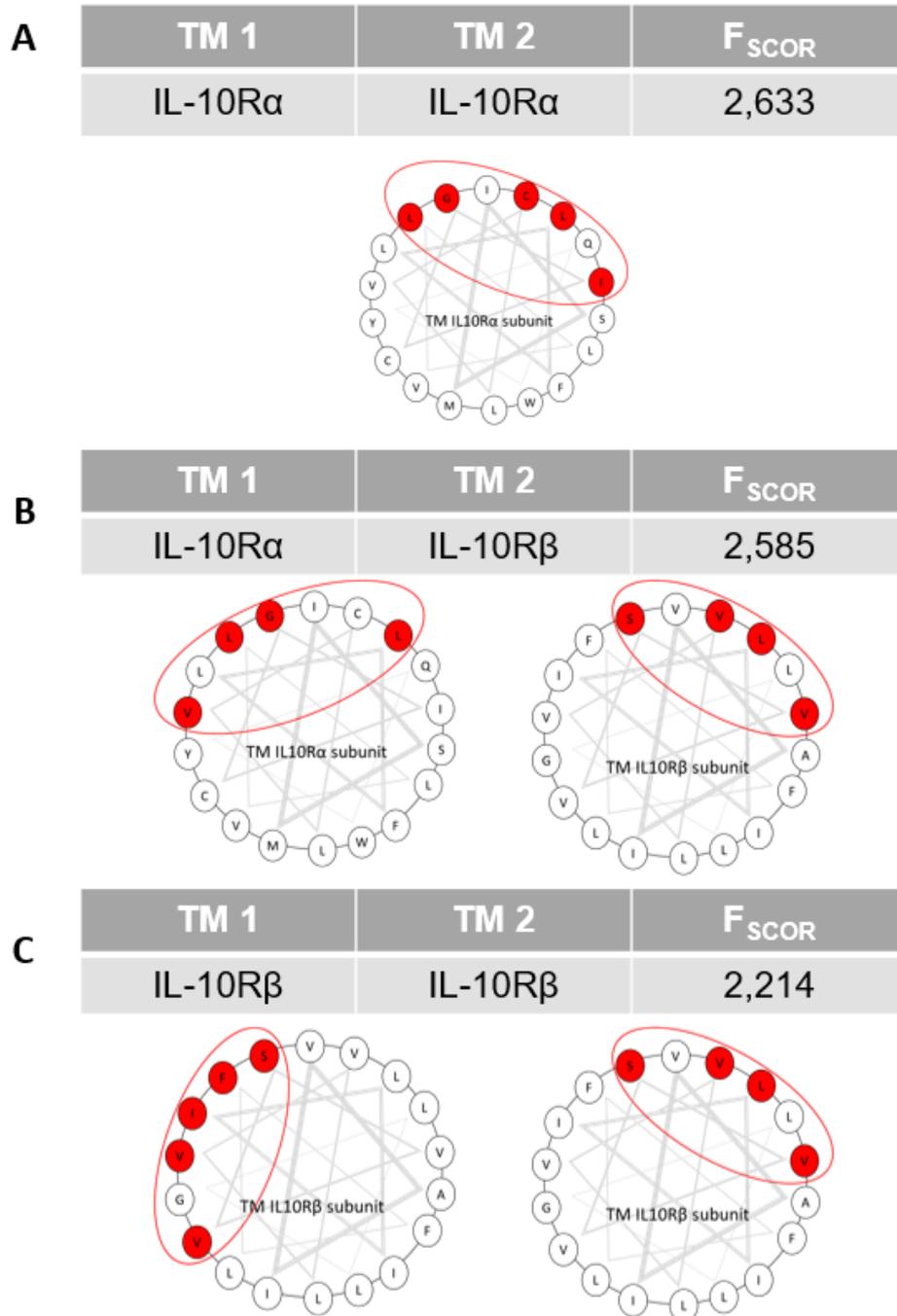


Figure 1: Predictions of IL-10R TM subunits interactions using PREDDIMER software.

For each pair of TM sequences, this figure shows the PREDDIMER calculated F_{SCOR} and helical top views of the sequence. The circled areas represent the interaction interfaces. The amino acids in red are those implicated in the interaction, with the buried surface area values greater than or equal to 60%.

- (A) Prediction for IL-10R α TM domain homodimerisation.
- (B) Prediction for IL-10R α / IL-10R β TM domain heterodimerisation
- (C) Prediction for IL-10R β TM domain homodimerisation

Biological validation of predicted interactions

To validate the biological relevance of the predicted interactions of the IL-10 receptor, we performed a BRET assay. In this assay, a first protein is tagged with an Rluc donor and a second with an eYFP acceptor. If the two tags are close enough, resonance energy transfer can occur and a fluorescent signal emitted by the eYFP can be measured at 535nm. The BRET ratio determined afterwards exemplifies the interaction of the two proteins, as showed previously (17). We first evaluated the BRET ratio for the interactions between the full-length subunits by performing a saturation assay (figure 2A).

For the IL-10R α subunit, the interaction with itself yields a specific signal with a BRET_{max} value of 55mBu (figure 2A, left graph, red curve). The interaction with IL-10R β is also specific and the BRET_{max} value reaches 171mBu (figure 2A, left graph, green curve). The test with two unrelated proteins (PDGFR α and GABA_B) provides non-specific signals and serves as negative controls, where no interaction is measured. For the IL-10R β subunit, the homodimer reaches a BRET_{max} value of 303mBu (figure 2A, right graph, blue curve) and the heterodimer a BRET_{max} of 55mBu (figure 2A, right graph, orange curve). Here again, non-specific signals were recorded when measuring the interaction with PDGFR α or GABA_B. As reported by this experiment, the IL-10R α subunit preferentially interacts as heterodimers (+68% of the BRET_{max}) rather than homodimers. However, IL-10R β has a stronger propensity to form homodimers (+44% of the BRET_{max} compared to heterodimers).

In a second experiment, we assessed the interactions of the TM sequences only of the subunits (figure 2B). For the TM domain of IL-10R α , the BRET_{max} value is 380mBu for the homodimer (figure 2B, left graph, red curve) and reaches 282mBu for the heterodimerization with IL-10R β (figure 2B, left graph, green curve). The TM domain of IL-10R β showed a BRET_{max} of 156mBu for the homodimer (figure 2B, right graph, blue curve) and 217 mBu for the heterodimer (figure 2B, right graph, orange curve). Thus, the TM segment interactions slightly differ from the whole protein as they are exhibiting a higher BRET_{max} for IL-10R α homodimers (+26% compared to heterodimers) and for IL-10R β to form heterodimers (+44% compared to homodimers). Finally, in a third experiment, we determined the interactions of the full-length Rluc-tagged receptors with the eYFP-tagged TM sequences only (figure 2C). For the full-length IL-10R α subunit, the specific interaction with the TM sequence of IL-10R α yields

a BRET_{max} value of 55mBu (figure 2C, left graph, red curve), which is the same value as for the full-length homodimer. The interaction with the IL-10R β TM domain reaches a value of 71mBu (figure 2C, left graph, green curve), which is 68% weaker than for the full-length heterodimer. For the full-length IL-10R β subunit, the BRET_{max} value for the interaction with the TM domain of IL-10R β is 69mBu (figure 2C, right graph, blue curve), 77% lower than for the full-length homodimer. Last, the interaction with the TM domain of IL-10R α reaches a value of 44mBu (figure 2C, right graph, orange curve), which is 20% less than for the full-length heterodimer. These results indicate for the first time, that the TM domains of the subunits of the IL-10R interact specifically and with variable intensities and thereby contribute to the dimerization of the whole receptor complex.

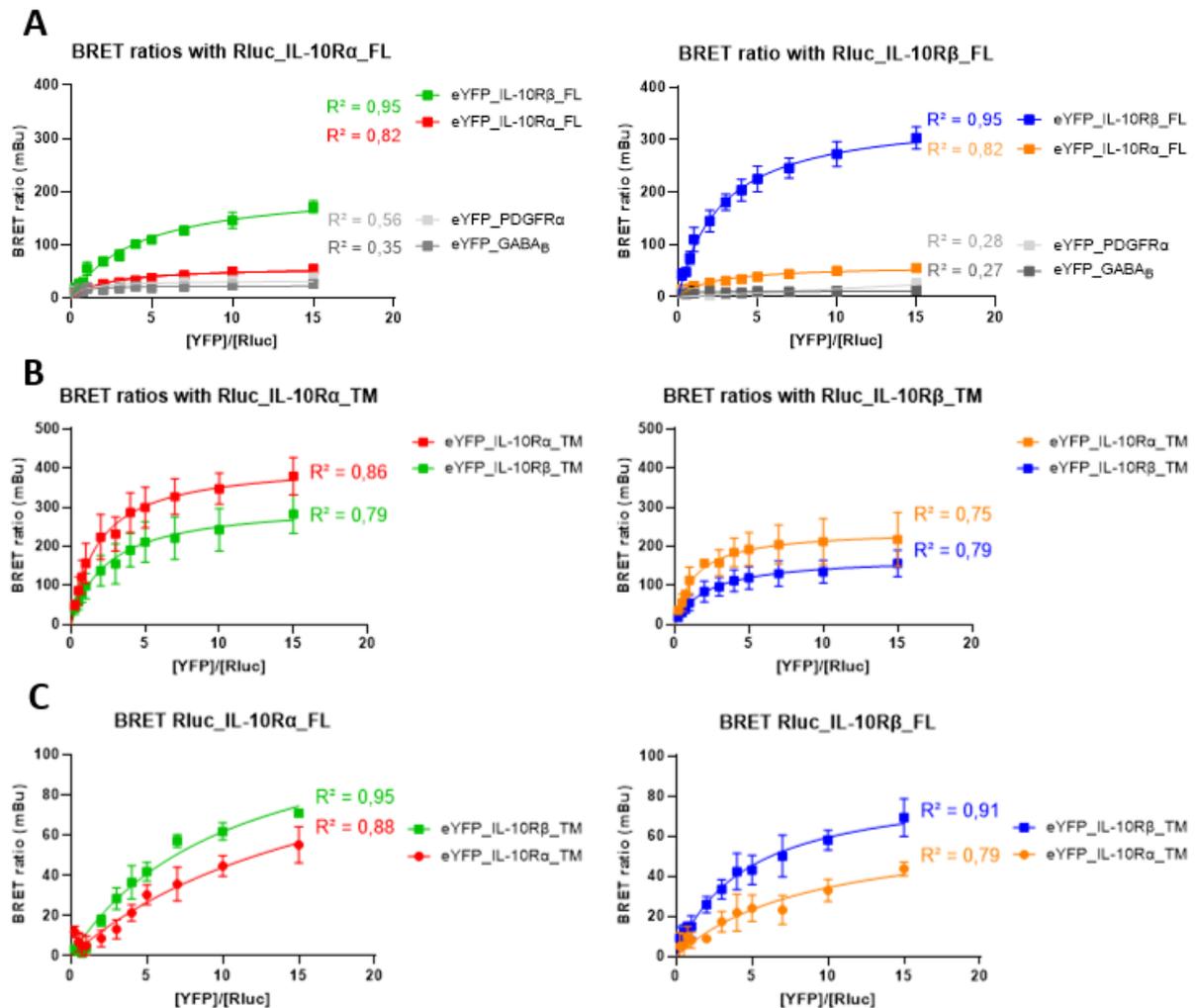


Figure 2 : BRET validation of full length (FL) and transmembrane (TM) IL-10R subunits interactions.

BRET saturation assays to monitor the interaction of different pairs of proteins. Concentration of Rluc plasmid is the same for each condition (0,75ng/mL), whereas concentration of eYFP plasmid is increasing in each condition.

- (A) BRET assay for full length receptors. Left graph shows the interactions of IL-10R α with IL-10R β (N=8), IL-10R α (N=8), PDGFR α (N=2) and GABA $_B$ (N=2). Right graph shows the interactions of IL-10R β with IL-10R β (N=8), IL-10R α (N=8), PDGFR α (N=2) and GABA $_B$ (N=2).
- (B) BRET assay for TM sequences of the receptors. Left graph shows the interactions of IL-10R α _TM with IL-10R β _TM (N=6) and IL-10R α _TM (N=6). Right graph shows the interactions of IL-10R β _TM with IL-10R β _TM (N=6) and IL-10R α _TM (N=6).
- (C) BRET assay for interactions of full length receptors and TM sequences. Left graph shows the interactions of IL-10R α _FL with IL-10R β _TM (N=4) and IL-10R α _TM (N=4). Right graph shows the interactions of IL-10R β _FL with IL-10R β _TM (N=4) and IL-10R α _TM (N=4).

R^2 are the coefficients of determination of the one site specific binding non-linear fit curves.

The TM peptides mimicking IL-10R have no toxic effect on cells

To determine the implication of the TM domains of the IL-10R subunits in the activity of the receptor, we designed two peptides, mimicking the TM sequences of IL-10R α (MTP-IL-10R α) and IL-10R β (MTP-IL-10R β). First, to assess the toxicity of the two peptides, we performed a MTT assay on two cell lines: RAW264.7 and BV-2. As presented in figure 3, MTP-IL-10R α and MTP-IL-10R β at 10^{-7} M, display no acute toxic effect after four hours of exposition (left graphs), on the two cell lines. Similarly, the peptides do not display an antiproliferative effect after a 24 hours exposition period (right graphs). These results permitted to test the peptides *in vitro* and *in vivo* with results excluding toxic and antiproliferative effects.

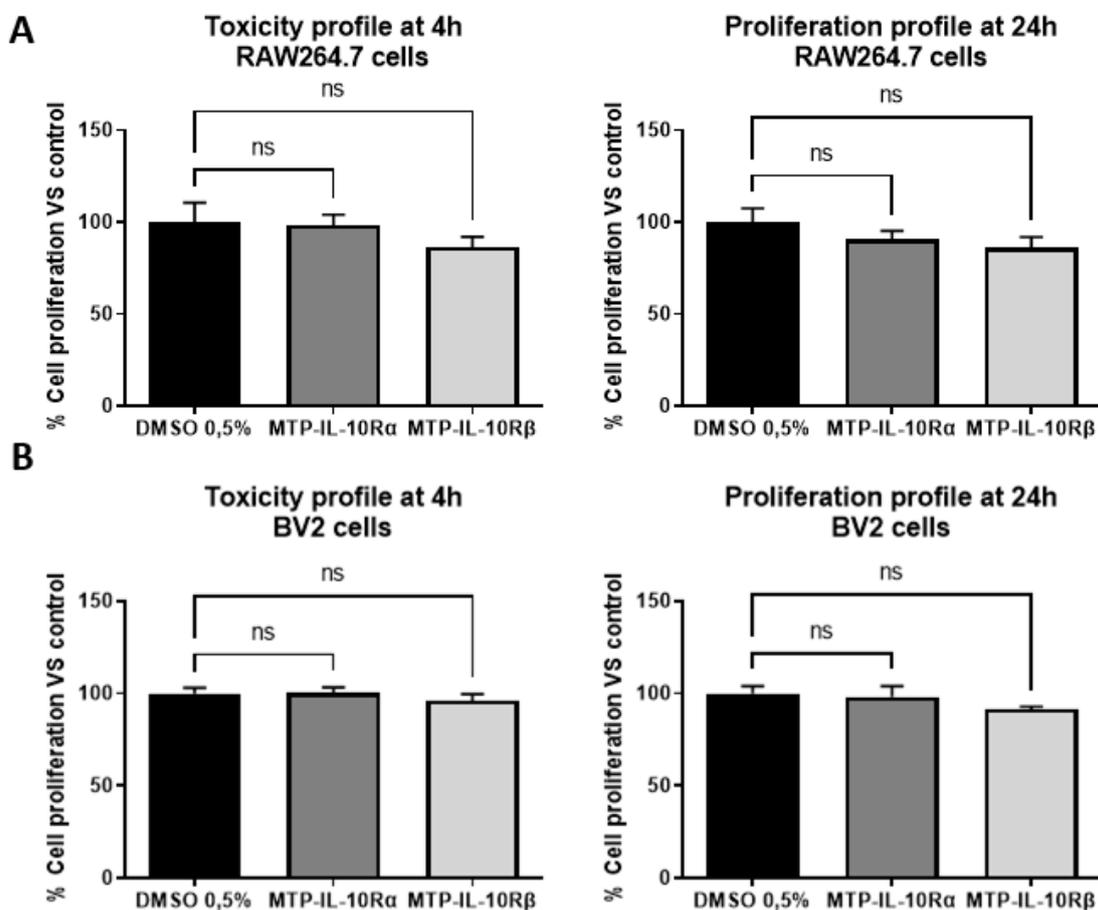


Figure 3 : MTT assay for peptides.

MTT assays, performed to assay peptides' acute toxicity (4 hours assay) and anti-proliferative effect (24 hours assay). RAW264.7 or BV2 cells were exposed to a 10^{-7} M concentration of MTP-IL-10R α or MTP-IL-10R β peptides during 4 or 24 hours, before measuring cell metabolic activity with tetrazolium dye.

(A) MTT assay on RAW264.7 cells at 4 (left graph) or 24 hours (right graph).

(B) MTT assay on BV2 cells at 4 (left graph) or 24 hours (right graph).

ns : non significant, one-way ANOVA followed by Dunnett's post-test for multiple comparisons.

Data are presented as mean \pm SEM. N=3 for each condition.

The TM peptides target IL-10R

For the assessment of the biological activities of the peptides, we performed *in vitro* assays on the two murine cell lines RAW264.7 macrophages and BV-2 microglial cells. In a first step, we conducted a proximity ligation assay to evaluate the targeting capability of the peptides, and their effect on the heterodimerization of the subunits. On the RAW264.7 cells, we showed that MTP-IL-10R α does not impair the heterodimerization of the two subunits (figure 4A). MTP-IL-10R β contrariwise, inhibits significantly the heterodimerization of the two subunits (-31%, $p=0.0045$, figure 4A). On the BV-2 cells, similar results were obtained, where MTP-IL-10R α does not impair the heterodimerization of the two subunits and MTP-IL-10R β inhibits significantly the heterodimerization (-74%, $p<0.0001$, figure 4B).

In a second assay, we assessed the phosphorylation of STAT3, which is a downstream signal of IL-10R activation, in presence of the IL-10 ligand or not. For the RAW264.7 cells, the peptides had no effect on the phosphorylation of STAT3 in absence of IL-10 (figure 5A). After treating the cells with 100ng/mL IL-10 for 15 minutes, a significant increase in the phosphorylation of STAT3 is observed (+28 357%, $p=0.0083$, figure 5A). However, after adding the peptides, no effect has been recorded. For the BV-2 cells, the peptide MTP-IL-10R α is able to induce the phosphorylation of STAT3 in absence of IL-10 (+212%, $p=0.0021$, figure 5B), whereas MTP-IL-10R β is not. After treating the cells with IL-10, an increase of the phosphorylation of STAT3 has been measured (+374%, $p<0.0001$, figure 5B). In this case, after adding the peptides, MTP-IL-10R α had no effect, whereas MTP-IL-10R β was able to significantly inhibit the phosphorylation of STAT3 (-68%, $p<0.0001$, figure 5B). Hence, these results indicate that MTP-IL-10R α is able to induce the activation of the signalling cascade of the IL-10R in absence of the ligand, but only in microglial cells. MTP-IL-10R β for its part, inhibits the IL-10 induced phosphorylation of STAT3 only in microglial cells.

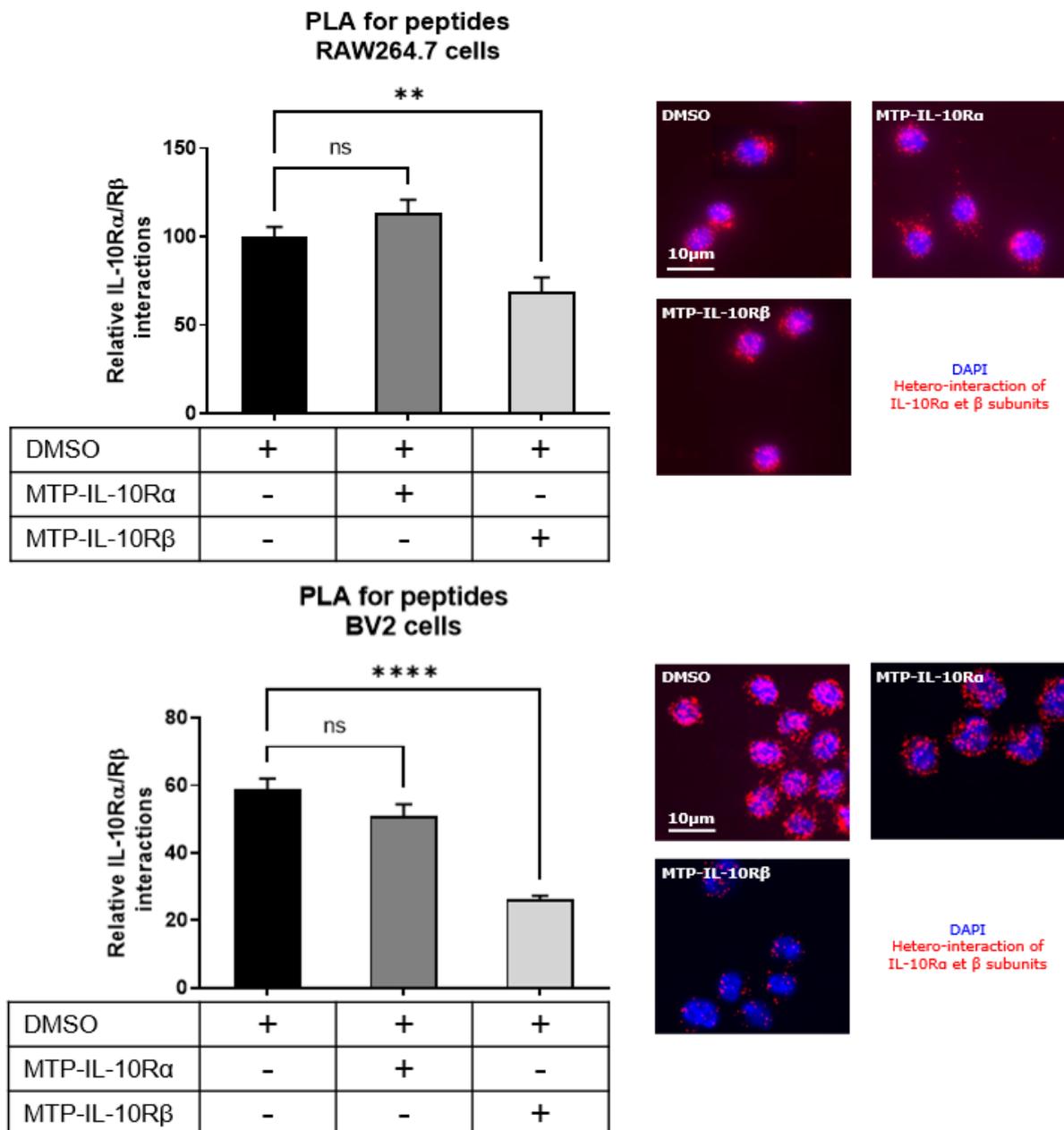


Figure 4 : Proximity ligation assay for IL-10R subunits heterodimerisation in presence of peptides.

Proximity ligation assay was performed on RAW264,7 and BV2 cells exposed to DMSO or DMSO-diluted peptides for one hour. In this assay, the amount of IL-10Rα / IL-10Rβ heterodimers was assessed in three different conditions : DMSO 0.1%, MTP-IL-10Rα (10^{-7} M) and MTP-IL-10Rβ (10^{-7} M). Representative images obtained by fluorescent microscopy are presented on the right. DAPI staining is presented in blue. Each red dot corresponds to a hetero-interaction of the two subunits of the receptor.

**** $p < 0.0001$; ** $p < 0.01$; ns : non significant, one-way ANOVA followed by Dunnett's post-test for multiple comparisons.

Data are presented as mean \pm SEM. N=3 for each condition.

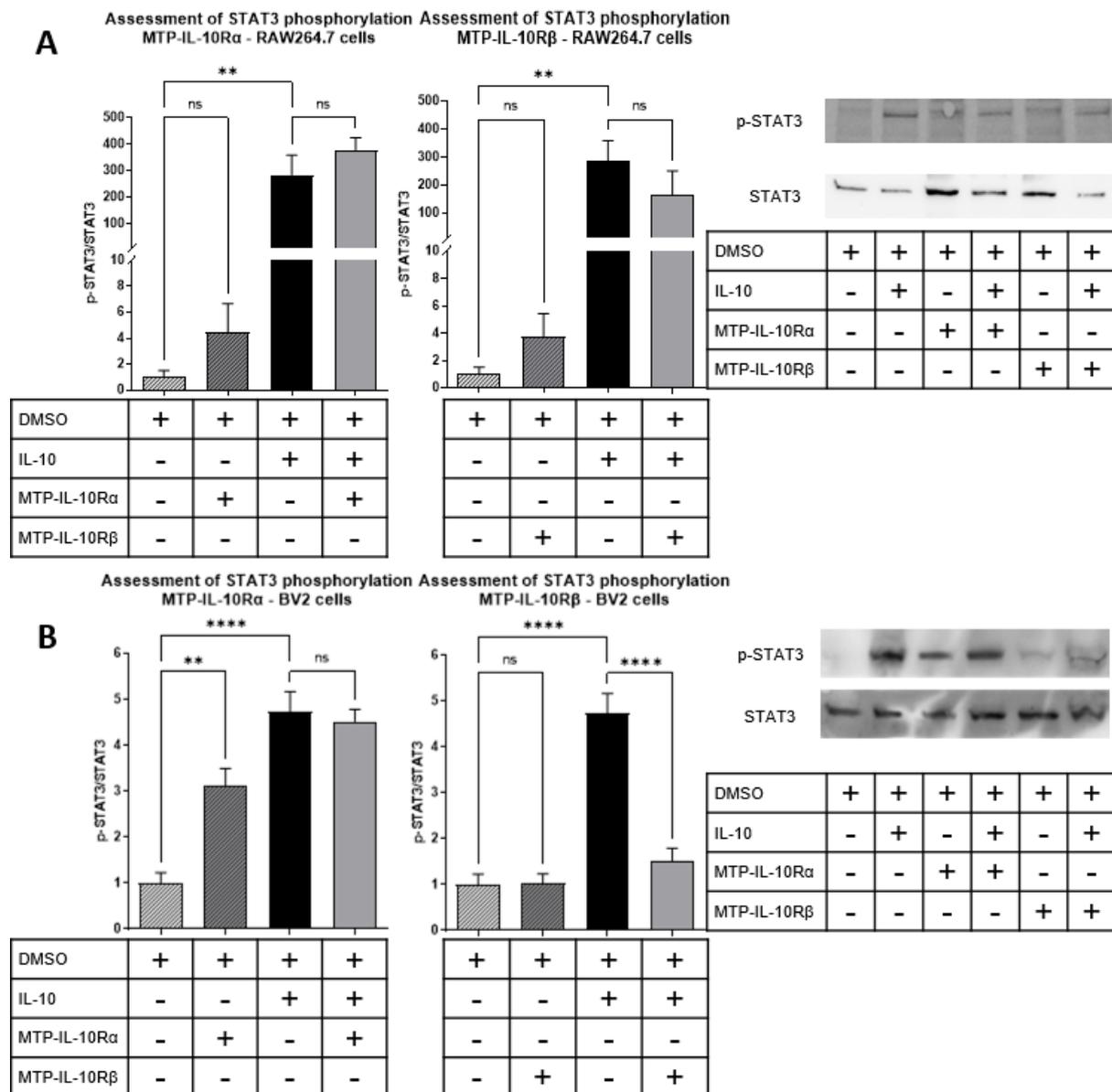


Figure 5 : Measure of STAT3 phosphorylation in presence of IL-10 and peptides.

Assessment of STAT3 phosphorylation by western-blot on lysates of RAW264.7 or BV2 cells exposed to IL-10 and/or DMSO or DMSO-diluted peptides. Graphs are showing the p-STAT3/STAT3 ratio.

(A) p-STAT3/STAT3 ratio for the lysates of RAW264.7 cells exposed to DMSO 0.1% \pm IL-10 (10ng/mL), MTP-IL-10R α (10^{-7} M) \pm IL-10 or MTP-IL-10R β (10^{-7} M) \pm IL-10. Photographs of the representative blots are presented on the right. N=4.

(B) p-STAT3/STAT3 ratio for the lysates of BV2 cells exposed to DMSO 0.1% \pm IL-10 (10ng/mL), MTP-IL-10R α (10^{-7} M) \pm IL-10 or MTP-IL-10R β (10^{-7} M) \pm IL-10. Photographs of the representative blots are presented on the right. N=5.

**** $p < 0.0001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ns : non significant, one-way ANOVA followed by Dunnett's post-test for multiple comparisons.

Data are presented as mean \pm SEM.

Assessment of the effect of MTP-IL-10R α *in vivo*

The results of the *in silico* predictions and *in vitro* assays prompted us to test whether MTP-IL-10R α is able to activate the anti-inflammatory effect of the IL-10R in an inflammatory disease model. We tested the effect of the peptide on a murine model of relapsing-remitting multiple sclerosis: the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE-PLP). Two days after immunisation, we divided the mice into two groups: the vehicle treated group (N=5) receiving an IP injection of PBS-diluted DMSO (0.1% final DMSO concentration) and the treated group (N=5), receiving an IP injection of MTP-IL-10R α diluted in PBS at 10 μ g/kg. The mice were treated every three days, during the entire experiment (17 days). The ten mice were scored daily to evaluate their disease severity. We found no significant difference in the clinical score between the two groups (figure 6). These results demonstrate that MTP-IL-10R α is not able to improve the clinical signs of the animals in this model. To understand the lack of effect, we measured the expression of the two subunits of the receptor in this pathological context. Collection of brains of naive and EAE mice at different phases of the disease: onset (approximately 9 days after immunisation and after occurrence of the first clinical signs), peak (peak of the disease, 13 days post-immunisation) and remission (after the peak, when the animals recover, 15 days post-immunisation), permitted to isolate CD11b⁺ cells, corresponding to macrophages and microglia. The mRNA levels of *Il10ra* and *Il10rb* in these cells, assessed by RTqPCR, are significantly decreased at the onset (-74%, p=0.0136 and -77%, p<0.0001 respectively, figure 7) and peak (-87%, p=0.0036 and -85%, p<0.0001 respectively, figure 7) of the disease, compared to naive animals. The levels of both subunit mRNAs are restored at the remission phase. These results indicate that the expression of both subunits of the receptor are strongly downregulated during the acute phases of the EAE disease.

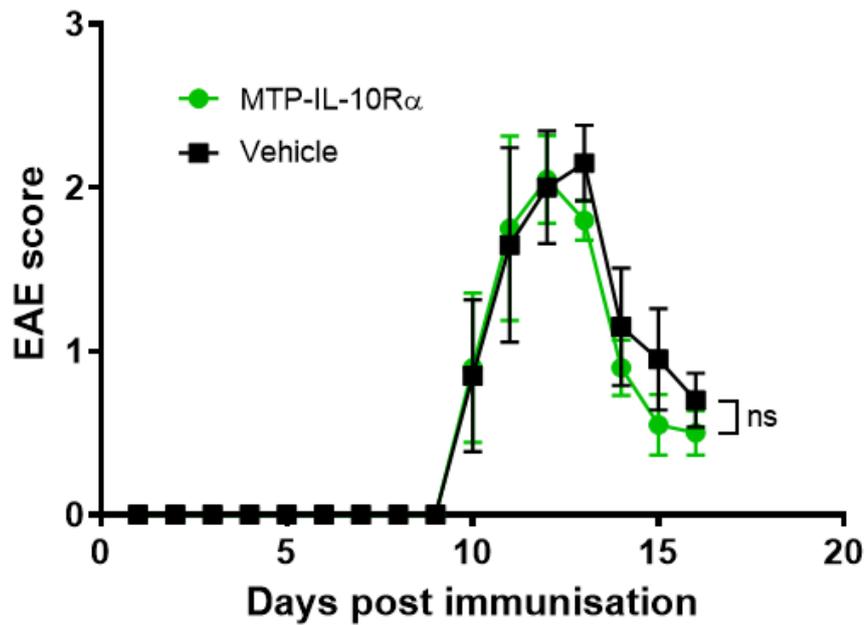


Figure 6 : Evaluation of the effect of MTP-IL-10R α peptide on the EAE PLP mouse model.

10 mice were immunised using PLP-CFA and PTX injection at day 0. Mice were then split into two groups: vehicle and peptide-treated. Treatment with either LDS or MTP-IL-10R α at 10 μ g/kg, began at day 2 and was repeated each three days. Clinical score was assessed every day and the mean of each group is shown on the graph.

ns = non significant, two-tailed parametric unpaired *t* test.

N=5 for each condition.

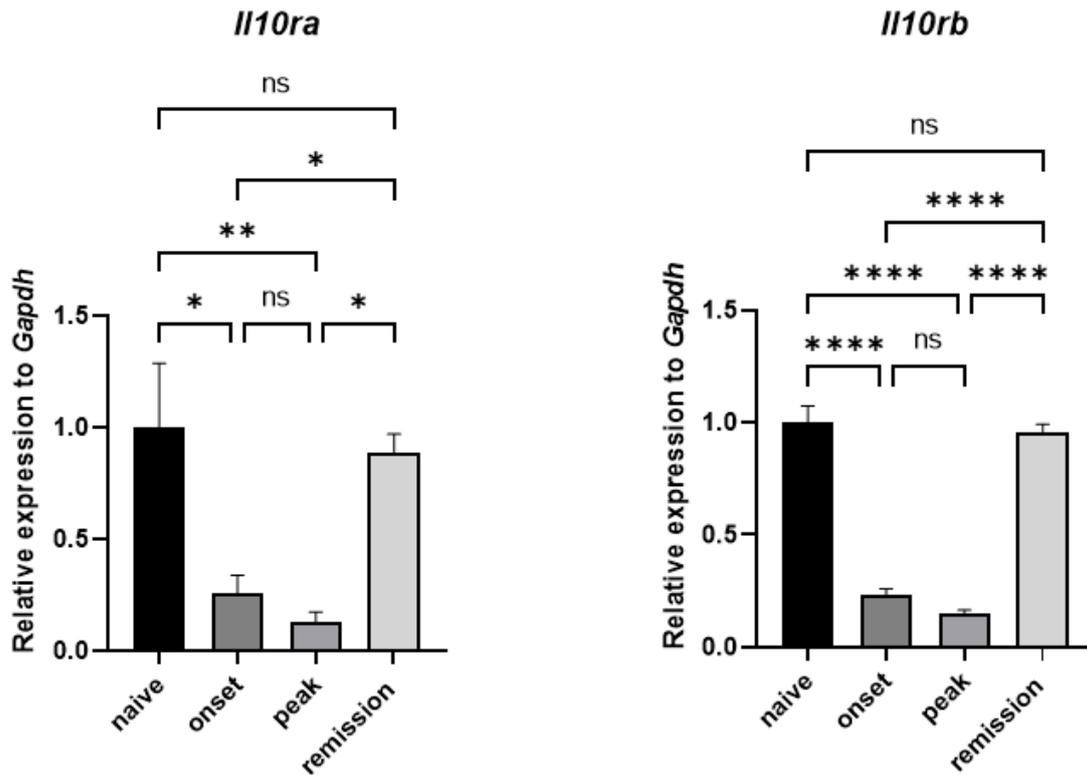


Figure 7 : Relative expression of the subunits of the receptor at different phases of the EAE disease in CD11b⁺ cells.

Measurement by RTqPCR of the mRNA levels of *Il10ra* and *Il10rb* in CD11b⁺ cells extracted from the brains of naive or EAE-PLP-induced mice at different phases of the disease (onset, peak and remission). Results are expressed in relative expression to *Gapdh*.

**** p<0.0001; ** p<0.01; * p<0.05; ns : non significant, one-way ANOVA followed by Tukey's post-test for multiple comparisons.

Data are presented as mean ± SEM. N=4 for each condition.

MTP-IL-10R β may exert anti-cancer effects

The results obtained for the MTP-IL-10R β peptide spurred us to assess its capacity to inhibit the activation of the IL-10 signalling cascade *in vivo* on a glioblastoma model of tumours. We therefore performed an intracranial orthotopic grafting of glioblastoma cells in mice. We implanted GL261 glioblastoma cells expressing luciferase in the brains of immune competent healthy mice. We treated them either with PBS-diluted LDS (control group, N=8) or MTP-IL-10R β diluted in PBS at 10 μ g/kg (treated group, N=9). Survival of the mice in the two groups was established and was slightly increased in the treated group, although it did not reach statistical significance (increase of mean survival days of 4 days, $p=0.0561$, figure 8A). Furthermore, in order to calculate the RECIST criteria, we measured once a week, the size of the tumours after injection of luciferin, using an *in vivo* bioluminescence reading device. The results show that in the treated group, four mice completely escaped the treatment, with a progression of the disease. The five remaining mice had either a stable disease or showed a partial response, with a maximum at -93% (figure 8B). This experiment shows that MTP-IL-10R β may have anti-cancer effects in the glioblastoma model, ameliorating the disease in some animals.

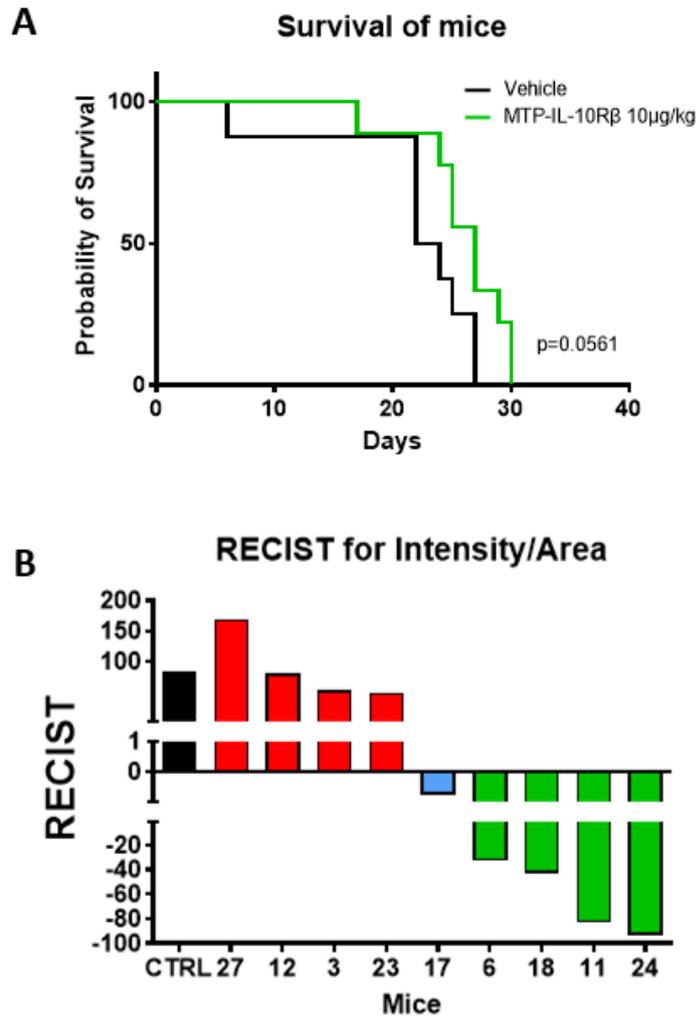


Figure 8 : Evaluation of the MTP-IL-10R β in the orthotopic intracranial grafting of glioma cells mouse model.

17 mice were grafted in the brain with mouse glioblastoma cells. Two days after grafting, they were split into two groups: vehicle and peptide-treated. Treatment with either LDS or MTP-IL-10R β at 10 μ g/kg was repeated each three days.

- (A) Survival of mice was assessed for each group and the mean is represented in this graph. Log-rank (Mantel-Cox) test for survival curves.
- (B) RECIST criteria was calculated for each mouse, relying on measured area of the tumours in the mice brains. The black bar corresponds to the control, vehicle treated group. The other bars correspond to the mice of the peptide-treated group. The red bars correspond to progressive disease, the blue bar to a stable disease and the green bars to a partial response.

N=8 in vehicle group / N=9 in MTP-IL-10R β treated group.

Discussion

Interleukin-10 is a cytokine well-known for its anti-inflammatory and immune regulatory roles. Among activation of its receptor, the downstream signalling cascade is implicated in the inhibition of pro-inflammatory cytokines secretion like IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN γ and TNF α , with profound changes in the activities of the immune cells (20). However, the mechanisms of the activation of the receptor platform are only described for the extra- and intracellular domains, although, increasing evidence shows the importance of the TM domain in the oligomerisation and activation of various receptors (21). The aim of this study is to decipher the role of the TM domains of the two receptor subunits in its activity. First, we generated *in silico* models of the interactions between the TM domains of the two subunits and disclosed the amino acids involved in these interactions. According to these results, IL-10R α TM forms homodimers and heterodimers with IL-10R β TM at an interface sharing 60% of the amino acids (L₂₄₈, G₂₅₁ and L₂₅₈), meaning that IL-10R α TM can only be involved in one interaction at a time. Contrariwise, IL-10R β TM possesses two distinct interfaces, one forming only homodimers, the other forming homodimers as well as heterodimers with IL-10R α . Only the serine 230 is common to both interfaces. Thus, the TM domain of IL-10R β is able to form homodimers and heterodimers simultaneously. Interestingly no classic interaction motif has been identified, in so far as there is no (G,A,S)xxx(G,A,S) motif, nor leucine or glycine zipper (22). The most recent data about the interactions of the extracellular domains, obtained by cryogenic electron microscopy (Cryo-EM) by the Garcia lab, showed that after fixation of the ligand, IL-10R α forms a heterodimer with IL-10R β , which is in accordance with our results (3). An explanation for the second homodimer interface of IL-10R β is its recognition capability of other IL-10R family subunits (IL20R α , IL22R and IL28R), whereas IL-10R α is exclusive to IL-10 (1).

To validate these models, we performed a saturation BRET assay *in vitro* by tagging the full-length subunits or only the TM domains with the two reporters for this assay (Rluc and eYFP). The experiment allowed us to verify the specificity of the signal obtained. For the full-length interactions, specific signals were obtained for the interactions of the subunits of the receptor and not for non-related proteins (PDGFR α and GABA $_B$). Concerning the interactions of the subunits, we noticed that IL-10R α has 68% more propension to form heterodimers, which is consistent with the *in silico* and cryo-EM results. Surprisingly, for IL-10R β , it seemed that it does not form heterodimers

with IL-10R α . An explanation could be a steric hindrance in the assay, and a wrong orientation of the reporters in the intracellular domain. Moreover, the results show a 44% stronger propensity to constitute homodimers, which could be an explanation of the low signal for the heterodimer. This propensity can be related to the recent work of Mossner, Kuchner *et al.* showing that a homodimeric IL-10R β can transduce a signal with biological consequences initiated by the cytokine IL-22 (23). In a second experiment, we demonstrated that the TM domains of the subunits interact also in a specific way. In that case, each TM subunit can form homodimers as well as heterodimers, with differences in the signal between both configurations lower than 28%. Afterwards, we combined both experiments and showed also that the full-length receptors interact specifically with the TM subunits. Interestingly, the results indicate that full-length IL-10R α is more likely to form a heterodimer with TM IL-10R β and full-length IL-10R β a homodimer with TM IL-10R β , as for the full-length interactions in the first BRET experiment. From these results, one can speculate that the TM domain is also involved in the correct oligomerisation of the IL-10R, in addition to the extra- and intracellular domains. However, the signals obtained from the last experiment are around 70% lower, which may be due to an important distance between the two reporters, because of an important difference in the size of the proteins. In a last BRET experiment, we generated mutated TM sequences, in order to determine the amino acids implicated in the interaction (supplementary figure 1). Most of the mutations do not interfere with the interaction of the TM domains, except for a L248G mutation of the IL-10R α subunit, which significantly diminishes the interaction (-25%, $p=0.0195$). Because the interaction signals with a non-related sequence (GABAB_TM1) are weaker in every condition (between -70 and -85%), our data suggest the existence of a specific interaction motif which has to be fully identified.

For the better characterization of the implication of this TM domain in the receptor's oligomerisation, we conducted a series of *in vitro* tests, using peptides mimicking the TM domains of the subunits of the receptor (MTP-IL-10R α and MTP-IL-10R β). We tested two peptides on two cell lines: RAW264.7 and BV-2 cells. The first, corresponds to macrophage-like cells retrieved from a tumour in a male BALB/c mouse infected with the Abelson leukaemia virus (24). The second features microglial cells, derived from raf/myc-immortalised murine neonatal microglia obtained in C57BL/6 female mice (25). In a proximity ligation assay, we assessed the repercussions of the peptides on the heterodimerization of the subunits of the receptor. In both cell lines, the results follow

the same trend, and we observed that MTP-IL-10R β is able to inhibit heterodimerization of IL-10R α and IL-10R β , contrarily to MTP-IL-10R α which has no effect. These results were not due to a toxic effect, as seen by a MTT assay. However, the effect was stronger in BV-2 cells than in RAW264.7 cells, suggesting a different sensitivity of the two cell lines. For a better understanding of the effects of the peptides, we measured their impact on the downstream signalling cascade of IL-10R, by assessing the activating phosphorylation of STAT3. Again, a difference between both cell lines was observed. In RAW264.7 cells, the peptides had no effects, whereas in BV-2 cells, they altered the phosphorylation of STAT3. In fact, MTP-IL-10R α induced the phosphorylation in absence of the IL-10 ligand and MTP-IL-10R β inhibited the IL-10 induced phosphorylation. These results indicate that 1) both peptides are able to modulate the activation of the IL-10R and 2) a difference of sensitivity between a macrophage-like and a microglia-like cell line is observed. This difference may be due to a difference of expression of the subunits of the receptor in the two cell lines, which has to be assessed. However, the ability of the peptides to alter the strong anti-inflammatory IL-10 signalling cascade prompted us to make the hypothesis that they are able to modulate the activation status of the cells. Macrophages and microglia are characterised by different polarisation states, depending on their pro- or anti-inflammatory roles. In several diseases, an imbalance between both polarisation states is often observed. Targeting these inflammatory states, in order to rebalance them, constitutes an interesting opportunity for the development of new therapeutic approaches. Consequently, we assessed the effects of both peptides in two animal models, adapted to their hypothetical effect. MTP-IL-10R α , which induces the IL-10 anti-inflammatory signalling cascade, was tested in the RRMS model EAE PLP. However, it showed no statistical effect on the disease course and severity. It would be interesting to determine if a higher dose of peptide would be able to exert a therapeutic effect. However, when analysing the expression of the two subunits of the IL-10 receptor in CD11b⁺ cells extracted from the brains of EAE induced animals, we found a complex temporal regulation (figure 7). Indeed, at the onset and the peak of the disease, the mRNA levels of *Il10ra* and *Il10rb* are strongly downregulated (between -74 and -87%) thereby limiting the MTP-IL-10R α -mediated activity. Moreover, in the EAE lesions, an important infiltration of activated macrophages is observed (26,27). Because we showed *in vitro* that MTP-IL10R α was only active on a microglia-like cell line, its effect could be overshadowed by the macrophages. This is therefore

questioning the relevance of the target, whose contribution may be insufficient in this pathology. It could be interesting to test the effect of the peptide on other models, like inflammatory bowel diseases. The second peptide (MTP-IL-10R β) was able to inhibit *in vitro* the activation of the receptor. Consequently, we assessed its pro-inflammatory effect, possibly activating the anti-tumour immunity in a glioblastoma model. In this case, the peptide had an effect on some animals, with an overall slight increase in survival. However, some animals were completely resistant to the treatment and rather showed a worsening of the disease, meaning that the response to the treatment has a high inter-individual variability. To understand the reasons of this variability, it would be of interest to perform immunostainings of brain slices of the two groups and compare the composition of the immune infiltrate. It could also be interesting to assess the capacity of breaking the heterodimers by the peptide with a PLA assay on the slices of the different tumours (resistant or not) exhibiting obvious differences in terms of vascularisation and necrosis. In the non-responder group, the inhibition of the activation of the tumour-surrounding immune cells by the tumour microenvironment and the tumour associated macrophages may outperform the effects of the peptide (28). In addition, the size and the vascularisation of the tumour also has an impact on its response to the treatment. Another reason explaining the failure to obtain a response in some animals, relies on the fact that the IL-10R β subunit is also involved in other signalling cascades. IL-10R β forms for example dimers with IL-28R and thereby forms the receptor for the interleukins 28A, 28B and 29, also called type III interferons, exerting strong antitumor effects (1,29). Blocking the activity of the subunit IL-10R β could therefore impair these effects.

Overall, the results *in vitro* indicate that both peptides are able to modify the activation status of the IL-10-receptor, thereby pointing out for the first time, the implication of the TM domain in the oligomerisation of the IL-10R. However, the obtained modulation was not sufficient *in vivo* to exert therapeutic effects. This is facing the pronounced plasticity of the targeted cells (8,30). The aim of these peptides is to modify the activation of the IL-10R in order to change the polarisation state of macrophages and microglia. However, the described polarisation states are nowadays questioned and the macrophages never form stable subsets with a given status. They have the ability to adopt mixed and very labile phenotypes. Targeting one inflammatory marker may, therefore be insufficient. A second problem concerns the target itself. IL-10 is a ubiquitous cytokine with a wide range of roles from anti-inflammatory effects, cell-

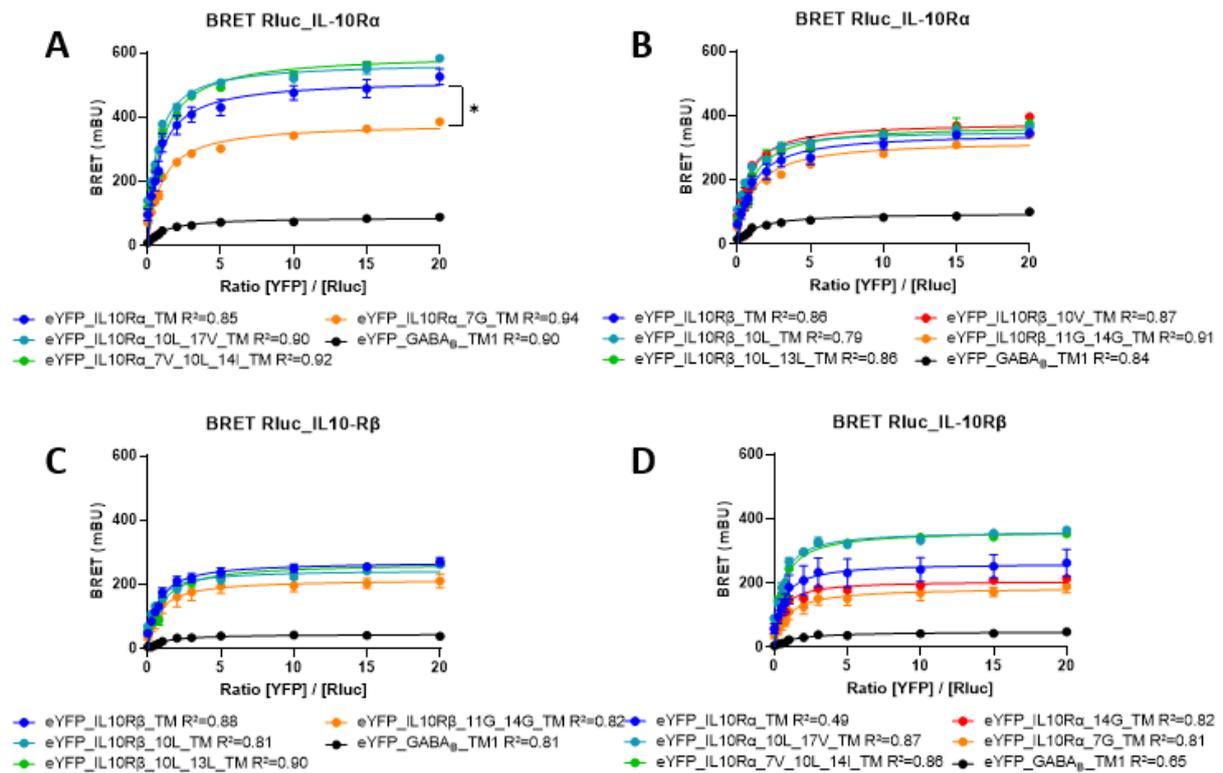
survival effects, antibody production of B lymphocytes and activation of CD8⁺ T cells, via the activation of STAT1 (3,6,20). These cells possess deleterious effects in MS where the peptide risks to activate them. A solution, would be to design partial agonists, as proposed by the Garcia lab (3). To verify if our peptides specifically target the anti-inflammatory properties of IL-10, it would be interesting to assess their effect on the activating phosphorylation of STAT1. Finally, another issue is the pharmacology of the MTP peptides. A concern about these compounds is their ability to cross the blood brain barrier (BBB). Membrane targeting peptides have already been tested *in vitro* and *in vivo*, in previous works of the laboratory, showing that they reach the central nervous system (31,32). Moreover, in both studied pathologies, the BBB is leaky, thereby facilitating the accessibility of the CNS to compounds (33,34). Another consideration is the solubility of the peptides, which has been evaluated by dynamic light scattering (DLS, data not shown). More experiments, like circular dichroism are needed to assess the structural organisation of the peptides. Finally, the absence of directed targeting strategy can be the cause of a low distribution of the peptides to their target. Biodistribution experiments are therefore needed, and the addition of targeting strategies to the peptides, like the conjugation to antibodies or nanocarriers give room for improvement.

To conclude, our study is the first to unravel the implication of the TM domain in the interactions of the subunits of the IL-10R. We found that the TM sequences of IL-10R α and IL-10R β interact with the full-length proteins in a specific manner and that certain amino acids of the TM sequence are essential for these interactions. Peptides mimicking the TM sequences of the two subunits, impair the activation of the receptor *in vitro*. The peptide reproducing the sequence of TM IL-10R β inhibits the activation of the receptor and possesses anti-cancer effects on glioblastoma. A better comprehension of the effects of the peptides on the inflammatory status of macrophages and microglia remains to be clarified, but they constitute a new approach for the targeting of the IL-10R platform.

References

1. Ouyang W, O'Garra A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity*. 2019;50(4):871-91.
2. Walter MR. The Molecular Basis of IL-10 Function: From Receptor Structure to the Onset of Signaling. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014;380:191-212.
3. Saxton RA, Tsutsumi N, Su LL, Abhiraman GC, Mohan K, Henneberg LT, et al. Structure-based decoupling of the pro- and anti-inflammatory functions of interleukin-10. *Science*. 2021;371(6535):eabc8433.
4. Shouval DS, Ouahed J, Biswas A, Goettel JA, Horwitz BH, Klein C, et al. Interleukin 10 Receptor Signaling. In: *Advances in Immunology*. 2014;122:177-210
5. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*. 2012;32(1):23-63.
6. Howes A, Gabryšová L, O'Garra A. Role of IL-10 and the IL-10 Receptor in Immune Responses. In: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier, 2014
7. Parisi L, Gini E, Baci D, Tremolati M, Fanuli M, Bassani B, et al. Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? *J Immunol Res*. 2018;2018:8917804.
8. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6:13.
9. Vogel DYS, Vereyken EJF, Glim JE, Heijnen PDAM, Moeton M, van der Valk P, et al. Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. *J Neuroinflammation*. 2013;10:35.
10. Kuntzel T, Bagnard D. Manipulating Macrophage/Microglia Polarization to Treat Glioblastoma or Multiple Sclerosis. *Pharmaceutics*. 2022;14(2):344.
11. Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci*. 2016;19(1):20-7.
12. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002;23(11):549-55.
13. Makita N, Hizukuri Y, Yamashiro K, Murakawa M, Hayashi Y. IL-10 enhances the phenotype of M2 macrophages induced by IL-4 and confers the ability to increase eosinophil migration. *Int Immunol*. 2015;27(3):131-41.
14. Lopes RL, Borges TJ, Zanin RF, Bonorino C. IL-10 is required for polarization of macrophages to M2-like phenotype by mycobacterial DnaK (heat shock protein 70). *Cytokine*. 2016;85:123-9.
15. Polyansky AA, Chugunov AO, Volynsky PE, Krylov NA, Nolde DE, Efremov RG. PREDDIMER: a web server for prediction of transmembrane helical dimers. *Bioinformatics*. 2014;30(6):889-90.
16. Krissinel E, Henrick K. Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. *J Mol Biol*. 2007;372(3):774-97.
17. Cobret L, De Tauzia ML, Ferent J, Traiffort E, Hénaoui I, Godin F, et al. Targeting the cis-dimerization of LINGO-1 with low MW compounds affects its downstream signalling. *Br J Pharmacol*. 2015;172(3):841-56.
18. Arpel A, Gamper C, Spenlé C, Fernandez A, Jacob L, Baumlin N, et al. Inhibition of primary breast tumor growth and metastasis using a neuropilin-1 transmembrane domain interfering peptide. *Oncotarget*. 2016;7(34):54723-32.
19. Pham-Van LD, Kuntzel T, Spenlé C, Chamarke Askar I, Birmpili D, El Khamlichi C, et al. Peptide-based inhibition of AMIGO3 antagonizes myelin inhibitory factors and promotes remyelination. Manuscript in preparation.
20. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765.
21. Westerfield JM, Barrera FN. Membrane receptor activation mechanisms and transmembrane peptide tools to elucidate them. *J Biol Chem*. 2020;295(7):1792-814.

22. Fink A, Sal-Man N, Gerber D, Shai Y. Transmembrane domains interactions within the membrane milieu: principles, advances and challenges. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1818(4):974-83.
23. Mossner S, Kuchner M, Fazel Modares N, Knebel B, Al-Hasani H, Floss DM, et al. Synthetic interleukin 22 (IL-22) signaling reveals biological activity of homodimeric IL-10 receptor 2 and functional cross-talk with the IL-6 receptor gp130. *J Biol Chem*. 2020;295(35):12378-97.
24. Taciak B, Białasek M, Braniewska A, Sas Z, Sawicka P, Kiraga Ł, et al. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PLoS ONE*. 2018;13(6):e0198943.
25. Henn A, Lund S, Hedtjärn M, Schratzenholz A, Pörzgen P, Leist M. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX - Altern Anim Exp*. 2009;26(2):83-94.
26. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*. 2011;164(4):1079-106.
27. Boillée S. Local and remote interactions between macrophages and microglia in neurological conditions. *Curr Opin Immunol*. 2022;74:118-124.
28. Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett*. 2015;368(1):7-13.
29. Numasaki M. IL-28 and IL-29 in Regulation of Antitumor Immune Response and Induction of Tumor Regression. In: Lustgarten J, Cui Y, Li S, éditeurs. *Targeted Cancer Immune Therapy*. New York, NY: Springer; 2009.
30. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958-69.
31. Binamé F, Pham-Van LD, Spénlé C, Jolivel V, Birmpili D, Meyer LA, et al. Disruption of Sema3A/Plexin-A1 inhibitory signalling in oligodendrocytes as a therapeutic strategy to promote remyelination. *EMBO Mol Med*. 2019;11(11):e10378.
32. Nasarre C, Roth M, Jacob L, Roth L, Koncina E, Thien A, et al. Peptide-based interference of the transmembrane domain of neuropilin-1 inhibits glioma growth in vivo. *Oncogene*. 2010;29(16):2381-92.
33. Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Macías-Islas MÁ, Flores-Alvarado LJ, Mireles-Ramírez MA, González-Renovato ED, et al. Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *Arch Med Res*. 2014;45(8):687-97.
34. Karmur BS, Philteos J, Abbasian A, Zacharia BE, Lipsman N, Levin V, et al. Blood-Brain Barrier Disruption in Neuro-Oncology: Strategies, Failures, and Challenges to Overcome. *Front Oncol*. 2020;10:563840.



Supplementary figure 1 : BRET evaluation of interactions between TM IL-10R WT subunits and TM IL-10R mutant subunits.

BRET saturation assays to measure the interaction of the TM Rluc subunits with eYFP mutated TM sequences of the subunits. For each curve, the fitting is expressed with the R-squared.

- (A) BRET assay for the interactions between IL-10Rα WT and IL-10Rα WT or mutated or GABA_B_TM1.
- (B) BRET assay for the interactions between IL-10Rα WT and IL-10Rβ WT or mutated or GABA_B_TM1.
- (C) BRET assay for the interactions between IL-10Rβ WT and IL-10Rβ WT or mutated or GABA_B_TM1.
- (D) BRET assay for the interactions between IL-10Rβ WT and IL-10Rα WT or mutated or GABA_B_TM1.

R² are the coefficients of determination of the one site specific binding non-linear fit curves.

* p<0.05, two-tailed parametric unpaired *t* test.

III. Systematiser les connaissances sur l'implication du domaine TM dans les interactions entre tous les récepteurs à activité tyrosine-kinase

Les connaissances concernant les implications du domaine TM dans l'activité des récepteurs membranaires s'accumulent et permettent de convaincre sur le rôle fondamental de ce domaine. Plusieurs plateformes de récepteurs ont ainsi été étudiées et ont permis d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles. Afin d'étendre les connaissances liées à l'implication du domaine TM dans l'interaction entre sous-unités de récepteurs ou entre corécepteurs, nous avons effectué un criblage à grande échelle par un test *in vitro* de BRET. Cette stratégie s'appuie dans un premier temps sur les récepteurs à un domaine TM, en particulier la famille des 58 récepteurs à activité tyrosine kinase. Le criblage effectué permet d'obtenir une vision globale des interactions entre les TM de cette famille et va permettre de décrypter le code de ces interactions.

1) Introduction : les récepteurs à activité tyrosine kinase

Les récepteurs à activité tyrosine kinase sont des récepteurs à un domaine TM de type I. Ils sont constitués d'un large domaine extracellulaire portant le site de fixation du ligand, un domaine TM et un domaine intracellulaire, possédant une activité tyrosine kinase catalytique permettant la phosphorylation des protéines de la cascade de signalisation. En fonction du domaine extracellulaire de ces récepteurs, vingt sous-familles ont été décrites. Parmi celles-ci, nous pouvons citer la famille des récepteurs aux facteurs de croissance épidermiques (EGFR), la grande famille des récepteurs aux éphrines (Eph), la famille des récepteurs aux facteurs de croissance des fibroblastes (FGFR), la famille des récepteurs au facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR) et les récepteurs au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR) (141).

Pour la plupart des RTKs, les récepteurs se trouvent sous forme inactive, sous forme de monomère dans la membrane. Après fixation du ligand sur la partie extracellulaire, deux monomères vont dimériser, permettant ainsi une transphosphorylation des tyrosines présentes dans le domaine intracellulaire. Par la suite, les protéines de la cascade de signalisation sont recrutées et par une activité de kinase, le récepteur induit la phosphorylation de ces protéines. Les

RTKs sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la survie, la différenciation, la migration et la régulation du métabolisme (142–144). En conséquence, de nombreuses pathologies sont associées à des dérégulations de ces récepteurs, en particulier les cancers pour lesquels de nombreuses mutations des RTKs sont décrites (notamment EGFR) (143). Des mutations d'autres récepteurs sont responsables d'autres pathologies, comme des dysplasies squelettiques sévères (pour des mutations des FGFR) (143). La plupart des dimères de RTKs décrits sont des homodimères. Cependant, certains récepteurs peuvent également former des hétérodimères, avec d'autres membres de la famille des RTKs. C'est notamment le cas pour les récepteurs de la famille de l'EGFR, comme ErbB2, qui peuvent former des hétérodimères entre eux (145). Dans la famille des récepteurs aux éphrines, EphA3 peut former des hétérodimères avec EphB2 (146). Les études les plus récentes indiquent que les mécanismes de signalisation des RTKs sont plus complexes, puisque pour un certain nombre de récepteurs, des formes dimériques (par exemple le récepteur à l'insuline IR), voire oligomériques (par exemple EGFR), existent à l'état basal, sans stimulation par un ligand. Dans ces cas, la fixation du ligand induit des changements conformationnels à l'origine de la phosphorylation des tyrosines (144). Dans d'autres cas, la formation d'un simple dimère ne suffit pas à activer la voie de signalisation, mais un véritable *cluster* d'oligomères est nécessaire (144).

L'implication du domaine TM dans la signalisation, en stabilisant les dimères et des structures actives fait consensus. Des mutations de certains TM de RTKs ont été décrites comme pathogéniques. Ainsi, des mutations I665V ou V659E dans le TM d'ErbB2 sont associées à un surrisque de développer des cancers en favorisant des dimères actifs. Un autre exemple est la mutation G380R du TM de FGFR3, responsable d'achondroplasie, par une diminution de l'activation du récepteur (147). Les mutations des domaines TM des RTKs peuvent affecter l'activité des récepteurs de plusieurs manières : en modifiant la stabilité des dimères, en changeant les interactions entre le récepteur et le ligand, en impactant sur les contacts des domaines extra- ou intracellulaires ou en modifiant la réponse de la voie de signalisation sous-jacente (147). Ce genre de dysfonctionnements constitue des cibles de choix pour le développement de nouveaux composés possédant des propriétés thérapeutiques.

Au vu de l'intérêt porté à cette famille de récepteurs et aux possibilités de formations d'hétérodimères au sein de la famille, il pourrait être intéressant d'étudier les interactions entre tous

les domaines TM des récepteurs entre eux. Une étude de ce type permettrait d'identifier des cibles potentielles. Un premier criblage de ce type a été réalisé en 2009 par l'équipe de D. Schneider, sur un essai ToxCAT (148). Ils ont mesuré la propension des 58 domaines TM des RTKs à former des homo-oligomères. Ils ont pu démontrer que tous les domaines TM des RTKs ont la possibilité de former des homodimères, plus ou moins forts, comparés à la glycophorine A (GpA). Cette dernière constituait alors l'unique protéine pour laquelle une très forte propension à la dimérisation du domaine transmembranaire était décrite. Cette étude a permis d'obtenir des informations précieuses sur les interactions entre domaines TM des RTKs, mais présente deux limites. La première est que ce test n'a été réalisé que pour les homodimères, or comme discuté précédemment, les RTKs sont nombreux à former des hétérodimères. La deuxième est la méthode utilisée, puisque le test est réalisé dans une membrane bactérienne, s'éloignant de la réalité biologique. Pour compléter cette étude, nous avons donc décidé de mener des travaux pour mesurer les interactions des homo- et hétérodimères pour tous les 58 domaines TM des RTKs. Nous avons réalisé un criblage *in vitro* dans un système utilisant des cellules humaines.

2) Matériel et méthodes : le criblage *in vitro* par BRET

Nous avons effectué un criblage *in vitro* en utilisant un test de BRET, dont le principe a été présenté précédemment (Introduction, I, 2). La particularité de ce test est qu'il a été effectué en utilisant des robots pipeteurs. Par conséquent, un protocole entier a dû être mis au point et validé (Figure 18). Nous présenterons ici chaque étape du protocole, ainsi que les procédures de validation associées le cas échéant.

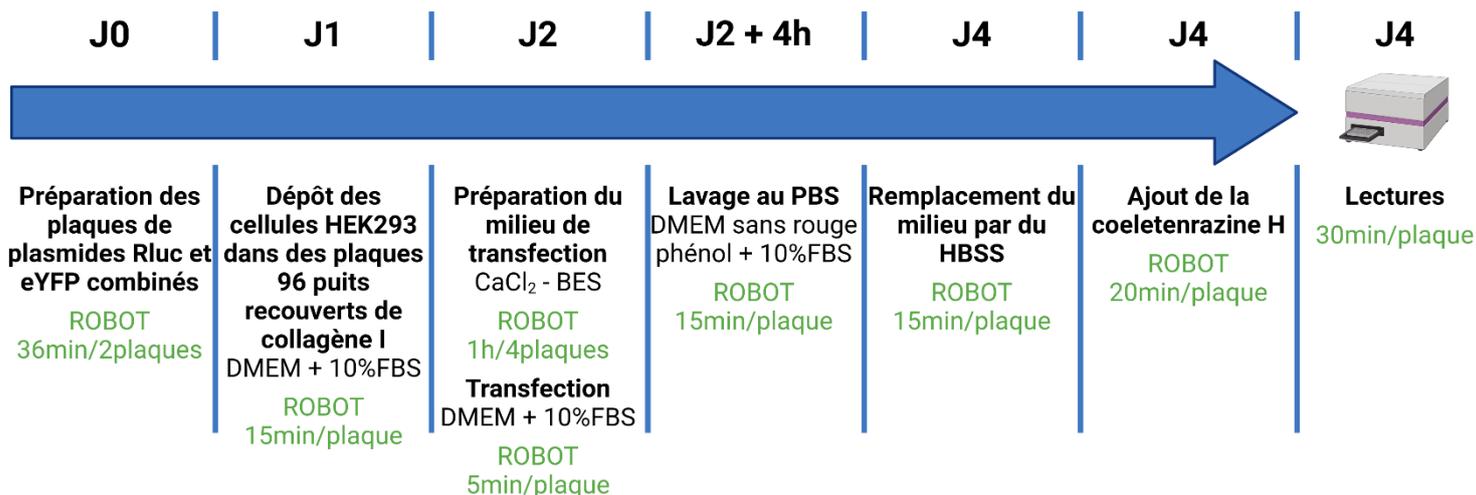


Figure 18 : Protocole du test de BRET automatisé.

L'ensemble des étapes du protocole ont été mises au point et testées pour permettre une automatisation.

(Figure réalisée sur Biorender.com.)

Pour chaque paire de séquences TM pour laquelle un signal doit être mesuré, un partenaire de la paire doit être fusionné à la séquence codant pour la *Renilla* luciférase (Rluc), tandis que l'autre doit être fusionné à la séquence pour la eYFP (*enhanced Yellow Fluorescent Protein*). La séquence TM et le gène codant pour le rapporteur sont synthétisés puis clonés dans des plasmides par la société GeneCust. Les produits obtenus sont ensuite amplifiés pour obtenir 1mg par la société Biozilla. Les plasmides ont été séquencés pour vérifier l'intégrité des transgènes.

La première étape du protocole consiste à préparer les mélanges de plasmides Rluc et eYFP. Pour cela, un robot Biomek NX^P (Beckman Coulter) a pipeté les bons volumes pour obtenir une concentration finale de plasmide Rluc à 0,75ng/μL et de plasmide eYFP à 1,5ng/μL dilués en Tris-EDTA (Sigma) dans les puits de plaques transparentes 651201 (Greiner), pour un volume final de 20μL. Ces concentrations ont été déterminées précédemment au sein du laboratoire et correspondent à un rapport [eYFP]/[Rluc] ≈ 2 et pour lequel, la valeur de BRET obtenue correspond à la valeur de BRET₅₀ (soit 50% du BRET_{max}). Les concentrations en tant que telles, ont été déterminées par des essais en déposant des quantités croissantes de plasmides. La première et la douzième colonne dans les plaques consistent en des duplicatas de contrôles positifs et négatifs des manipulations. Le contrôle positif correspond à une interaction connue et décrite dans le laboratoire, l'homodimère du domaine TM de LINGO1 (voir partie Résultats, I). Le contrôle négatif

correspond également à une paire pour laquelle des travaux du laboratoire ont montré l'absence d'interaction, l'hétérodimère entre les séquences TM de LINGO1 (en Rluc) et de PDGFR α (en eYFP). La deuxième colonne consiste en une condition comprenant uniquement des plasmides Rluc, qui sera utilisée pour les calculs de ratios BRET. Enfin, les neuf colonnes suivantes correspondent aux conditions testées, en gardant le même plasmide Rluc par ligne et en modifiant les plasmides eYFP. Un total de 62 plaques a été déposé et congelé à -20°C.

La deuxième étape consiste à déposer les cellules HEK293 dans des plaques 96 puits blanches à fond transparent Costar 3903 (Corning). Auparavant, un *coating* au collagène I (4mg/mL, Sigma) a été réalisé pendant une heure, en diluant le collagène I au 1/200 dans du PBS (Gibco). Ensuite, les cellules ont été déposées à 20 000 par puits dans du milieu DMEM haute teneur en glucose (4,5 g/L) avec L-glutamine stable et pyruvate de sodium (Dutscher), enrichi en sérum de bovin fœtal inactivé à 10% (Gibco). Les cellules sont ensuite laissées à adhérer pendant 24 heures dans un incubateur à 37°C et 5% CO₂.

L'étape suivante est la transfection des cellules avec les plasmides préparés précédemment, réalisée par le robot Biomek FX^P (Beckman Coulter). Pour cela, les plaques sont décongelées et 8 μ L de chlorure de calcium (Sigma) sont ajoutés aux plasmides. Ensuite, 26 μ L de BES (Sigma) sont ajoutés goutte à goutte. Après vingt minutes, 25 μ L de ce mélange sont déposés sur les cellules. Après quatre heures, un lavage est nécessaire pour ôter le milieu de transfection devenant toxique. Pour cela, le milieu est aspiré, remplacé par du PBS, qui est lui-même aspiré et remplacé par du milieu DMEM haute teneur en glucose (4,5 g/L) sans pyruvate de sodium et rouge phénol (Sigma), supplémenté en 10% de FBS inactivé et 1% de L-glutamine (Sigma). Les cellules sont ensuite remises à l'incubateur pendant 24 heures pour permettre l'expression du plasmide.

L'étape suivante consiste à remplacer le milieu de culture des cellules par le tampon le plus propice pour effectuer la lecture du signal après ajout du substrat. Pour cela, le milieu est aspiré et un rinçage par le PBS est effectué. Ensuite, du tampon HBSS (Sigma) est ajouté. Le substrat (coelenterazine H, Interchim) est ajouté par le robot NX^P à une concentration finale de 5 μ M. Dans les vingt minutes suivantes, une lecture à 37°C des signaux de bioluminescence et de fluorescence à 485 \pm 10nm et à 535 \pm 12nm respectivement est effectuée sur le lecteur Victor Light (Perkin). Le BRET ratio est ensuite calculé en suivant la formule suivante :

$$BRET\ ratio = \left(\frac{Fluorescence\ (eYFP)_{test}}{Bioluminescence\ (Rluc)_{test}} - \frac{Fluorescence\ (eYFP)_{ctrl\ Rluc}}{Bioluminescence\ (Rluc)_{ctrl\ Rluc}} \right) \times 1000$$

où “test” correspond à la condition testée et co-transfectée et “ctrl Rluc” à la condition transfectée uniquement avec le plasmide Rluc et correspondant au signal de bruit de fond (149,150). Le ratio BRET est ensuite exprimé en unités milliBRET (mBu) avec un $BRET_{max}$ correspondant au signal maximal mesuré et un $BRET_{50}$ correspondant à 50% du $BRET_{max}$.

Comme précisé plus haut, chaque étape a été validée, répétée et contrôlée grâce à un sous-ensemble de cibles pour lesquelles des interactions sont connues ou non. Ainsi, nous avons vérifié que les plaques de plasmides peuvent être congelées et si les cellules résistent à la transfection et aux lavages. Nous avons également évalué le taux et l'efficacité de transfection par une lecture de la fluorescence à 535nm, après une excitation à 485nm sur l'appareil EnVision Multimode plate reader (Perkin Elmer). Finalement nous avons vérifié la reproductibilité et comparé à un protocole effectué entièrement à la main. L'ensemble de ces étapes de validation, entrent dans des considérations d'amélioration continue de la qualité, en suivant les règles dictées par l'ISO9001, dont le laboratoire (Plateforme de chimie biologique intégrative de Strasbourg, PCBIS, CNRS UAR3286) est certifié.

3) Résultats : un criblage à grande échelle

a) Validation technique

Le protocole de BRET à grande échelle a été mis au point et validé à chaque étape. Nous avons pu démontrer que le test est reproductible (**Figure 19**). En effet, en sélectionnant certaines séquences aléatoirement et en répétant trois fois les mesures pour leurs interactions entre elles, nous avons constaté des coefficients de variation compris entre 1 et 22mBu et entre 0,6 et 14%. Ces valeurs faibles sont indicatrices d'une variabilité acceptable pour chaque condition et permettent de s'affranchir d'effectuer des répétitions. Nous avons donc validé un protocole pour effectuer ce criblage à grande échelle et qui pourra être utilisé à l'avenir pour d'autres criblages. Chaque condition criblée ne sera effectuée que dans un seul puits et ne sera répétée que si elle est sélectionnée pour des études complémentaires.

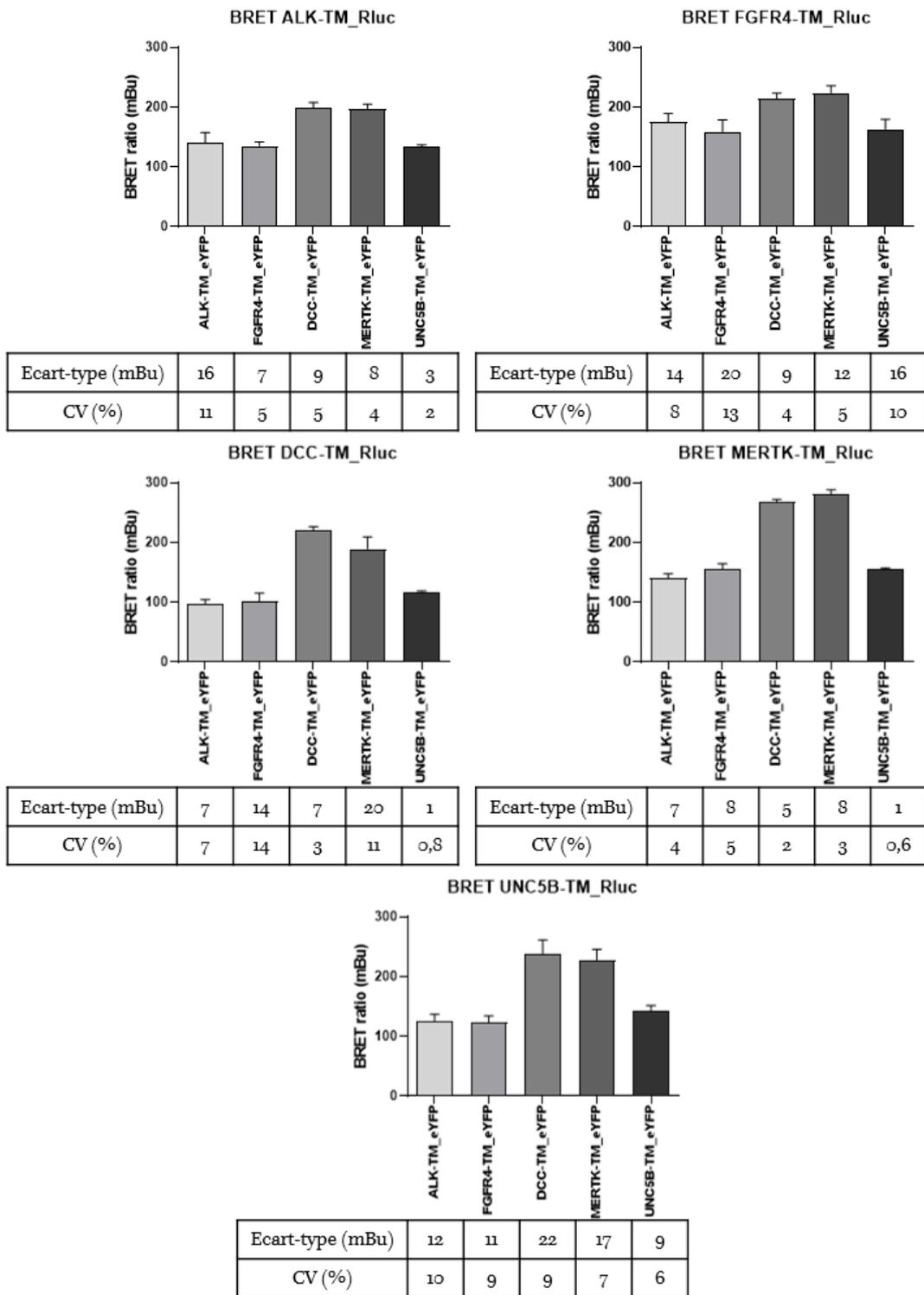


Figure 19 : Reproductibilité des ratios de BRET.

Pour vérifier la reproductibilité des mesures, les mêmes conditions ont été répétées trois fois pour plusieurs séquences TM sélectionnées aléatoirement. Les barres d'erreur sont exprimées en écart-type (SD). CV = coefficient de variation, défini par le rapport de l'écart-type à la moyenne.

N=3 pour chaque condition.

b) L'asymétrie des valeurs

Du fait de la construction du test (64 x 64 conditions), pour chaque paire de séquences TM deux valeurs de BRET ratio sont obtenues. En effet, pour chaque paire, il y a une valeur dans le sens protéine A_Rluc / protéine B_eYFP et une autre valeur dans le sens protéine B_Rluc / protéine A_eYFP. Afin de déterminer si la différence entre les deux valeurs doit être prise en considération pour l'analyse des résultats, elle a été calculée entre les deux valeurs obtenues pour chaque combinaison de manière relative. Dans cette étude systématique les différences obtenues pour la moitié (1822 valeurs, soit 44%) des interactions testées sont inférieures ou égales à 40% (**Figure 20**). Seules 418 (10%) mesures ont une différence inférieure ou égale à 10%. Dans la plupart des cas, les différences entre les deux valeurs ne sont pas négligeables. Pour la suite des analyses nous avons sélectionné la valeur maximale obtenue, indépendamment du sens des paires transfectées, ce qui correspond à 2080 valeurs.

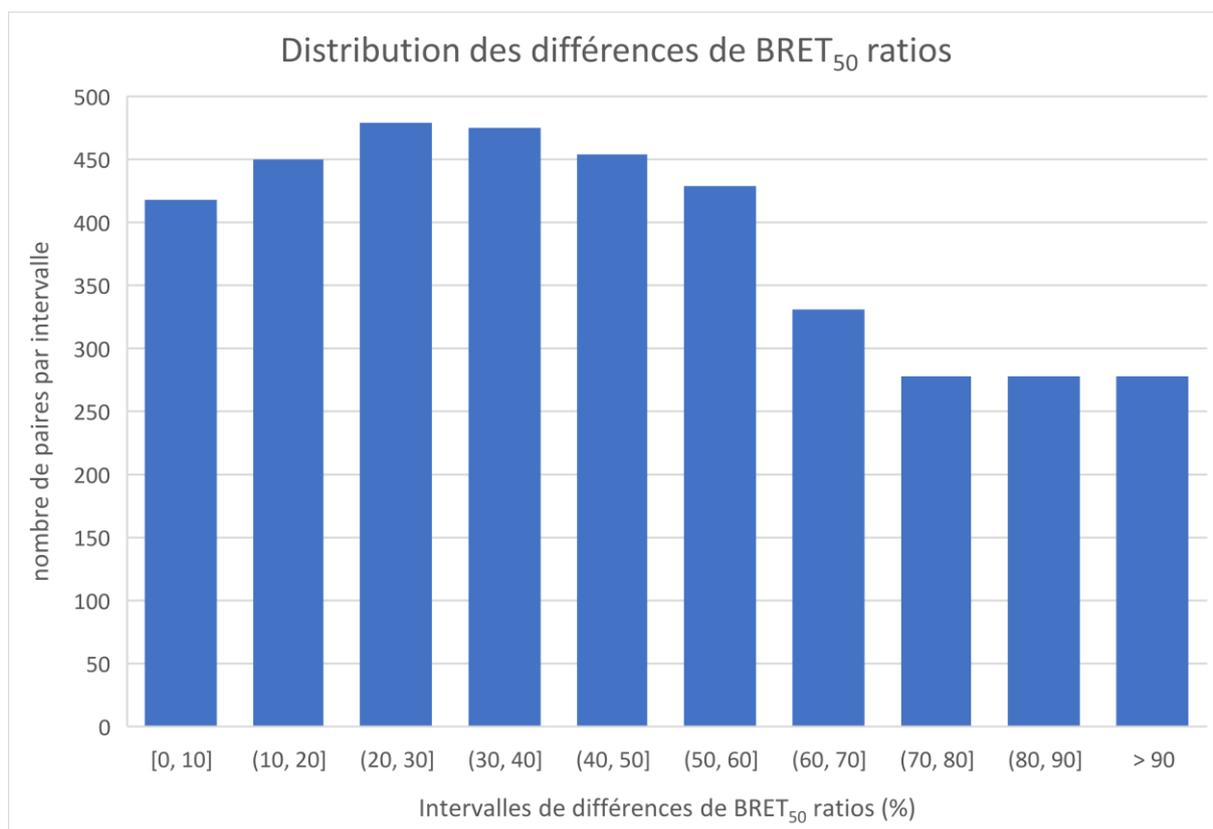


Figure 20 : Asymétrie entre les deux valeurs de chaque paire.

Pour chaque paire de deux séquences TM différentes, deux valeurs de BRET ratio sont obtenues, car chaque membre de la paire est couplé une fois à Rluc et une fois à eYFP. La différence relative entre les deux valeurs est présentée et reflète l'asymétrie du système BRET. La distribution des différences de valeurs en pourcentage pour chaque paire est présentée dans des intervalles de 10%.

c) Une carte d'interaction complète et spécifique

Le criblage à grande échelle réalisé par BRET a permis d'évaluer l'interaction entre tous les domaines TM des 58 RTKs et de six récepteurs à dépendance sélectionnés en **figure 21**. Ces derniers ont été ajoutés aux RTKs sur la base d'une recherche bibliographique et sont identifiés comme des cibles d'intérêt dans de nombreuses pathologies, dont le cancer (151–153). Un total de 4096 valeurs a ainsi pu être obtenu avec des valeurs de BRET ratio comprises entre 0 et 618mBu et correspondant à 2080 interactions différentes. La moyenne des valeurs est de 155mBu et la médiane de 150mBu. Cependant, comme défini précédemment, du fait de l'asymétrie du système, seule la valeur maximale pour chaque paire interagissant a été conservée. Ainsi, il reste un total de 2080 valeurs d'interactions, avec un BRET ratio moyen de 168mBu et médian de 186mBu (**Figure 22**). Nous avons

déterminé la spécificité de ce signal sur un nombre restreint de paires (soixante interactions) en effectuant des expériences de BRET de saturation. Ainsi, dans ce test, la concentration en plasmide Rluc est fixe (à 0,75ng/mL) et la concentration de plasmide eYFP est croissante dans chaque condition (gamme entre 0,1875 et 11,25ng/mL), correspondant à des rapports [eYFP]/[Rluc] compris entre 0,25 et 15. Dans une première expérience, nous avons mesuré le BRET de saturation de FLT3-TM avec PlexD1-TM, LMTK2-TM, EphA2-TM et LTK-TM et avons pu démontrer que les interactions des TM de FLT3 avec PlexD1, LMTK2 et EphA2 sont spécifiques ($R^2 > 0.70$, courbes bleue, verte et rouge, **figure 23A**). En revanche, le signal entre les TM de FLT3 et LTK est la marque d'une interaction non spécifique ($R^2 = 0.70$, courbe mauve, **figure 23A**). Dans une deuxième expérience, nous avons mesuré le BRET de saturation entre FGFR4-TM et EphA8-TM, DCC-TM, DDR2-TM et FGFR1-TM. A nouveau, les interactions avec les TM des trois premiers partenaires correspondent à des signaux spécifiques, alors que le signal entre les TM de FGFR4 et FGFR1 est aspécifique (**Figure 23B**). Cette analyse montre que seules les interactions mesurées avec un signal de $BRET_{50}$ au-delà de 50mBu correspondent à des interactions spécifiques. Ainsi sur l'ensemble de la matrice d'interactions, 463 paires présentent un signal inférieur à 50mBu (soit 22%) et correspondent à des paires qui n'interagissent pas. Les 1617 (78%) valeurs supérieures au seuil, correspondent à des paires de domaines transmembranaires qui interagissent spécifiquement, avec un signal compris entre 50 et 618mBu.

TM des récepteurs à activité tyrosine kinase	TM des récepteurs à activité tyrosine kinase	TM des récepteurs à dépendance
ALK	INSRR	DCC
CSF1R	KIT	NEO1
DDR1	LMTK1	NOTC3
DDR2	LMTK2	PLXD1
EGFR	LMTK3	TNR16
EPHA1	LTK	UNC5B
EPHA2	MERTK	
EPHA3	MET	
EPHA4	MUSK	
EPHA5	NTRK1	
EPHA6	NTRK2	
EPHA7	NTRK3	
EPHA8	PGFRA	
EPHAA	PGFRB	
EPHB1	PTK7	
EPHB2	RET	
EPHB3	RON	
EPHB4	ROR1	
EPHB6	ROR2	
ERBB2	ROS1	
ERBB3	RYK	
ERBB4	STYK1	
FGFR1	TIE1	
FGFR2	TIE2	
FGFR3	TYRO3	
FGFR4	UFO	
FLT3	VGFR1	
IGF1R	VGFR2	
INSR	VGFR3	

Figure 21 : Liste des 64 cibles du criblage BRET.

Les deux premiers tableaux présentent la liste des 58 RTKs humains et le troisième la liste des 6 récepteurs à dépendance humains sélectionnés pour le criblage. Parmi les RTKs, certains sont également classés comme récepteurs à dépendance et sont identifiés avec un fond vert.

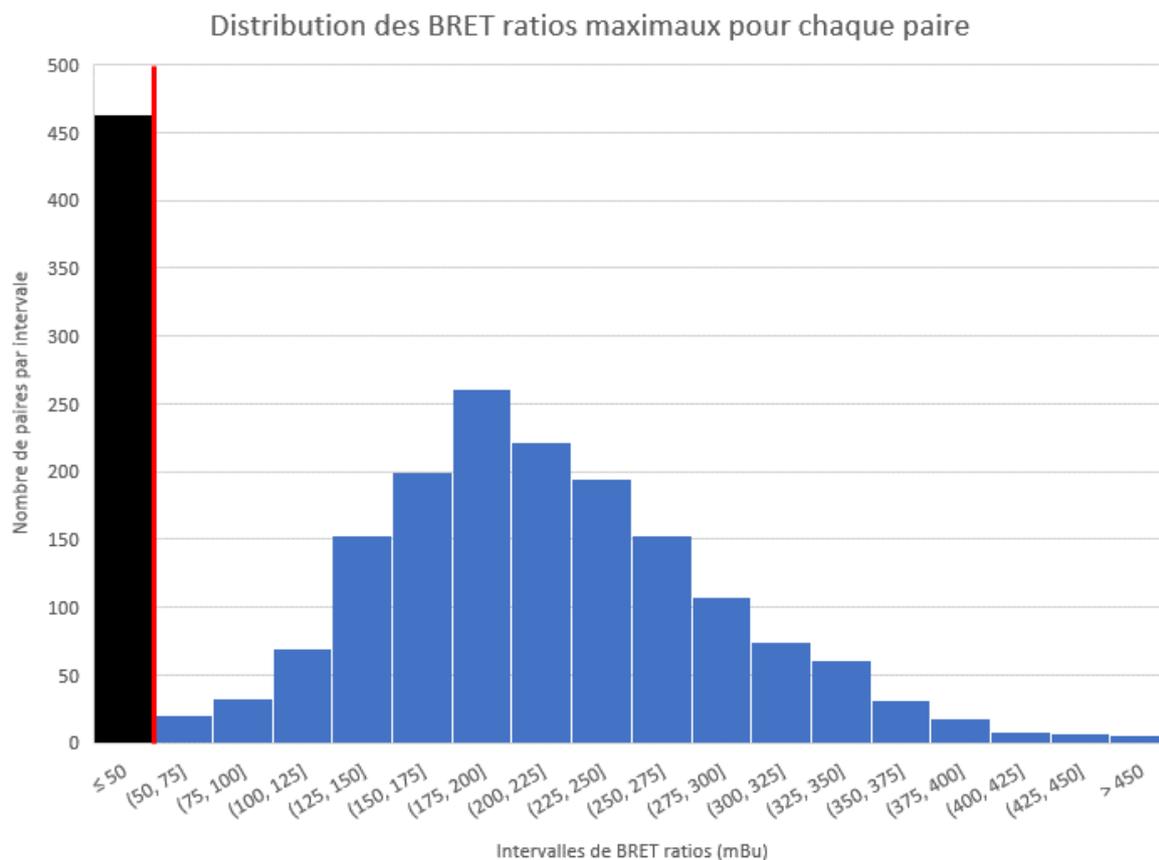


Figure 22 : Distribution des ratios de BRET₅₀, en prenant le maximum pour chaque paire.

Pour les 4096 interactions BRET mesurées (64 x 64), la plus forte des valeurs de BRET₅₀ ratio des deux interactions obtenues (sens Rluc_A / eYFP_B et Rluc_B / eYFP_A) est conservée. La distribution de ces valeurs de BRET ratio maximal pour chaque paire dans des intervalles de 25mBu est présentée. La ligne rouge représente le seuil (50mBu) entre un signal considéré comme spécifique et reflétant une interaction plus ou moins forte entre les deux séquences (barres bleues) et un signal considéré comme non spécifique résultant du BRET de collision ou provenant du bruit de fond (barre noire).

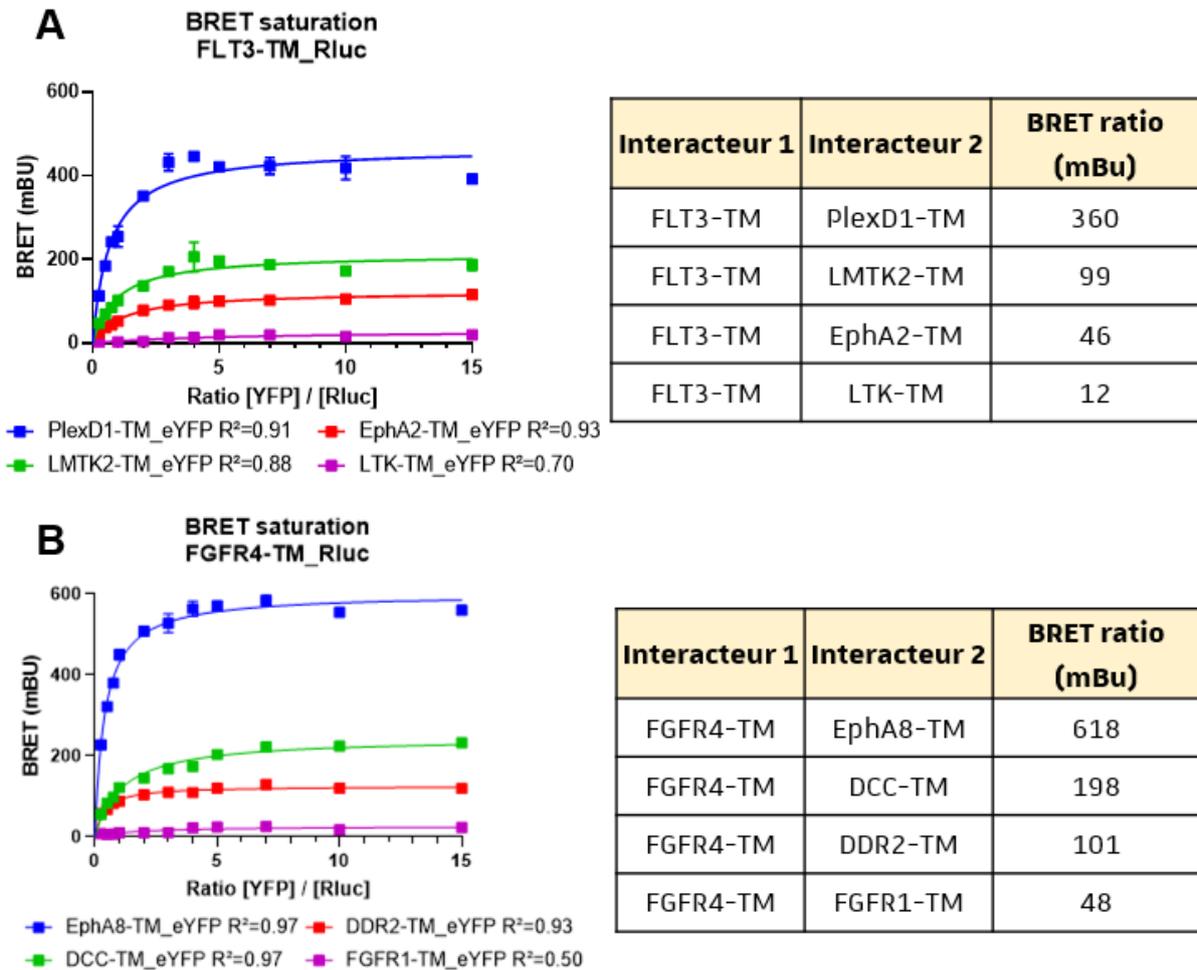


Figure 23 : Courbes de saturation de BRET.

Afin de vérifier que les signaux obtenus lors du criblage correspondent à des signaux spécifiques, des courbes de saturation BRET ont été réalisées pour un certain nombre de paires.

(A) Courbes de BRET de saturation avec le plasmide Rluc_FLT3-TM et eYFP_PlexD1-TM (courbe bleue), eYFP_LMTK2-TM (courbe verte), eYFP_EphA2-TM (courbe rouge) et eYFP_LTK-TM (courbe rose). Le BRET ratio mesuré lors du criblage est présenté pour chaque paire dans le tableau à droite.

(B) Courbes de BRET de saturation avec le plasmide Rluc_FGFR4-TM et eYFP_EphA8-TM (courbe bleue), eYFP_DCC-TM (courbe verte), eYFP_DDR2-TM (courbe rouge) et eYFP_FGFR1-TM (courbe rose). Le BRET ratio mesuré lors du criblage est présenté pour chaque paire dans le tableau à droite.

Courbe d'ajustement non linéaire de la liaison spécifique à un site. N=2 pour chaque condition de BRET de saturation.

d) Un interactome aux perspectives d'analyses très larges

Le criblage effectué a permis d'obtenir l'interactome complet des domaines TM des RTKs et de certains récepteurs à dépendance. Les perspectives d'analyse de cet interactome sont nombreuses. Notre point de départ a été de s'intéresser aux dix interactions avec les signaux BRET₅₀ les plus forts (**Figure 24**). Il serait intéressant de comprendre pourquoi les BRET₅₀ ratios sont si élevés pour ces paires, mais également dans quelle mesure les cartes des interactions entre ces séquences sont liées. En s'intéressant plus précisément aux cinq meilleures interactions pour les quatre premiers TM de RTKs (FGFR4, EphA8, DDR1 et DDR2), nous pouvons constater que de nombreuses interrelations existent dans les cartes d'interactions (**Figure 25**). En effet, EphA8-TM constitue un des meilleurs interacteurs pour les trois autres TM (FGFR4, DDR1 et DDR2). De plus, TYRO3-TM fait partie des meilleurs partenaires d'interaction à la fois pour les TM de FGFR4, EphA8 et DDR1 ; EphA5-TM pour les TM de FGFR4 et DDR2 et finalement VGFR2-TM pour les TM de DDR1 et DDR2. Ces interrelations sont intéressantes dans la mesure où lorsque l'un de ces récepteurs est ciblé, d'autres peuvent bénéficier du même ciblage.

Interacteur TM 1	Interacteur TM 2	BRET ratio (mBu)
FGFR4	EphA8	618
DDR2	DDR1	516
FGFR4	FLT3	491
DDR2	DDR2	463
EGFR	Notch3	452
EphB2	Notch3	451
TIE2	FLT3	447
VGFR2	Notch3	445
LMTK3	Notch3	445
MERTK	Notch3	444

Figure 24 : Les dix paires avec les valeurs de ratio de BRET₅₀ les plus fortes.

De toutes les interactions pour lesquelles un signal BRET₅₀ a été mesuré, ce tableau présente les dix interactions pour lesquelles le signal est le plus fort. Ainsi, la paire avec le signal le plus fort est l'interaction entre le TM de FGFR4 et le TM d'EphA8 à 618mBu.

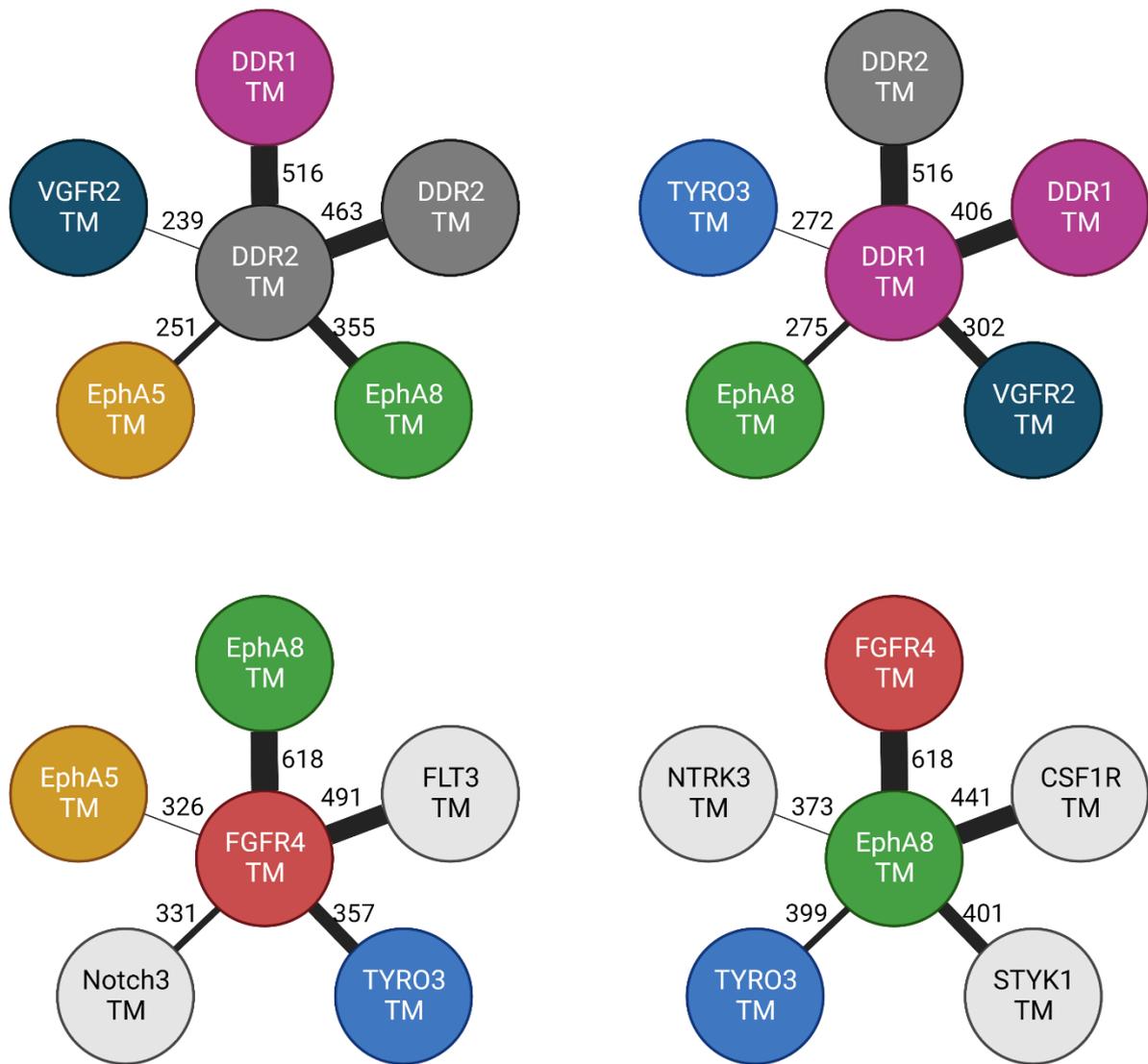


Figure 25 : Les cartes d'interaction des quatre séquences aux BRET ratios les plus élevés.

Les cartes d'interactions représentent les cinq plus fortes interactions mesurées pour les TM de DDR1, DDR2, FGFR4 et EphA8, qui sont les séquences ayant les valeurs de BRET₅₀ ratio les plus élevées du criblage. Les valeurs à côté des barres indiquent la valeur de BRET₅₀ ratio de l'interaction représentée par les lignes noires. Le code couleur se rapporte aux séquences communes entre les quatre cartes d'interaction.

4) Discussion : un criblage ouvrant la voie à de nouvelles approches thérapeutiques ?

Le domaine TM des récepteurs membranaires possède des rôles primordiaux dans leur dimérisation et leur activation. Pour la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase ces phénomènes ont été décrits, pour quelques membres de la famille (147,154,155). Dans le cadre de ce projet, nous avons effectué un criblage à haut débit afin d'avoir l'image complète des interactions de tous les domaines TM de la famille des RTKs et de six récepteurs à dépendance entre eux. Ce criblage a été effectué par un test de transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET). Dans un premier temps, nous avons mis au point un protocole assisté par robot et pour lequel chaque étape a été validée en suivant des préceptes de gestion de la qualité ISO9001. Un aspect critique de la validation technique a été de vérifier la reproductibilité de l'essai. En effet, dans le criblage, chaque condition ne peut être répétée qu'une seule fois pour des raisons de coût de temps machine et de main d'œuvre. En répétant plusieurs fois certaines conditions sélectionnées aléatoirement, nous avons pu constater que la variabilité est très faible, ne dépassant pas, dans 60% des cas, les 10% de variabilité. Dans tous les cas, les interactions seront revérifiées pour chaque interaction faisant l'objet d'une analyse détaillée. L'analyse en BRET sera alors répétée pour l'interaction des séquences TM, mais aussi pour les protéines entières afin d'éliminer d'éventuels faux-positifs. Pour chaque paire (sauf les homodimères), deux valeurs de BRET ratio sont obtenues par le criblage. En observant la différence entre les deux valeurs, nous pouvons constater que dans seulement 10% des cas elle est négligeable avec une différence de signal inférieure à 10%. Pour les 90% de cas restants, cette différence est supérieure à 10% et une certaine asymétrie des valeurs apparaît. Cette asymétrie peut survenir à cause d'une différence d'orientation entre les deux configurations (A_Rluc – B_eYFP versus B_Rluc – A_eYFP). La distance minimale entre les deux rapporteurs pour observer un signal BRET est de 10nm. Dans le premier cas, lorsque A interagit avec B, les deux rapporteurs sont très proches et un fort signal BRET peut être mesuré. Dans le second cas cependant, même si B interagit avec A, l'orientation des rapporteurs Rluc et eYFP peut être différente et la distance entre eux peut être supérieure. Dans ce cas, le signal BRET mesuré est plus faible (**Figure 26**). Pour s'affranchir de cette asymétrie, nous n'avons sélectionné qu'une seule valeur pour chaque paire. Pour minimiser le risque de faux-négatifs et favoriser les interactions fortes, nous avons sélectionné la valeur maximale

pour chaque paire. Cette sélection nous a permis d'obtenir 2080 valeurs de BRET ratio, correspondant aux données d'interactions de l'ensemble des domaines TM des RTKs. Par la suite, nous avons démontré la spécificité de ces valeurs et déterminé un seuil à 50mBu au-delà duquel une interaction est considérée comme spécifique et réelle. Nous avons sélectionné deux cibles couplées à Rluc (FLT3 et FGFR4) et pour chacune quatre interacteurs couplés à eYFP (respectivement PlexD1, LMTK2, EphA2, LTK et EphA8, DCC, DDR2, FGFR1). Pour ces paires, nous avons effectué des expériences de BRET de saturation. Pour les paires avec un BRET ratio supérieur à 50mBu, nous avons constaté que le signal obtenu forme une courbe hyperbolique correspondant à un signal spécifique. Pour les paires avec un BRET ratio inférieur à 50mBu, le signal obtenu forme une droite, caractéristique du BRET de collision qui est non spécifique. En appliquant ce seuil sur les 2080 valeurs obtenues du criblage, 22% (463 paires) ont un BRET ratio inférieur à 50mBu et correspondent donc à des paires n'interagissant pas. Cette information permet de conforter la validité de l'essai mais aussi d'appuyer la spécificité d'interaction des domaines TM dans la mesure où ceux-ci n'interagissent pas tous entre eux de manière erratique. Les 78% de paires restantes ont des BRET ratio s'échelonnant entre 50 et 618mBu, avec un maximum d'interactions (42%) comprises entre 150 et 225mBu. Ainsi, il apparaît que trois quarts des domaines TM des RTKs interagissent entre eux, laissant percevoir de nouvelles interactions encore non décrites. Ceci est en accord avec la vision de l'extraordinaire complexité des interactions entre RTKs qui commence à être révélée (156). Au regard des prédictions des motifs canoniques d'interactions (de type [G, A, S]xxx[G, A, S]) via les segments TM, présents dans deux tiers des récepteurs bitopiques, cette complexité des interactions dépend nécessairement de motifs et de règles d'interactions qui doivent être élucidés.

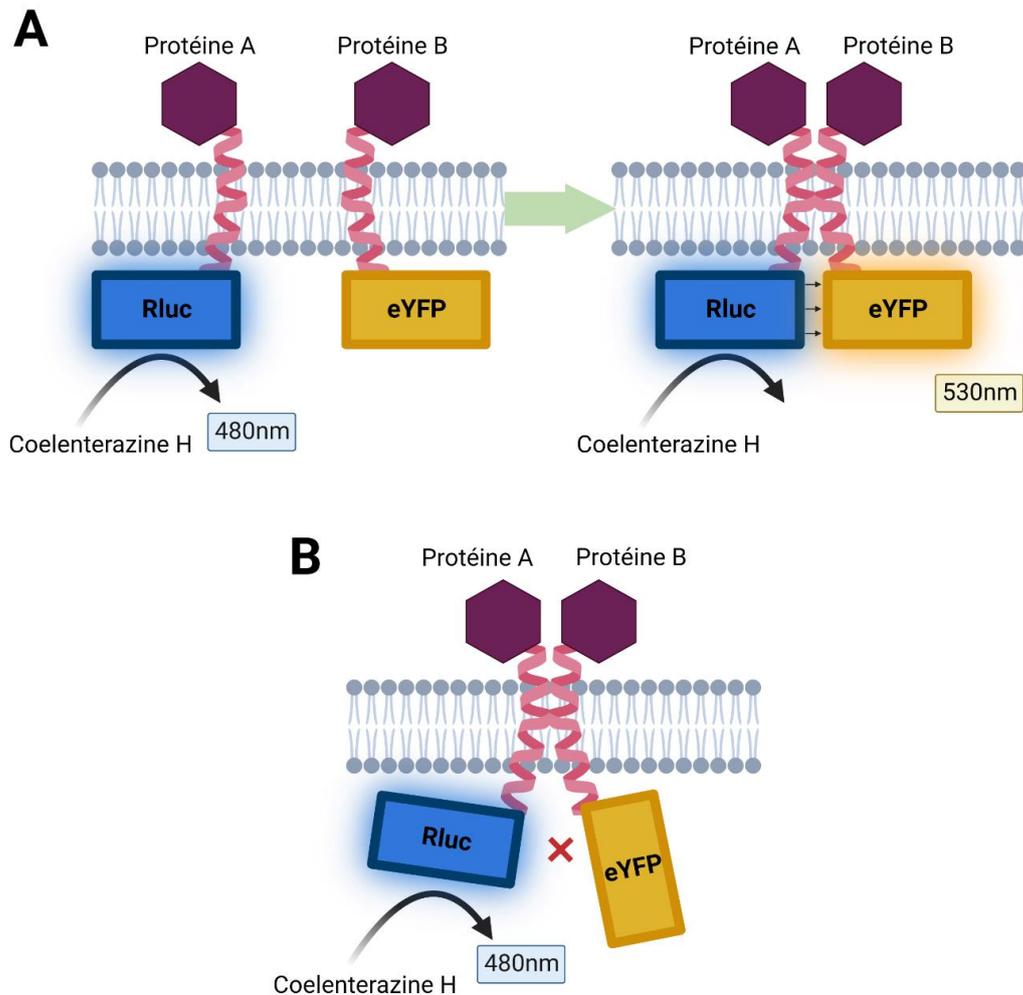
Cette véritable carte d'interaction constitue une banque de données très large avec de nombreuses possibilités d'analyse et d'exploitation qui donne une réalité de terrain à confronter avec les données d'analyses des séquences et des prédictions de structure. Le résultat de ce criblage systématique peut être mis à disposition de la communauté scientifique et peut servir pour de nombreuses études, à l'image de celui effectué par l'équipe de D. Schneider en 2009. Ils avaient analysé l'ensemble des homodimères des segments TM au sein de la famille des RTKs par un test ToxCAT et ont effectué une classification des paires en fonction de la probabilité d'interaction (148). En comparant leurs résultats avec les nôtres, nous pouvons constater une similarité. En effet, ils indiquent que les deux plus forts homodimères sont ceux des récepteurs DDR2 et DDR1. Dans notre

cas, nous observons les mêmes résultats (homodimère DDR2 : 463mBu, homodimère DDR1 : 406mBu). Au contraire, la paire avec le plus faible signal est FGFR1 dans les deux criblages (en BRET : 9mBu). Certaines différences peuvent toutefois être notées. Ainsi, l'homodimère TIE1 est classé quatrième dans l'article de 2009, mais possède un des signaux BRET les plus faibles dans notre cas (13mBu). Les différences existantes peuvent s'expliquer par la différence de méthode, effectuée dans une membrane bactérienne dans un cas et humaine dans le nôtre. Un second niveau d'analyse que nous avons effectué est l'étude des paires avec les BRET ratios les plus forts, constituant des « super-interacteurs ». En observant les quatre RTKs des deux paires avec les BRET ratios les plus élevés (FGFR4 – EphA8 et DDR2 – DDR1) et en construisant les cartes d'interaction de ces quatre RTKs, nous pouvons remarquer de nombreuses interrelations. Ainsi, certains partenaires avec les plus forts BRET ratio de ces quatre RTKs sont communs, à l'image d'EphA8 et TYRO3 par exemple. Ces données ouvrent des perspectives de conception de composés ciblant plusieurs RTKs à la fois, qui pourraient ainsi pallier aux problèmes de perte d'efficacité des inhibiteurs actuels de RTKs en lien avec les phénomènes de redondance/compensation des voies de signalisation (157,158). Un troisième niveau d'analyse de l'interactome obtenu s'appuie sur la détermination d'un certain nombre de corrélations comme celle entre le ratio BRET et la présence de motifs d'interaction connus ([G, A, S]xxx[G, A, S], *leucine/glycine zipper*), la corrélation entre le ratio BRET et la valeur de BSA et la corrélation entre le ratio BRET et la similarité des séquences. Finalement, en s'appuyant sur ces analyses et sur l'utilisation d'outils d'apprentissage automatique (*machine learning*), un travail de décryptage du code des interactions au sein de cette famille est démarré dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de Chémogénomique et Chimie Médicinale du Dr. Rognan. Les analyses non supervisées menées permettront de comprendre quelles sont les séquences et les acides aminés régulant les interactions en intégrant les motifs connus et en identifiant de nouvelles interfaces. De plus, ces outils informatiques permettront de prédire des séquences peptidiques synthétiques, interagissant avec n'importe quelle cible choisie. La génération de ce type de peptides ouvre la voie à la création d'une librairie virtuelle de nouveaux composés avec une potentielle activité thérapeutique.

Pour conclure, dans le cadre de ce projet, nous avons conçu et validé un protocole de BRET automatisé et reproductible, permettant de mesurer les interactions spécifiques entre n'importe quelles protéines. Nous avons effectué un criblage pour les interactions de l'ensemble des séquences

TM des 58 RTKs humains et de six récepteurs à dépendance. L'interactome complet de ces interactions est disponible et permet d'ouvrir la voie pour la conception de composés spécifiques de plusieurs cibles.

Figure 26 : Test de BRET et problèmes d'orientation.



(A) Le test BRET fait intervenir deux rapporteurs qui, lorsqu'ils sont à proximité, permettent un transfert d'énergie de résonance du donneur (Rluc) (lui-même excité par l'ajout du substrat, la coelenterazine H), vers l'accepteur (eYFP) qui va émettre un signal quantifiable. Les rapporteurs sont couplés à des protéines pour lesquelles une interaction est étudiée.

(B) Lorsque l'orientation des deux rapporteurs est mauvaise, le transfert d'énergie est moins efficace, induisant un signal plus faible voire absent, alors que les protéines auxquelles les rapporteurs sont liés interagissent.

(Figure réalisée sur Biorender.com.)

Discussion

Le domaine transmembranaire a de plus en plus attiré l'attention ces dernières années, en passant d'une simple fonction d'ancrage à un véritable rôle-clef dans la machinerie cellulaire aux yeux des chercheurs. Il est non seulement impliqué dans l'oligomérisation des sous-unités des récepteurs ou des co-récepteurs entre eux, mais également dans la transduction du signal reçu par le récepteur. Par conséquent, le domaine TM peut être à l'origine de nombreuses pathologies notamment lorsque des mutations surviennent dans sa séquence. Mais il constitue également une cible thérapeutique avec des applications nombreuses et variées.

Dans le cadre de ce projet, l'intérêt s'est porté sur deux plateformes de récepteurs membranaires pour lesquelles les implications du domaine TM ne sont pas encore décrites. La première est la plateforme du récepteur NgR, qui fait intervenir quatre co-récepteurs (AMIGO3, LINGO1, p75^{NTR} et TROY) formant des complexes avec NgR, dans le but de réguler le développement cérébral. La deuxième est la plateforme du récepteur de l'interleukine anti-inflammatoire IL-10, constituée de deux sous-unités formant un hétéro-tétramère. Finalement, les résultats obtenus démontrent une implication plus ou moins importante du domaine TM dans l'activation de ces plateformes, ce qui nous a encouragés à vouloir étendre nos connaissances sur l'importance de ce domaine dans l'activation du plus grand nombre de récepteurs membranaires. Ainsi, nous avons élaboré une stratégie d'étude systématique des interactions entre domaines TM, en particulier pour les récepteurs à activité tyrosine kinase.

I. Approches méthodologiques communes

Pour l'ensemble des projets présentés dans cette thèse, un flux de travail similaire a été utilisé. Pour l'étude des récepteurs AMIGO3 et IL-10R, la première étape de modélisation *in silico* a été suivie d'une étape de validation biologique par BRET. Cette dernière a été utilisée à grande échelle pour le projet de systématisation des interactions entre domaines TM des RTKs.

1) La modélisation *in silico* des interactions TM

Pour l'étude d'une plateforme de récepteurs, la première étape consiste à analyser les interactions entre les domaines TM des sous-unités du récepteur et des co-récepteurs en utilisant des logiciels de simulation *in silico*. Le premier logiciel que nous utilisons est PREDDIMER, permettant de prédire les structures tridimensionnelles et les interactions entre les hélices α . Le logiciel calcule un score (F_{SCOR}) permettant de prédire si l'interaction est plus ou moins probable. Les travaux d'analyse d'une centaine de segments TM du laboratoire nous ont permis de définir de manière empirique un F_{SCOR} de 2,6 comme étant un seuil au-delà duquel toutes les simulations évaluées se sont traduites à ce jour par l'existence d'interactions biologiques démontrées au moins *in vitro*. Pour le projet AMIGO3, l'ensemble des interactions entre les TM des récepteurs AMIGO3, LINGO1, p75NTR et TROY donnent des scores supérieurs à 2,6, indiquant des interactions probables. Celles-ci ont ensuite pu être confirmées par BRET, indiquant une bonne transposition biologique des résultats *in silico*. Cependant, pour le projet IL-10R, les résultats sont plus incertains. En effet, malgré des F_{SCOR} inférieurs ou égaux à 2,6, des interactions ont pu être mesurées par BRET (en particulier pour l'homodimère IL-10R β , indiqué avec un F_{SCOR} de 2,2 pour un BRET_{max} de 156mBu). Résumer l'existence d'une interaction au simple calcul du F_{SCOR} paraît donc compromis. Certaines limitations techniques de PREDDIMER peuvent induire des erreurs et expliquer en partie les divergences. En effet, lorsque le logiciel prédit des hélices α , il l'effectue dans le vide, sans tenir compte des paramètres membranaires et de l'environnement lipidique. Les lipides présents dans la membrane interagissent avec les segments TM et peuvent fortement impacter les interactions entre segments TM (59). La présence de cholestérol impacte également les interactions, dans la mesure où sa concentration influe sur l'épaisseur de la membrane (97). De plus, PREDDIMER génère des hélices parfaites, alors que dans certains cas elles peuvent avoir des courbures, notamment à cause de la présence de certains acides aminés, comme la proline (159). En conséquence, des collisions entre atomes et hélices sont observées dans certains modèles, avec des distorsions et des configurations sans valeur biologique (87). Une solution pour palier à ces problèmes serait de corriger les résultats par des méthodes supervisées ou de tester d'autres logiciels de prédiction des interactions et de comparer avec les résultats obtenus par PREDDIMER.

La nature des motifs d'interactions TM est également un élément crucial pour le contrôle des interactions entre domaines TM. Un second logiciel que nous utilisons en routine est le logiciel

PDBePISA qui permet, à partir des modèles générés par PREDDIMER, de calculer l'enfouissement des acides aminés et de prédire les interactions hydrogène entre les deux séquences (92). De cette manière, nous avons la possibilité de déterminer les acides aminés impliqués dans l'interaction. Pour le projet AMIGO₃, nous avons constaté la présence d'un motif classique de type GxxxG, bien connu comme facilitant l'interaction entre deux séquences (68,69). De manière intéressante, le motif d'interaction d'AMIGO₃ présente des variations en fonction des segments TM en interaction. Le motif d'homodimérisation fait intervenir la cystéine 391 et les glycines 390 et 394. Ce même motif est retrouvé pour l'hétéro-interaction avec le segment TM de TROY. Pour l'hétéro-interaction avec le segment TM de p75^{NTR}, la cystéine 391 n'est cependant pas impliquée et est remplacée par la thréonine 387. Enfin, l'hétéro-interaction avec le segment TM de LINGO₁ fait intervenir les glycines, la thréonine 387 et une valine en position 398. Ces différences permettent de spéculer sur une certaine spécificité de ces motifs d'interaction. Ainsi au-delà de l'existence de motifs structuraux de type GxxxG favorisant le rapprochement des hélices c'est l'ensemble des acides aminés du TM qui définit la nature des interactions. D'ailleurs, dans le cas de l'IL-10R nous n'avons pas identifié de motifs canoniques alors que l'analyse en BRET montre l'existence d'interactions TM spécifiques. Ceci implique que des motifs alternatifs existent dans le TM et qu'ils peuvent engendrer des interactions spécifiques avec une conséquence biologique. Le travail d'analyse mené actuellement sur le criblage effectué par BRET sur les interactions des segments TM des RTKs devrait permettre d'identifier ces interfaces d'interactions et contribuer à la hiérarchisation des interactions entre domaines TM.

2) La validation biologique par BRET

Les résultats de modélisation prédits doivent être validés biologiquement. Dans cette optique, nous avons mis en place une véritable plateforme de criblage par BRET. Pour cela, nous avons conçu, validé et vérifié un protocole automatisé. L'automatisation permet non seulement un gain de temps et de main d'œuvre, mais elle permet également d'augmenter au maximum la reproductibilité. Les résultats montrent ainsi moins de 15% de variation entre deux mesures d'une même interaction. Pour encore mieux contrôler la reproductibilité des expériences, nous avons déposé sur chaque plaque les mêmes contrôles positifs et négatifs de manipulation. Cette approche a permis d'apprécier la variabilité entre les plaques, qui reste toujours inférieure à 15% pour les contrôles

positifs. Finalement, chaque étape automatisée du protocole a été validée en comparant les résultats avec des manipulations contrôles faites à la main. Au-delà de l'aspect purement technique, le choix de la méthode repose sur plusieurs arguments. Le premier est la possibilité de réaliser le criblage dans un système humanisé (cellules humaines HEK293), contrairement aux méthodes ToxCAT ou BACTH réalisées dans des bactéries. De cette manière, le test se rapproche autant que possible de la réalité biologique, notamment concernant la composition lipidique des membranes, profondément différente dans les bactéries (6). Un autre argument concerne la méthode de détection BRET, permettant de limiter le photoblanchiment et l'autofluorescence observés dans des tests de FRET. En effet, dans la mesure où le BRET ne nécessite pas d'excitation extrinsèque par une source de lumière, ces deux phénomènes sont limités (160,161). Pour la même raison, le bruit de fond est nettement inférieur au FRET (ratio signal/bruit dix fois supérieur), et permet d'augmenter la sensibilité. Le BRET est également deux à trois fois plus sensible que les méthodes de luciférase fractionnée (161). Le BRET permet également de vérifier la spécificité d'une interaction, par deux méthodes, la compétition et la saturation. Pour la première, une diminution de signal est observée après l'ajout d'un interacteur non marqué. Pour la seconde, la concentration du premier rapporteur est stable, tandis que celle du second est augmentée. Lorsque la courbe obtenue est de forme hyperbolique, le signal peut être considéré comme spécifique. Si la courbe obtenue est une droite, alors le signal correspond à un signal non spécifique de BRET dit de collision, résultant des interactions passives au sein d'une membrane saturée en protéines marquées. Finalement, la méthode a déjà pu faire ses preuves dans d'autres projets, notamment dans l'équipe de S. Morisset-Lopez, qui a travaillé sur les interactions de LINGO1 (149).

Comme toute méthode, le BRET présente également certains inconvénients. Le premier est lié à la transfection, car comme il s'agit d'une double transfection, si l'un ou l'autre des rapporteurs est moins bien transfecté et/ou exprimé que l'autre, une modification du signal peut être observée. Pour pallier ce problème, nous avons testé les meilleures concentrations de plasmide Rluc et eYFP pour obtenir un résultat reproductible. Il est aussi très important de transfecter toujours le même nombre de cellules, en réduisant au maximum leur nombre. Pour vérifier le taux de transfection en plasmide eYFP, nous avons effectué une mesure de fluorescence après excitation à la longueur d'onde adéquate. Un autre paramètre pouvant influencer le signal est la présence de substances fluorescentes ou colorées, raison pour laquelle nous avons supprimé le rouge phénol. Dans notre

cas, un problème qui peut apparaître et diminuer le signal est l'expression endogène par les cellules des récepteurs testés. Par un phénomène de compétition, une diminution du signal peut être observée. Il faudrait pour cela mesurer l'expression de cette protéine au niveau transcriptomique (par RTqPCR par exemple) ou au niveau protéique (par *Western-blot* par exemple). Un autre paramètre pouvant fausser le signal est l'absence de ligand, pour la mesure des interactions pour les protéines entières. En effet, certains récepteurs, notamment les RTKs, dimérisent surtout après fixation du ligand (142). Dans ce cas il risque donc aussi d'y avoir une sous-estimation des signaux. Il serait donc intéressant de mesurer les signaux en présence des ligands, c'est-à-dire les MAIs pour les interactions comprenant AMIGO3 et l'interleukine-10 pour l'IL-10R. Nous avons en outre, effectué des expériences pour mesurer l'interaction entre la protéine entière et le segment TM. Pour le projet AMIGO3, ces expériences ont permis d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus pour les interactions des protéines entières, indiquant ainsi une implication du domaine TM dans cette interaction. Pour le récepteur de l'IL-10, des signaux ont également pu être obtenus pour les interactions des sous-unités entières avec leurs équivalents TM. Cependant, par rapport aux interactions protéine entière – protéine entière et TM – TM, les signaux sont beaucoup plus faibles (jusqu'à -77%) et avec une variabilité plus importante (jusqu'à 85%). Une explication de ce problème réside dans la différence de taille entre les deux protéines, augmentant ainsi la distance entre les deux rapporteurs. Dans tous les cas, le test de BRET nécessite une distance minimale de l'ordre de 10 nm entre les deux protéines. Un éloignement plus important provenant d'une différence de taille des protéines peut influencer la mesure du signal. En revanche, il ne faut pas exclure l'existence de faux positifs dus à une proximité trop importante sans véritable interaction. Le test de BRET doit donc être vu comme un test de première intention rapide et sensible qui doit ensuite s'enrichir d'approches complémentaires comme des essais de co-immunoprécipitation qui peuvent venir renforcer la démonstration des interactions identifiées.

II. La plateforme du récepteur impliquant AMIGO3 : inhiber une inhibition ?

AMIGO3 est un récepteur peu décrit, faisant partie de la plateforme du récepteur NgR et des inhibiteurs associés à la myéline, au même titre que LINGO1, p75NTR et TROY (127). Il est impliqué dans l'inhibition du développement axonal et de la myélinisation (126). La plateforme de récepteurs a été ciblée récemment par un anticorps dirigé contre LINGO1 (opicinumab) dans le cadre de la prise en charge de la sclérose en plaques. Cependant, les essais cliniques ne montraient pas d'amélioration de l'état clinique des sujets (128). L'objectif était pourtant d'inhiber l'activation de la voie de signalisation RhoA, dans le but de favoriser la migration et la différenciation des oligodendrocytes pour permettre la remyélinisation et encourager la régénération axonale (162). Une explication de l'échec de cet anticorps est la redondance d'activation de la voie de signalisation, dans la mesure où AMIGO3 peut remplacer LINGO1 et compenser sa fonction (162). De plus, l'expression d'AMIGO3 est plus précoce que celle de LINGO1 dans un modèle de lésions du système nerveux central (127). Cibler AMIGO3 semble donc être une stratégie prometteuse avec un inhibiteur d'AMIGO3 seul ou en association avec l'anticorps anti-LINGO1 pour contrecarrer les mécanismes de résistance dans la SEP. Ceci constituerait ainsi un nouveau type de traitement pour cette pathologie incurable. En effet, tous les traitements actuellement disponibles ne ciblent que la composante immunitaire pour limiter les atteintes lors des poussées. Aucun traitement ne permet de rétablir des systèmes de réparation efficaces et les patients accumulent des handicaps au fil des années (163).

1) L'implication du domaine TM d'AMIGO3

Dans un premier temps, nous avons déterminé si le domaine TM d'AMIGO3 est effectivement impliqué dans l'oligomérisation et l'activation de cette plateforme de récepteurs. Dans cette optique, nous avons utilisé les outils de simulation (PREDDIMER et PDBePISA) et les outils biologiques de validation (BRET). Les résultats obtenus montrent l'intérêt de l'approche avec une bonne corrélation entre les données de simulation et la réalité biologique. La spécificité a été confirmée en mesurant l'interaction du récepteur AMIGO3 avec des segments TM de récepteurs non reliés (PDGFR α et GABA $_B$) ou des segments TM d'AMIGO3 mutés. Il serait intéressant de répéter cette expérience en ajoutant un ligand du récepteur, pour observer la dynamique en présence de celui-ci.

Il faudrait également pouvoir vérifier l'interaction d'AMIGO₃ avec NgR. Ce dernier ne possédant pas de domaine intracellulaire, d'autres méthodes devront être utilisées, comme le marquage de proximité en couplant AMIGO₃ à l'enzyme de marquage. Pour valider les interactions d'AMIGO₃, des expériences de co-immunoprécipitation devront également être réalisées. Les travaux menés ont cependant permis d'identifier les acides aminés impliqués dans l'interaction avec en particulier l'existence d'un motif GxxxG dans le domaine TM d'AMIGO₃. Ce type de motif a été décrit précédemment comme induisant la dimérisation de séquences TM (6,119). Pour concevoir les mutants, nous nous sommes focalisés sur les acides aminés de ce motif, en mutant la cystéine en position 391 et les deux glycines en 390 et 394. Ces mutations ont effectivement permis d'obtenir des séquences perdant leur capacité d'interaction. Il serait intéressant de déterminer la séquence minimale requise pour garder une interaction, notamment dans des perspectives de conception de peptides brevetables.

2) AMIGO₃, une cible thérapeutique ?

Après avoir démontré l'implication du domaine TM dans l'activation de la voie de signalisation sous-jacente, nous avons voulu évaluer l'effet d'une inhibition passant par ce domaine. Pour cela, nous avons conçu un peptide mimant la séquence TM d'AMIGO₃ pour inhiber l'oligomérisation du récepteur, à l'image des peptides du laboratoire ciblant NRP1 et plexine-A1 (116,122). En BRET, l'ajout de MTP-AMIGO₃ réduit la formation des dimères d'AMIGO₃ avec lui-même et les autres récepteurs de la plateforme. Cet effet est également observé par *proximity ligation assay*. Afin de vérifier si ces interactions se traduisent par des effets fonctionnels, nous avons évalué l'effet du peptide sur la migration de précurseurs d'oligodendrocytes (OPC) en présence du ligand Nogo-A. Pour cela nous avons utilisé un système xCELLigence permettant de suivre en temps réel et de manière automatisée la migration de ces cellules. Les résultats sont encourageants puisque, en présence d'une faible quantité de peptide (10^{-7} M), la migration est rétablie. Dans un modèle *ex vivo* de tranches organotypiques exposées à la substance démyélinisante L- α -lysophosphatidylcholine (LPC), le peptide permet de protéger les oligodendrocytes de l'apoptose, quel que soit leur état de différenciation. Il serait intéressant de vérifier si le peptide impacte directement la formation de la myéline en utilisant par exemple des nanofibres de polystyrène recouvertes de substances attractrices (comme le PDGF), sur lesquelles des oligodendrocytes peuvent construire une gaine de

myéline (164). En ajoutant des inhibiteurs de myéline et le peptide MTP-AMIGO₃ il serait alors possible de déterminer précisément le mode d'action du peptide dont nous considérons aujourd'hui l'effet bénéfique à travers une potentielle augmentation du contenu en myéline chez les animaux traités. Il faut envisager la possibilité d'un effet indirect par une modulation de l'activité microgliale. En effet, ces cellules sont fortement impliquées dans la physiopathologie de la SEP. Dans les lésions, elles sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et sont responsables d'un stress oxydatif induisant notamment la mort des oligodendrocytes matures (165,166). Cependant, elles sont également responsables de la phagocytose des débris de myéline, facilitant la migration et la différenciation des oligodendrocytes, essentielles pour la remyélinisation (165,166). Ces différences résultent des différentes polarisations que peut adopter la microglie (167). De manière intéressante, il a été démontré que les cellules microgliales expriment le récepteur AMIGO₃ sans que sa fonction précise ne soit connue dans ce cas (162). En modulant son activation, le peptide MTP-AMIGO₃ pourrait influencer les fonctions inflammatoires des cellules microgliales. Il serait donc intéressant de tester le peptide à la fois sur des lignées cellulaires de microglie (BV-2 par exemple) et des cellules primaires pour déterminer son activité sur ces cellules.

Les résultats *in vitro* nous ont encouragés à tester l'effet du peptide MTP-AMIGO₃ *in vivo*. De nombreux modèles animaux de SEP existent pour mimer cette pathologie et ses différentes formes. Ils permettent d'étudier à la fois les mécanismes physiopathologiques de la SEP mais également de mettre au point de nouveaux composés thérapeutiques. Ils comprennent des modèles de démyélinisation toxique reposant sur l'utilisation de substances induisant la mort des oligodendrocytes (bromure d'éthidium, cuprizone, LPC) et qui permettent d'étudier la SEP sans l'implication du système immunitaire. Il existe aussi des modèles viraux en infectant les animaux avec des virus responsables d'encéphalomyélites démyélinisantes et des modèles spontanés transgéniques, permettant d'induire la pathologie sans injecter de composant cérébral. Finalement les modèles les plus utilisés sont les modèles d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) (168). Ces derniers sont à l'origine de certains médicaments disponibles sur le marché, à l'image du natalizumab, de l'acétate de glatiramère et du fingolimod (168,169). L'EAE est obtenue en inoculant à des animaux un antigène de la myéline, le plus souvent la protéolipide protéine de la myéline (PLP) ou la glycoprotéine de la myéline et des oligodendrocytes (MOG), associé à l'adjuvant complet de Freund (CFA) (169). Dans notre cas, nous avons opté pour l'antigène PLP, permettant

d'induire une pathologie comparable à la forme majoritaire de la SEP, la forme récurrente-rémittente. Nous avons traité les animaux de manière préventive, dès le deuxième jour post-immunisation, avant l'apparition de symptômes. Les animaux traités avec 50µg/kg de peptide MTP-AMIGO₃, présentaient une pathologie moins grave, avec des scores cliniques moins élevés que les animaux contrôles. Pour investiguer le fait que ces effets ne sont pas médiés par une réponse anti-inflammatoire et bien par un effet en faveur de la remyélinisation, nous avons évalué le statut inflammatoire des animaux. Nous avons prélevé le sang au pic des symptômes et quantifié la sécrétion de l'interleukine-6. Cette cytokine fait partie des marqueurs distinctifs de l'inflammation dans la SEP (170). L'absence de modification de son taux sanguin dans les animaux, nous permet d'écarter un effet anti-inflammatoire du peptide. Des analyses complémentaires des marqueurs de l'inflammation, notamment par profilage cytokinique devront être réalisées lors de la prochaine expérience, afin d'éliminer avec plus de certitude un effet sur l'inflammation. Pour vérifier l'effet du peptide sur l'état de myélinisation des axones des animaux, des colorations, notamment au bleu luxol rapide, devront être réalisées sur des coupes de cerveau et de moelle épinière. Une autre possibilité d'évaluer l'état de la myéline est de réaliser des photographies en microscopie électronique afin de pouvoir calculer le g-ratio. Ce ratio est obtenu en divisant le diamètre interne d'un axone par son diamètre externe. Une valeur optimale théorique se situe à 0,6 dans le cerveau, alors qu'une démyélinisation induit une augmentation de cette valeur (171). De manière intéressante, une remyélinisation peut être observée grâce à ce ratio car la « nouvelle » myéline est généralement moins épaisse, induisant une augmentation du g-ratio (172). Les résultats prometteurs obtenus dans cet essai *in vivo* doivent cependant être répétés. D'une part dans un modèle différent, comme le modèle EAE MOG, mimant pour sa part la phase progressive de la SEP. Dans ce cas, l'absence de période de rémission permet de mieux évaluer l'effet du peptide à long terme. D'autre part, le peptide doit être testé en association avec des traitements existants, comme le fingolimod ou avec l'anticorps ciblant LINGO₁, afin d'observer une éventuelle synergie des traitements permettant d'améliorer l'efficacité. Même si des effets ont été observés ici et même si le modèle EAE a déjà permis le transfert de composés des animaux vers l'Homme, le modèle reste limité avec de nombreuses différences avec la pathologie humaine. En effet, le mode d'induction de la pathologie est très différent. Dans l'EAE, les animaux sont immunisés par un antigène connu, alors que dans la SEP l'élément déclencheur n'est pas connu. De telles différences peuvent fondamentalement

changer la réponse immunitaire de l'organisme (169,173). Concernant les lésions, elles présentent aussi des différences entre les deux pathologies. Dans l'EAE, les lésions sont majoritairement localisées dans la moelle épinière, contrairement à la SEP où le cerveau est plus touché. De plus, l'EAE active préférentiellement les lymphocytes T CD4⁺, alors que dans la SEP une activation globale des lymphocytes T CD4⁺, T CD8⁺ et B est observée (169,173). Un dernier point à éclaircir est le mode de traitement. Dans notre cas, le traitement est administré de manière préventive avant l'apparition d'une poussée. Il faudrait évaluer l'effet du peptide en curatif, en l'administrant lors de la poussée.

Les expériences menées avec le peptide AMIGO₃ ont permis de démontrer l'implication du domaine TM dans l'oligomérisation du récepteur. De plus, ce domaine s'est révélé comme une cible thérapeutique dans la SEP. En effet, MTP-AMIGO₃ est capable d'inhiber l'activation de la signalisation, permettant en conséquence un rétablissement de la migration et de la différenciation des oligodendrocytes à l'origine d'une remyélinisation. Finalement, en testant le peptide sur des souris, une amélioration de leur score clinique a été obtenue, sans observer néanmoins de suppression complète de la maladie. L'apparition des symptômes est dans ce cas, due à l'activation du système immunitaire. En associant MTP-AMIGO₃ avec un traitement ciblant la composante inflammatoire, un effet additif pourrait être observé sur le score clinique. Les traitements disponibles actuellement sont cependant associés à des effets secondaires. Dans ce contexte, concevoir un MTP anti-inflammatoire apparaît comme une opportunité. En effet, les travaux du laboratoire ont démontré que des peptides de ce type ne s'accompagnent pas d'effets indésirables (117,120). Nous nous sommes donc intéressés à une plateforme de récepteur impliquée dans l'inflammation de la SEP. Notre attention s'est portée sur le récepteur de l'interleukine-10 dans le but de le réactiver en ciblant son domaine TM (174,175).

III. Le récepteur de l'interleukine-10, un ciblage difficile

1) L'implication du domaine transmembranaire dans l'oligomérisation du récepteur

L'organisation des domaines extracellulaires des sous-unités du récepteur de l'IL-10 est bien décrite et a pu être observée par cryomicroscopie électronique (131). Concernant le domaine TM cependant, la question reste ouverte et son implication dans l'oligomérisation des sous-unités n'a pas encore été décrite. Cette analyse revêt une importance particulière en raison de l'absence de motif canonique de dimérisation dans les séquences TM des deux sous-unités. En utilisant le schéma classique de modélisation *in silico* suivie d'une validation par BRET, nous avons éclairé ce point. La modélisation prédit des interactions entre les domaines TM du récepteur, mais avec des scores faibles, égaux ou inférieurs à notre seuil de 2,6. Les résultats indiquent également, que TM-IL-10R α peut former des homodimères et des hétérodimères en utilisant une interface similaire à 60%. TM-IL-10R β au contraire, posséderait deux interfaces. D'après ces résultats, TM-IL-10R α ne pourrait interagir qu'avec un interacteur à la fois, alors que TM-IL-10R β pourrait former deux interactions à la fois. Ces résultats sont en accord avec les interactions des domaines extracellulaires : IL-10R α forme exclusivement des dimères avec IL-10R β , alors que ce dernier peut aussi former des dimères avec d'autres sous-unités (IL-20R α , IL-22R et IL-28R) (130). Pour vérifier ces résultats, nous avons effectué des expériences de BRET dans lesquels la protéine entière IL-10R α forme préférentiellement et spécifiquement des hétérodimères avec la protéine entière IL-10R β , ce qui correspond à nouveau aux résultats de Cryo-EM. IL-10R β cependant, ne semble pas interagir avec IL-10R α , probablement à cause d'une mauvaise orientation des rapporteurs BRET ou un encombrement stérique empêchant le rapprochement entre les deux sous-unités. Enfin, IL-10R β interagit fortement et spécifiquement avec lui-même, ce qui pourrait correspondre à une réalité biologique dans la mesure où un homodimère IL-10R β a été indiqué comme possédant des activités biologiques médiées par l'IL-22 (176). Dans un deuxième temps, nous avons évalué les interactions des domaines TM entre eux et avons pu constater que l'ensemble des segments TM interagissent entre eux de manière spécifique et avec des valeurs similaires. Finalement, pour vérifier si le domaine TM est impliqué dans l'interaction des sous-unités entre elles, nous avons mesuré l'interaction d'une protéine entière avec

le seul segment TM. D'après ces résultats, les segments TM interagissent bien avec les sous-unités entières, avec la sous-unité IL-10R α formant à nouveau préférentiellement des hétérodimères et la sous-unité IL-10R β des homodimères. Cependant, les résultats obtenus pour cette dernière expérience sont 70% plus faibles que pour les interactions entre protéines entières. Cette différence peut s'expliquer par la différence de taille entre les deux protéines, entraînant un éloignement des rapporteurs de BRET. Dans un second temps, nous avons identifié les acides aminés impliqués dans les interactions, grâce au logiciel PDBePISA. De manière intéressante, aucun motif classique de dimérisation ([G, A ou S xxx G, A ou S], *leucine zipper*, *glycine zipper*) n'a été identifié. Les acides aminés identifiés comme essentiels dans la séquence TM d'IL-10R α pour ses interactions comprennent notamment L₂₄₈, G₂₅₁, et L₂₅₈. Pour la séquence TM d'IL-10R β , seule la sérine en position 230 est commune pour les deux interfaces d'interaction. Pour vérifier l'implication des acides aminés identifiés au niveau biologique, nous avons généré des séquences comprenant une à trois mutations et mesuré leurs interactions en BRET. Une seule mutation (L248G) sur le segment TM d'IL-10R α s'est accompagnée d'une perte significative d'intensité de signal BRET de 25%. Il faudrait mener une étude complémentaire avec des mutations systématiques (simple, double ou triple) sur l'intégralité de la séquence TM pour identifier avec précision les acides aminés définissant l'ensemble de l'interface d'interaction. Il serait aussi intéressant de tester l'interaction entre protéines entières ayant des domaines TM mutés ou en les remplaçant par celui d'une autre protéine, non reliée. Finalement, une dernière explication sur la complexité à identifier un motif d'interaction peut être fournie par les travaux de l'équipe d'Eisenhaber et collaborateurs, qui a développé un logiciel (*TransMembrane helix: Simple Or Complex*, TMSOC) permettant de discriminer les séquences TM dites « simples » et « complexes ». Tandis que les premières ne semblent posséder que des rôles d'ancrage à la membrane et provenant d'une convergence évolutive, les TM complexes possèdent des rôles structuraux et fonctionnels plus marqués (177). Nous avons vérifié dans quelles catégories rentrent les séquences TM de l'IL-10R. Les séquences murines des deux sous-unités sur lesquelles nous avons travaillé rentrent dans la catégorie « simple », alors que les séquences humaines rentrent dans la catégorie « complexe ». Nous avons travaillé sur les séquences murines afin de pouvoir mieux tester les peptides *in vitro* et *in vivo*, mais au vu de ces informations, l'ensemble des expériences devra être répété sur les séquences humaines.

Pour résumer, les données de prédiction *in silico* et biologiques de BRET indiquent que le domaine TM des sous-unités du récepteur IL-10R est impliqué dans l'oligomérisation. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour mieux caractériser à la fois le mode d'implication et mieux identifier les motifs d'interaction. Des expériences de co-immunoprécipitation permettraient de renforcer les résultats. Pour étudier l'implication du segment TM dans l'activation du récepteur, nous avons conçu des peptides mimant les domaines TM des deux sous-unités. Ceux-ci devront être testés en BRET afin d'observer un effet sur l'interaction des sous-unités entières entre elles. En PLA cependant, nous avons pu observer une diminution des hétérodimères IL-10R α / IL-10R β , en présence du peptide reprenant la séquence de la sous-unité IL-10R β . Il sera important d'évaluer l'effet de ces peptides sur la formation des dimères en présence du ligand IL-10 et sur la formation d'homodimères.

2) Le récepteur de l'interleukine-10, des attentes et des échecs

Les peptides conçus et mimant les séquences des sous-unités du récepteur ont pour objectif de moduler l'activation du récepteur et de sa voie de signalisation sous-jacente. Ces peptides s'inscrivent dans une stratégie de ciblage de l'IL-10 décrite depuis de nombreuses années mais n'ayant abouti à aucun composé sur le marché. Au vu de la pléiotropie des effets liés à cette cytokine, elle est impliquée dans de nombreuses pathologies. Des dérégulations de l'expression d'IL-10 induisent des pathologies auto-immunes et inflammatoires sévères, comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI: maladie de Crohn, rectocolite ulcéro-hémorragique), l'asthme, le lupus érythémateux disséminé (LED), la sclérose en plaques (SEP), le psoriasis et la polyarthrite rhumatoïde (PR) (130,178–181). Cependant, en fonction de la pathologie, les niveaux d'IL-10 sont augmentés ou diminués chez les patients. Ainsi, dans le LED, une augmentation des taux d'IL-10 induite par des lymphocytes B aberrants est observée. Dans ce cas, ce sont des anticorps neutralisants qui ont été testés, notamment le BT063, jusqu'en étude clinique de phase II (NCT02554019) qui a montré une faible amélioration de la maladie, associée à des effets indésirables (130,182). Au contraire, des souris déficientes en IL-10 développent des affections semblables aux MICI, en particulier la maladie de Crohn. En supplémentant les animaux avec la cytokine, une amélioration des symptômes est observée. De la même manière, une cytokine recombinante humaine de l'IL-10 a été testée sur l'Homme dans des études cliniques de phase I et

II. Des résultats très décevants ont été obtenus, notamment à cause d'une augmentation importante de la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire interféron γ (IFN- γ), responsable d'une aggravation de la maladie (130,179,183). Des études récentes ont pu démontrer qu'il est possible de dissocier les activités de l'IL-10 car celles-ci sont liées à la lignée cellulaire (myéloïde ou lymphoïde) par laquelle l'interleukine agit (130,131). Ainsi, en utilisant des agonistes partiels ou en ciblant plus spécifiquement certaines cellules, de nouvelles opportunités s'ouvrent pour l'utilisation de l'IL-10 dans le traitement des maladies inflammatoires.

3) Induire l'activation du récepteur de l'interleukin-10 pour empêcher l'inflammation

Une pathologie avec un rôle prépondérant de la réponse inflammatoire est la SEP. Dans le modèle EAE, il a été démontré qu'une suppression de l'expression d'IL-10 augmente la sévérité du modèle. En supplémentant les animaux en IL-10, une inhibition de l'induction de l'EAE a pu être obtenue. Cependant, dans des essais où la maladie est déjà en place, aucun effet franc n'a pu être observé (132,175,178). Dans le cadre de notre projet, le peptide MTP-IL-10R α présentait des effets en faveur de l'activation du récepteur. En effet, nous avons pu démontrer une induction de la phosphorylation de STAT3 par le peptide en l'absence du ligand dans une lignée de cellules microgliales (BV-2). Nous n'avons cependant pas pu retrouver la conséquence de cette induction au niveau transcriptomique. Il serait intéressant de vérifier la dynamique temporelle d'expression des gènes concernés. Il serait également intéressant de vérifier les effets au niveau protéique du traitement par le peptide, notamment en effectuant des analyses par profilage cytokinique ou ELISA. En testant le peptide sur une lignée cellulaire de macrophages (RAW264.7), nous n'avons pas retrouvé les effets sur la phosphorylation. Cette différence peut résulter d'une différence d'expression du récepteur ou du ligand entre les deux lignées qui devra être vérifiée. Pour s'affranchir de ces limitations dues aux mutations inhérentes aux lignées cellulaires, il faudrait tester l'effet du peptide sur des cellules primaires de macrophages et de cellules microgliales.

Finalement, nous avons testé le peptide dans le modèle EAE-PLP mais n'avons pas pu observer d'effet thérapeutique. L'expérience a été réalisée dans les mêmes conditions de traitement préventif que pour les expériences menées avec la cytokine. Plusieurs raisons peuvent expliquer cet échec dans cette pathologie. La première est la forte sous-expression de la cible au cours du pic de

la maladie. Nous avons démontré que les taux d'expression des deux sous-unités sont diminués dans des cellules CD11b⁺ (un marqueur pan-monocytaire) isolées à partir de cerveaux d'animaux malades. Le peptide n'ayant pas accès à sa cible, ne peut donc pas exercer son rôle. Il serait alors intéressant de suivre l'expression des récepteurs dans des cellules et des animaux traités, pour déterminer si le peptide peut induire leurs expressions. Une autre possibilité serait d'augmenter la dose de peptide, peut-être trop faible. Une nouvelle expérience à 100µg/kg pourrait ainsi être menée. Si le peptide peut cependant exercer son action, d'autres raisons peuvent expliquer l'absence d'effet thérapeutique. L'IL-10 possède de nombreux rôles, dont une induction de la survie, de la prolifération et de la production d'anticorps par les lymphocytes B et de l'activation des lymphocytes T CD8⁺ (131,132,136). Pourtant, ces cellules sont associées à des effets néfastes dans le contexte de l'EAE et de la SEP (184). Comme mentionné précédemment, pour éviter ces activités, il faudrait développer des agonistes partiels du récepteur ou augmenter les propriétés de ciblage et activer ainsi le récepteur uniquement dans les macrophages et la microglie (131). Une autre raison d'absence d'effet réside dans le mécanisme d'action supposé. L'objectif est de modifier la polarisation des macrophages et de la microglie. Dans la SEP, ces cellules présentent majoritairement des marqueurs M₁, pro-inflammatoires et sont responsables des lésions (166,185–187). Le peptide permettrait de rééquilibrer la polarisation de ces cellules pour favoriser un état anti-inflammatoire, M₂-like. Cependant, jouer sur la polarisation s'avère être un exercice difficile du fait de la forte plasticité de ces cellules. De plus, il a été démontré que dans la réalité biologique d'un organisme, plusieurs états de polarisation peuvent coexister et donc inhiber d'éventuels effets positifs d'un traitement (137,188–190). De plus, dans la SEP, une importante infiltration de macrophages activés est décrite, qui peut masquer les effets du peptide, en particulier si celui-ci n'est actif que sur la microglie (169,187). Il faudrait donc cibler plusieurs voies de signalisations impliquées dans l'activation ou l'inhibition d'un type de polarisation. Il faudrait également tester l'effet du peptide dans le modèle d'une autre pathologie inflammatoire, comme les MICI. En effet, même si le peptide possède un effet sur cette signalisation, son implication dans l'EAE est peut-être insuffisante. D'autres raisons pour lesquelles le peptide n'est pas actif *in vivo*, concernent ses propriétés pharmacologiques. Le peptide devant agir au niveau du système nerveux central (SNC), la crainte est qu'il ne puisse pas traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cependant, des travaux du laboratoire sur des peptides similaires ciblant NRP1 et plexine-A1 ont démontrés qu'ils peuvent atteindre le cerveau et la moelle épinière

rapidement et de manière pérenne (jusqu'à sept jours post-injection) (116,122). De plus, dans les conditions inflammatoires de l'EAE, la BHE est fragilisée et poreuse (191). Des expériences de biodistribution doivent être effectuées pour ce peptide. Celles-ci pourraient également donner des informations sur l'adressage du peptide.

4) Inhiber l'activation du récepteur de l'interleukine-10 pour réactiver l'inflammation dans les tumeurs

En plus de son rôle dans les pathologies inflammatoires, l'IL-10 joue également un rôle prépondérant dans les tumeurs. La cytokine promeut le développement tumoral en inhibant la réponse inflammatoire et la présentation des antigènes (130). De même, des surexpressions d'IL-10 et des taux sériques élevés ont pu être détectées dans plusieurs types de tumeurs (mélanomes, lymphomes, cancers bronchiques et gastro-intestinaux) et sont associés à un mauvais pronostic (178,180). Certaines études ont permis de démontrer que bloquer l'IL-10 a des effets bénéfiques dans le cancer ou dans son traitement (192,193). Le peptide MTP-IL-10R β possède des effets faisant penser à une inhibition de la voie de signalisation IL-10. En effet, il induit une diminution de la formation des hétérodimères en PLA et inhibe la phosphorylation de STAT3 en présence d'IL-10. A nouveau, nous n'avons pas pu démontrer de manière franche une traduction de cette inhibition aux niveaux transcriptomiques et protéomiques. De plus, à l'image du peptide MTP-IL10R α , les effets sur la phosphorylation de STAT3 n'ont pu être observés que sur la lignée microgliale. Ce peptide aussi, mérite des expériences sur des lignées primaires.

Nous avons ensuite testé le peptide dans un modèle de greffe orthotopique de cellules murines de glioblastome. Une augmentation de la survie moyenne de quatre jours a pu être observée, sans atteindre le seuil statistique ($p=0.0561$). Le paramètre RECIST, permettant d'évaluer la réponse d'un sujet à un traitement anticancéreux, a permis de démontrer une réponse partielle pour la moitié des animaux, allant jusqu'à -93%. L'autre moitié des animaux ont vu leur pathologie s'aggraver, avec des RECIST allant jusque +169%. Pour ce peptide également, nous avons fait l'hypothèse que le mécanisme pourrait passer par un rééquilibrage de la polarisation des macrophages. En effet dans le glioblastome, les macrophages associés aux tumeurs adoptent des phénotypes facilitant le développement tumoral, se rapprochant d'une polarisation M2 (194). De même, il a été démontré que ces macrophages M2 sécrètent de l'IL-10, qui promeut la tumorigenèse dans le glioblastome

(195). Pour expliquer la très forte variabilité inter-individuelle observée, il faudrait effectuer des immunomarquages de coupes de cerveaux et comparer les infiltrats immunitaires et la vascularisation des tumeurs des animaux répondeurs et non-répondeurs. Dans le groupe des animaux non-répondeurs, le microenvironnement tumoral permet peut-être de dépasser les effets du peptide. En outre, ces tumeurs en particulier présentent une vascularisation plus importante, ce qui augmente leur agressivité. En inhibant l'activation du récepteur par le ciblage de la sous-unité IL-10R β , certaines conséquences peuvent expliquer la faiblesse ou l'absence de l'effet observé. En effet, cette sous-unité est reconnue par la sous-unité IL28R, pour former le récepteur des interférons de type III ou interférons λ (IL28A, IL28B et IL29) (130). Or ces interleukines possèdent d'importants effets anti-tumoraux, qui risquent d'être bloqués par l'ajout du peptide MTP-IL10R β (196). Au contraire, le peptide peut aussi stimuler cette voie de signalisation par des changements conformationnels. Il faudra donc déterminer l'effet du peptide sur ce récepteur par co-immunoprécipitation et PLA, ainsi que sur la voie de signalisation sous-jacente (phosphorylation de STAT1 et STAT2 par exemple). Nous avons présenté dans la partie précédente les effets activateurs de l'IL-10 sur les lymphocytes B et T CD8⁺ cytotoxiques. L'administration d'IL-10 à très haute dose sous forme PEGylée (pegilodecakin) a permis d'obtenir des réponses partielles chez quelques patients atteints de carcinomes rénaux (197). Dans ce cas, une inhibition de la signalisation s'avère donc contre-productive et remet en lumière la nécessité d'améliorer le ciblage. Des expériences *in vivo* supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre l'effet du peptide, notamment en augmentant la dose. Il serait intéressant également de le tester en association avec le bevacizumab (anticorps anti-VEGF) souvent administré aux patients atteints de glioblastome (hors autorisation de mise sur le marché). Une synergie pourrait être observée, dans la mesure où les macrophages associés aux tumeurs produisent de grandes quantités de ce facteur de croissance vasculaire (195).

IV. La systématisation de l'étude de l'implication du domaine transmembranaire sur l'interaction des récepteurs membranaires

Les preuves s'accumulant et étant de plus en plus évidentes de l'implication du domaine TM dans l'activité des récepteurs et l'existence de motifs d'interaction non connus, appuient l'intérêt d'une approche permettant d'avoir une vision globale de cette implication. Dans cette optique, nous avons mis en place une procédure de systématisation de ces informations grâce à une approche de mesure des interactions des segments TM par BRET. Pour débiter la tâche, l'attention s'est portée sur les 58 RTKs. Cette famille de récepteurs est bien décrite concernant la dimérisation de ses récepteurs, essentielle à leur activité (198,155). Malgré les nombreuses connaissances et les nombreux médicaments sur le marché ciblant cette famille, des connaissances systématiques quant à l'implication des domaines TM dans leur dimérisation ne sont pas disponibles. Seuls quelques récepteurs ont pu bénéficier d'une étude de l'implication de leur domaine TM dans leur dimérisation et activation (147,154,155). Conjointement, six récepteurs à dépendance ont été ajoutés aux cibles du criblage. Ceux-ci ont été sélectionnés par des recherches bibliographiques sur leur potentiel thérapeutique (151–153). Les récepteurs à dépendance constituent une famille hétérogène de récepteurs qui ont un fonctionnement commun. En effet, la vingtaine de récepteurs faisant partie de cette famille (dont certains sont aussi des RTKs, voir **figure 21**) sont caractérisés par l'activation de deux types de cascades de signalisation. Le récepteur, lorsqu'il est lié à son ligand, s'oligomérisent et active une signalisation positive de prolifération, survie ou différenciation cellulaire. En absence de ligand il reste sous forme de monomère et induit une réponse pro-apoptotique. Ces récepteurs sont souvent décrits comme des suppresseurs de tumeurs et leur expression est diminuée dans les cancers (153). Les connaissances concernant l'implication du domaine TM dans l'oligomérisation activatrice de ces récepteurs restent limitées. En effectuant le criblage par BRET, nous sommes donc les premiers à produire des données de manière systématique sur les interactions des domaines TM des RTKs et des récepteurs à dépendance. Celles-ci ont été défiées quant à leur reproductibilité et spécificité et ont démontré la puissance du système BRET utilisé. Des principes de gestion de la qualité ISO9001 ont été appliqués pour obtenir les résultats du criblage. Malgré tout, certaines

limites déjà discutées précédemment existent, notamment le risque de transfection plus ou moins efficace d'un des deux rapporteurs. Un autre problème constaté est l'asymétrie des valeurs obtenues. En effet, pour chaque paire deux valeurs de BRET ratio sont obtenues or dans 90% des cas, la différence entre les deux valeurs n'est pas négligeable. Pour s'affranchir de ce problème, nous avons introduit un biais assumé, en ne sélectionnant que la valeur maximale des deux signaux. Les deux autres possibilités, auraient été de sélectionner la valeur minimale avec un risque de faux-négatifs ou la valeur moyenne, trop sensible aux valeurs extrêmes. En sélectionnant la valeur maximale la perte d'informations est limitée, mais le risque de faux-positifs est augmenté. Cependant, si une interaction est amenée à être étudiée plus en détails, des expériences supplémentaires de saturation par exemple, permettent d'éliminer ce problème. En 2009, l'équipe de D. Schneider a effectué un criblage de l'ensemble des homodimères des segments TM au sein de la famille des RTKs. Ils ont effectué ce criblage par un test ToxCAT et ont effectué une classification des paires en fonction de la probabilité d'interaction (148). De manière intéressante, leurs résultats sont similaires aux nôtres. En effet, ils ont déterminé que les deux plus forts homodimères sont ceux des récepteurs DDR2 et DDR1. Dans notre cas, nous observons les mêmes résultats (en BRET, DDR2 : 463mBu, DDR1 : 406mBu). Au contraire, la paire avec le plus faible signal est dans les deux cas FGFR1 (en BRET : 9mBu). Certaines différences peuvent toutefois être notées, comme TIE1, classé quatrième dans l'article et qui possède un des signaux BRET les plus faibles (13mBu). Les différences existantes peuvent s'expliquer par la différence de méthode, effectuée dans une membrane bactérienne dans un cas et humaine dans le nôtre. En effet, les membranes bactériennes ont des compositions en lipides très différentes des membranes de mammifères, or les interactions des protéines membranaires sont influencées par l'environnement lipidique (6).

Les perspectives de ce travail sont nombreuses, car il a permis de donner une image de l'interactome complet des TM des RTKs. De cette manière, de nouvelles cibles thérapeutiques peuvent être identifiées, à l'image de FGFR4, dont des mutations du domaine TM sont impliquées dans des risques cancéreux (199). De plus, le criblage ouvre la possibilité de concevoir des MTPs, ciblant plusieurs domaines TM à la fois. Cette stratégie pourrait cibler les phénomènes de compensation impliqués dans les résistances aux traitements anticancéreux, notamment les inhibiteurs des EGFRs (157,158). Finalement, une perspective plus ambitieuse est que l'ensemble de ces résultats, permettra d'identifier un véritable code d'interaction des domaines TM. Des analyses

de corrélations entre le BRET ratio et (1) la présence de motifs d'interaction connus ([G, A, S]xxx[G, A, S], *leucine/glycine zipper*), (2) les valeurs d'enfouissement des acides aminés dans les interactions (BSA) ainsi que (3) la similarité des séquences peuvent être effectuées. Grâce à ces analyses et des outils d'apprentissage automatique (*machine learning*), un véritable outil de compréhension des séquences et acides aminés impliqués dans les interactions TM pourrait être créé. L'outil permettra également d'identifier de nouveaux motifs d'interaction, expliquant le grand nombre de paires interagissant effectivement dans notre essai. Enfin, cet outil permettrait de générer des séquences synthétiques, interagissant avec n'importe quelle cible donnée. La prédiction de ce type de peptides ouvre la voie à la création d'une librairie virtuelle de nouveaux composés avec une potentielle activité thérapeutique.

V. Les membrane targeting peptides, un beau futur en perspective ?

Depuis de nombreuses années, le domaine TM des récepteurs membranaires attire l'attention pour la conception de composés le ciblant. Le laboratoire d'accueil a acquis une expertise concernant ce ciblage, par l'utilisation de peptides agissant au niveau de ce domaine. Plusieurs de ces MTPs ont démontré leur efficacité *in vitro* et *in vivo* (114,116,117,119,122). Les travaux menés au cours de cette thèse apportent des possibilités de conception de peptides supplémentaires contre des cibles et pour des applications différentes. De plus, la génération d'une librairie virtuelle de peptides pouvant cibler n'importe quel domaine TM ouvre la voie à la conception de nombreux MTPs. Les MTPs possèdent de nombreux avantages par rapport aux composés classiques. Le premier est la faible dose nécessaire pour obtenir un effet thérapeutique ($1\mu\text{g}/\text{kg}$, tous les trois jours) par rapport aux anticorps par exemple, pour lesquels des doses supérieures au mg/kg sont souvent nécessaires (117,119,122). En outre, les MTPs ne présentent qu'une faible toxicité, n'induisant aucune anomalie hématologique, métabolique et cognitive après plusieurs semaines de traitement (117,122). Concernant les peptides testés au cours de cette thèse, ils semblent également ne pas être toxiques. Une vérification devra cependant être effectuée, notamment par des prélèvements sanguins pour vérifier la numération formule sanguine, les facteurs de coagulation, des indicateurs physiologiques et d'inflammation. Les doses nécessaires pour MTP-AMIGO₃, MTP-IL-10R α et MTP-IL-10R β semblent cependant supérieures aux doses des autres peptides testés au sein du laboratoire. Ces différences peuvent résulter d'une efficacité moindre ou de problèmes de solubilité ou de ciblage. Ces deux derniers points constituent des axes d'amélioration des peptides TM.

La solubilisation constitue un des points les plus complexes concernant la chimie de ces peptides TM. En effet, celle-ci est souvent problématique, du fait de leur forte hydrophobie. Pour les deux projets présentés, les peptides ont d'abord été solubilisés en DMSO un solvant approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA) américaine. Cependant, le DMSO induit une inflammation à très faible dose, le rendant difficilement utilisable *in vivo*. Une autre solution, a été de les suspendre dans des micelles de LDS, mais ce détergent n'est pas approuvé par la FDA, rendant d'autres solutions nécessaires. Parmi celles-ci, nous avons développé des peptides basés sur la stratégie ATRAM présentée par Alves et collaborateurs (118). Ces peptides sont solubles dans l'eau et gardent

leur efficacité. Pour les deux projets, de tels peptides peuvent être conçus et pourront être testés et comparés avec les peptides originaux. Une seconde critique à l'égard des MTPs est l'absence de capacité de ciblage. Les études de biodistribution menées sur les peptides montrent une distribution généralisée dans tous les organes. Malgré une toxicité faible, le développement de stratégies pour limiter la distribution au tissu hébergeant la cible semble nécessaire. Une première stratégie consiste à utiliser des nanotransporteurs (*nanocarriers*). Dans ce sens, des travaux récents du laboratoire ont permis la génération de ce type de transporteurs à partir de la capsid du virus de la mosaïque du tabac (TMV). Le peptide MTP-NRP1 a ainsi pu y être greffé en conservant ses effets anti-angiogéniques (200). La fonctionnalisation du nanotransporteur avec un anticorps ou un peptide ciblant spécifiquement des tumeurs pourrait donc favoriser la concentration du peptide dans le tissu ciblé. D'autres outils peuvent être envisagés, comme des liposomes fonctionnalisés ou des ADC (*antibody drug conjugate*). Ces outils pourraient être intéressants pour les peptides IL-10R en ne ciblant que les macrophages par exemple, pour ainsi séparer les effets anti- et pro-inflammatoires de l'interleukine-10. L'ensemble de ces stratégies permet d'envisager un transfert des MTPs vers l'utilisation chez l'humain.

Conclusion

Le segment transmembranaire des récepteurs membranaires possède malgré sa petite taille, de nombreux rôles dans l'oligomérisation et l'activation des récepteurs. Depuis les premières études réalisées sur ce segment, les preuves s'accroissent pour renforcer ce rôle. Ainsi, des mutations de ce seul domaine peuvent être à l'origine de pathologies notamment cancéreuses ou développementales. Dans le cadre de ce travail, les preuves sur son implication dans l'activation de nombreux récepteurs se sont encore élargies. En effet, nous avons démontré que le domaine TM d'AMIGO₃ est impliqué dans les interactions de ce récepteur avec les autres membres de la plateforme du récepteur NgR. Nous avons également montré que le domaine TM des sous-unités α et β du récepteur IL-10R jouent un rôle dans l'oligomérisation du récepteur. Ces connaissances constituent ensuite le point de départ pour le développement de stratégies ciblant le domaine TM. En effet, au vu de ses rôles fondamentaux, percevoir le domaine TM comme une cible thérapeutique constitue une stratégie innovante avec un vaste champ d'application. Le laboratoire d'accueil a pu acquérir au fil des années, une expertise dans ce type de ciblage par l'utilisation de peptides reprenant la séquence du segment TM du récepteur ciblé. Ces peptides ont la capacité de moduler la dimérisation des récepteurs et par conséquent l'activation de la signalisation sous-jacente. De cette manière, nous avons pu démontrer que le peptide mimant la séquence TM d'AMIGO₃ (MTP-AMIGO₃) empêche la dimérisation d'AMIGO₃ avec ses co-récepteurs, ce qui se traduit par une inhibition de l'activation de la voie de signalisation RhoA. Par conséquent, le peptide permet de promouvoir la migration et la différenciation des oligodendrocytes et ainsi favoriser la remyélinisation (**Figure 27**). Ces effets se sont traduits *in vivo* par une amélioration du score clinique dans un modèle de sclérose en plaques. Ce peptide constitue donc un nouvel espoir dans le traitement de cette maladie auto-immune en favorisant les mécanismes de réparation pour lesquels aucune option thérapeutique n'est disponible. Pour cependant augmenter les effets d'un tel traitement, il faut également empêcher la très forte inflammation induite par les lymphocytes ciblés par les traitements actuels, mais aussi par les macrophages et la microglie. Dans cette optique, nous avons développé deux peptides ciblant la plateforme du récepteur de l'IL-10. De manière

intéressante, le peptide reprenant la séquence TM de la sous-unité IL-10R α (MTP-IL-10R α) est capable d'induire l'activation de la voie de signalisation sous-jacente. Nous pensons que cet effet se traduirait par une induction d'un fort effet anti-inflammatoire capable de moduler la polarisation des macrophages et la microglie en faveur d'un phénotype anti-inflammatoire dans le modèle EAE (Figure 27). Les essais sur les animaux n'ont cependant pas permis d'observer de tels effets pour cette pathologie. Paradoxalement, le peptide reprenant la séquence de la seconde sous-unité (MTP-IL-10R β) possède les effets inverses et inhibe l'oligomérisation du récepteur. Dans ce contexte, nous avons testé ce peptide *in vivo* dans un modèle de glioblastome dans le but de réactiver le système immunitaire qui est inhibé par la tumeur (Figure 27). Nous avons pu mesurer un effet sur certains animaux, une légère augmentation de la survie, signe d'un effet de ce peptide ciblant le domaine TM d'IL-10R. Les exemples des peptides modulant l'activité de ces deux plateformes de récepteurs démontrent l'intérêt de cibler le domaine TM en thérapeutique. Conséquemment, nous avons effectué un criblage pour étudier les interactions des domaines TM de tous les récepteurs à activité tyrosine kinase et six récepteurs à dépendance supplémentaires. Nous avons pu obtenir un véritable interactome qui permettra de décrypter le code des interactions TM. Ainsi, les objectifs initiaux du travail sont atteints. Les résultats obtenus montrent que les segments TM jouent un rôle primordial dans le contrôle des interactions entre récepteurs membranaires. Dans le cas de la plateforme NgR, ils confirment que des associations complexes de segments TM sont engagées pour la signalisation des ligands (Figure 28). Des interactions entre segments TM existent même en absence de motifs canoniques de type (G, A, S)xxx(G, A, S), comme le montre le travail sur la plateforme de l'IL-10R (Figure 28). L'approche par peptide de synthèse mimant les segments TM peut se révéler efficace comme stratégie thérapeutique en modulant les plateformes de récepteurs. A terme, l'outil d'apprentissage automatique en cours de développement permettra de générer des séquences synthétiques interagissant avec n'importe quelle cible TM. Cette librairie virtuelle ouvre la voie à la conception de nombreux *membrane targeting peptides* avec des applications variées et pouvant moduler plusieurs cibles à la fois dans de nombreuses pathologies.

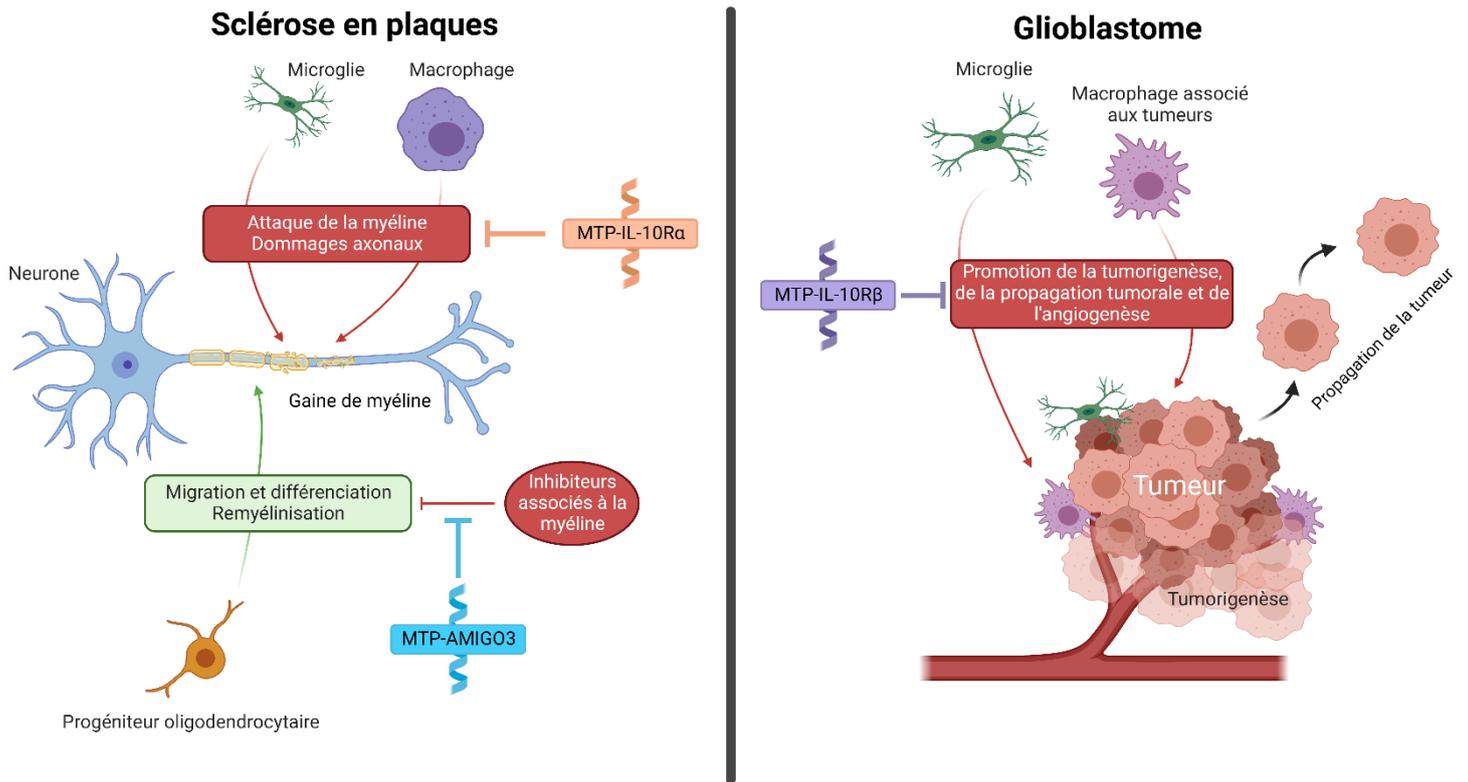


Figure 27 : Les mécanismes d'action proposés pour les peptides testés.

Dans la sclérose en plaques, le peptide MTP-AMIGO3 inhibe l'action des inhibiteurs associés à la myéline. De cette manière il permet aux précurseurs oligodendrocytaires de migrer au niveau des zones lésées et après différenciation, de remyéliniser l'axone. Le peptide MTP-IL-10R α quant à lui, inhiberait l'activité inflammatoire des macrophages et de la microglie.

Dans le glioblastome, le peptide MTP-IL-10R β inhiberait les activités pro-tumorales des macrophages associés aux tumeurs et de la microglie.

(Figure réalisée sur Biorender.com.)

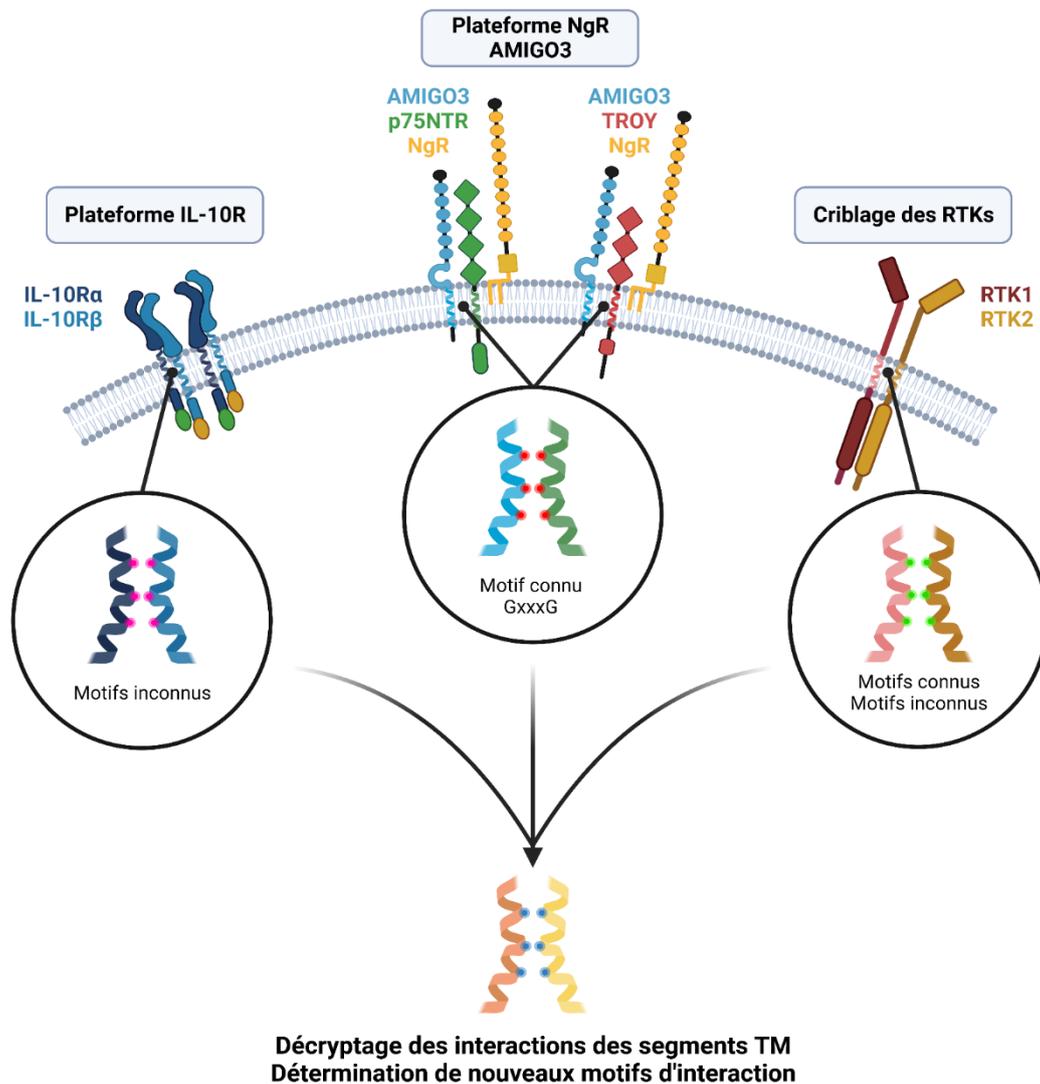


Figure 28 : Vers le décryptage des interactions entre segments TM.

Dans le cadre de ce projet, l'implication du domaine TM dans les interactions de deux plateformes a été étudiée. La première plateforme est celle du récepteur NgR pour laquelle l'implication du domaine TM d'AMIGO3 dans les interactions avec ses co-récepteurs a été prouvée. La séquence TM d'AMIGO contient un motif GxxxG connu et décrit comme favorisant les interactions. La seconde plateforme est celle de l'IL-10R, pour laquelle l'implication des domaines TM des deux sous-unités pour l'oligomérisation du récepteur a été démontrée. Ces deux séquences ne contiennent pas de motif canonique d'interaction. Enfin, un criblage des interactions pour tous les domaines TM des RTKs a été effectué. L'ensemble des résultats permet de se diriger vers la compréhension du code des interactions entre segments TM et va permettre d'identifier de nouveaux motifs impliqués dans des interactions.

(Figure réalisée sur Biorender.com.)

Références

bibliographiques

1. Braun P, Gingras AC. History of protein-protein interactions: From egg-white to complex networks. *PROTEOMICS*. mai 2012;12(10):1478-98.
2. Shuman HA, Silhavy TJ, Beckwith JR. Labeling of proteins with beta-galactosidase by gene fusion. Identification of a cytoplasmic membrane component of the Escherichia coli maltose transport system. *J Biol Chem*. 10 janv 1980;255(1):168-74.
3. Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*. 20 juill 1989;340(6230):245-6.
4. Karimova G, Gaudiard E, Davi M, Ouellette SP, Ladant D. Protein-Protein Interaction: Bacterial Two-Hybrid. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2017;1615:159-76.
5. Luo Y, Batalao A, Zhou H, Zhu L. Mammalian Two-Hybrid System: A Complementary Approach to the Yeast Two-Hybrid System. *BioTechniques*. févr 1997;22(2):350-2.
6. Sawma P, Roth L, Blanchard C, Bagnard D, Crémel G, Bouveret E, et al. Evidence for new homotypic and heterotypic interactions between transmembrane helices of proteins involved in receptor tyrosine kinase and neuropilin signaling. *J Mol Biol*. 12 déc 2014;426(24):4099-111.
7. Wells JA, McClendon CL. Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature*. déc 2007;450(7172):1001-9.
8. Laudet B, Prudent R, Filhol O, Cochet C. Des agents thérapeutiques ciblant des interactions protéine-protéine - Mythe ou réalité ? *médecine/sciences*. 1 mars 2007;23(3):273-8.
9. Guerra VA, DiNardo C, Konopleva M. Venetoclax-based therapies for acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. juin 2019;32(2):145-53.
10. Voter AF, Keck JL. Development of Protein-Protein Interaction Inhibitors for the Treatment of Infectious Diseases. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2018;111:197-222.
11. Montesinos P, Beckermann BM, Catalani O, Esteve J, Gamel K, Konopleva MY, et al. MIRROS: a randomized, placebo-controlled, Phase III trial of cytarabine ± idasanutlin in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Future Oncol Lond Engl*. mai 2020;16(13):807-15.
12. Birch J, Axford D, Foadi J, Meyer A, Eckhardt A, Thielmann Y, et al. The fine art of integral membrane protein crystallisation. *Methods San Diego Calif*. 1 sept 2018;147:150-62.
13. Kermani AA. A guide to membrane protein X-ray crystallography. *FEBS J*. oct 2021;288(20):5788-804.

14. Béganton B, Coyaud E, Mangé A, Solassol J. Approches nouvelles pour l'étude des interactions protéine-protéine. *médecine/sciences*. 1 mars 2019;35(3):223-31.
15. Trugnan G, Fontanges P, Delautier D, Ait-Slimane T. FRAP, FLIP, FRET, BRET, FLIM, PRIM... De nouvelles techniques pour voir la vie en couleur! *médecine/sciences*. 1 nov 2004;20(11):1027-34.
16. Xu Y, Piston DW, Johnson CH. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: Application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5 janv 1999;96(1):151-6.
17. Wouters FS, Verveer PJ, Bastiaens PI. Imaging biochemistry inside cells. *Trends Cell Biol*. mai 2001;11(5):203-11.
18. De Angelis DA, Miesenböck G, Zemelman BV, Rothman JE. PRIM: proximity imaging of green fluorescent protein-tagged polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13 oct 1998;95(21):12312-6.
19. Fredriksson S, Gullberg M, Jarvius J, Olsson C, Pietras K, Gústafsdóttir SM, et al. Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat Biotechnol*. mai 2002;20(5):473-7.
20. Roux KJ, Kim DI, Raida M, Burke B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol*. 19 mars 2012;196(6):801-10.
21. Martell JD, Deerinck TJ, Sancak Y, Poulos TL, Mootha VK, Sosinsky GE, et al. Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy. *Nat Biotechnol*. nov 2012;30(11):1143-8.
22. Cooper GM. Structure of the Plasma Membrane. *Cell Mol Approach 2nd Ed* [Internet]. 2000 [cité 26 mai 2022]; Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9898/>
23. Bailey R. Function, Structure, and Composition of the Cell Membrane [Internet]. ThoughtCo. [cité 26 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.thoughtco.com/cell-membrane-373364>
24. Contents of Essentials of Cell Biology | Learn Science at Scitable [Internet]. [cité 26 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.nature.com/scitable/ebooks/essentials-of-cell-biology-14749010/122997196/>
25. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 18 févr 1972;175(4023):720-31.
26. Nicolson GL. Update of the 1972 Singer-Nicolson Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure. *Discov Craiova Rom*. 31 déc 2013;1(1):e3.
27. Levental I, Levental KR, Heberle FA. Lipid Rafts: Controversies Resolved, Mysteries Remain. *Trends Cell Biol*. 1 mai 2020;30(5):341-53.
28. Moore KH, Murphy HA, George EM. The glycocalyx: a central regulator of vascular function. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*. avr 2021;320(4):R508-18.
29. Bennett MR. The concept of transmitter receptors: 100 years on. *Neuropharmacology*. mars 2000;39(4):523-46.
30. Maehle AH. A binding question: the evolution of the receptor concept. *Endeavour*. déc 2009;33(4):135-40.

31. Nair A, Chauhan P, Saha B, Kubatzky KF. Conceptual Evolution of Cell Signaling. *Int J Mol Sci*. 4 juill 2019;20(13):3292.
32. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara JO, et al. *Neuroscience*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001. Receptor Types
33. Miller EJ, Lappin SL. Physiology, Cellular Receptor. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cité 30 mai 2022]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554403/>
34. GPCR | Learn Science at Scitable [Internet]. [cité 30 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/gpcr-14047471/>
35. Waller DG, Sampson AP. Principles of pharmacology and mechanisms of drug action. In: *Medical Pharmacology and Therapeutics (Fifth edition)*. Elsevier; 2018.
36. Sriram K, Insel PA. G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Mol Pharmacol*. avr 2018;93(4):251-8.
37. Wayne Albers RRW. Cell Membrane Structures and Functions. In: *Basic Neurochemistry (Eighth edition)*. Elsevier; 2012.
38. Popot JL, Engelman DM. Helical Membrane Protein Folding, Stability, and Evolution. *Annu Rev Biochem*. juin 2000;69(1):881-922.
39. Sharpe HJ, Stevens TJ, Munro S. A Comprehensive Comparison of Transmembrane Domains Reveals Organelle-Specific Properties. *Cell*. juill 2010;142(1):158-69.
40. Boyle AL. Applications of de novo designed peptides. In: Koutsopoulos S, éditeur. *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*. Woodhead Publishing; 2018.
41. Baker JA, Wong WC, Eisenhaber B, Warwicker J, Eisenhaber F. Charged residues next to transmembrane regions revisited: « Positive-inside rule » is complemented by the « negative inside depletion/outside enrichment rule ». *BMC Biol*. 24 juill 2017;15(1):66.
42. Westerfield JM, Barrera FN. Membrane receptor activation mechanisms and transmembrane peptide tools to elucidate them. *J Biol Chem*. 14 févr 2020;295(7):1792-814.
43. Kleinschmidt JH. Folding of β -barrel membrane proteins in lipid bilayers - Unassisted and assisted folding and insertion. *Biochim Biophys Acta*. sept 2015;1848(9):1927-43.
44. Popot JL, Engelman DM. Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry*. 1 mai 1990;29(17):4031-7.
45. Bormann BJ, Engelman DM. Intramembrane Helix-Helix Association in Oligomerization and Transmembrane Signaling. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. juin 1992;21(1):223-42.
46. Popot JL, de Vitry C. On the Microassembly of Integral Membrane Proteins. *Annu Rev Biophys Chem*. juin 1990;19(1):369-403.
47. Popot JL, Gerchman SE, Engelman DM. Refolding of bacteriorhodopsin in lipid bilayers. A thermodynamically controlled two-stage process. *J Mol Biol*. 20 déc 1987;198(4):655-76.
48. Lemmon MA, Engelman DM. Specificity and promiscuity in membrane helix interactions. *Q Rev Biophys*. mai 1994;27(2):157-218.

49. Koland JG, Cerione RA. Growth factor control of epidermal growth factor receptor kinase activity via an intramolecular mechanism. *J Biol Chem.* 15 févr 1988;263(5):2230-7.
50. Thomas DJ, Wall JS, Hainfeld JF, Kaczorek M, Booy FP, Trus BL, et al. gp160, the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1, is a dimer of 125-kilodalton subunits stabilized through interactions between their gp41 domains. *J Virol.* juill 1991;65(7):3797-803.
51. Lemmon MA, Flanagan JM, Hunt JF, Adair BD, Bormann BJ, Dempsey CE, et al. Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane alpha-helices. *J Biol Chem.* 15 avr 1992;267(11):7683-9.
52. Engelman DM, Adair BD, Brünger A, Flanagan JM, Hunt JF, Lemmon MA, et al. Dimerization of glycophorin A transmembrane helices: mutagenesis and modeling. *Soc Gen Physiol Ser.* 1993;48:11-21.
53. Hénin J, Pohorille A, Chipot C. Insights into the Recognition and Association of Transmembrane α -Helices. The Free Energy of α -Helix Dimerization in Glycophorin A. *J Am Chem Soc.* 1 juin 2005;127(23):8478-84.
54. Engelman DM, Chen Y, Chin CN, Curran AR, Dixon AM, Dupuy AD, et al. Membrane protein folding: beyond the two stage model. *FEBS Lett.* 27 nov 2003;555(1):122-5.
55. Ulmschneider MB, Ulmschneider JP, Schiller N, Wallace BA, von Heijne G, White SH. Spontaneous transmembrane helix insertion thermodynamically mimics translocon-guided insertion. *Nat Commun.* 10 sept 2014;5(1):4863.
56. McKay MJ, Afrose F, Koeppe RE, Greathouse DV. Helix formation and stability in membranes. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* oct 2018;1860(10):2108-17.
57. Focke PJ, Hein C, Hoffmann B, Matulef K, Bernhard F, Dötsch V, et al. Combining in Vitro Folding with Cell Free Protein Synthesis for Membrane Protein Expression. *Biochemistry.* 2 août 2016;55(30):4212-9.
58. Popot JL, Engelman DM. Membranes Do Not Tell Proteins How To Fold. *Biochemistry.* 12 janv 2016;55(1):5-18.
59. Stangl M, Schneider D. Functional competition within a membrane: Lipid recognition vs. transmembrane helix oligomerization. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* sept 2015;1848(9):1886-96.
60. Illergård K, Kauko A, Elofsson A. Why are polar residues within the membrane core evolutionary conserved? *Proteins Struct Funct Bioinforma.* 2011;79(1):79-91.
61. Rajagopalan V, Greathouse DV, Koeppe RE. Influence of glutamic acid residues and pH on the properties of transmembrane helices. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* mars 2017;1859(3):484-92.
62. Fink A, Sal-Man N, Gerber D, Shai Y. Transmembrane domains interactions within the membrane milieu: principles, advances and challenges. *Biochim Biophys Acta.* avr 2012;1818(4):974-83
63. Fleming KG, Engelman DM. Computation and mutagenesis suggest a right-handed structure for the synaptobrevin transmembrane dimer. *Proteins Struct Funct Bioinforma.* 2001;45(4):313-7.

64. Fleming KG, Ackerman AL, Engelman DM. The effect of point mutations on the free energy of transmembrane alpha-helix dimerization. *J Mol Biol.* 19 sept 1997;272(2):266-75.
65. Adair BD, Engelman DM. Glycophorin A Helical Transmembrane Domains Dimerize in Phospholipid Bilayers: A Resonance Energy Transfer Study. *Biochemistry.* 10 mai 1994;33(18):5539-44.
66. Curran AR, Engelman DM. Sequence motifs, polar interactions and conformational changes in helical membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol.* août 2003;13(4):412-7.
67. Russ WP, Engelman DM. The GxxxG motif: A framework for transmembrane helix-helix association. Edited by G. von Heijne. *J Mol Biol.* 25 févr 2000;296(3):911-9.
68. Moore DT, Berger BW, DeGrado WF. Protein-Protein Interactions in the Membrane: Sequence, Structural, and Biological Motifs. *Structure.* juill 2008;16(7):991-1001.
69. Xiao Y, Zeng B, Berner N, Frishman D, Langosch D, Teese MG. Experimental determination and data-driven prediction of homotypic transmembrane domain interfaces. *Comput Struct Biotechnol J.* 2020;18:3230-42.
70. Rath A, Johnson RM, Deber CM. Peptides as transmembrane segments: Decrypting the determinants for helix-helix interactions in membrane proteins. *Pept Sci.* 2007;88(2):217-32.
71. Senes A, Gerstein M, Engelman DM. Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with β -branched residues at neighboring positions. Edited by G. von Heijne. *J Mol Biol.* 25 févr 2000;296(3):921-36.
72. Therien AG, Grant FE, Deber CM. Interhelical hydrogen bonds in the CFTR membrane domain. *Nat Struct Biol.* juill 2001;8(7):597-601.
73. Shy ME. Phenotypic clustering in MPZ mutations. *Brain.* 1 févr 2004;127(2):371-84.
74. Sal-Man N, Gerber D, Shai Y. The composition rather than position of polar residues (QxxS) drives aspartate receptor transmembrane domain dimerization in vivo. *Biochemistry.* 2 mars 2004;43(8):2309-13.
75. Zhou FX, Merianos HJ, Brunger AT, Engelman DM. Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27 févr 2001;98(5):2250-5.
76. Gratkowski H, Lear JD, DeGrado WF. Polar side chains drive the association of model transmembrane peptides. *Proc Natl Acad Sci.* 30 janv 2001;98(3):880-5.
77. Placone J, Hristova K. Direct Assessment of the Effect of the Gly380Arg Achondroplasia Mutation on FGFR3 Dimerization Using Quantitative Imaging FRET. *He B, éditeur. PLoS ONE.* 9 oct 2012;7(10):e46678.
78. Partridge AW, Therien AG, Deber CM. Missense mutations in transmembrane domains of proteins: Phenotypic propensity of polar residues for human disease: Disease-Phenotypic Mutations in Membrane Proteins. *Proteins Struct Funct Bioinforma.* 1 mars 2004;54(4):648-56.
79. Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. The Leucine Zipper: A Hypothetical Structure Common to a New Class of DNA Binding Proteins. *Science.* 24 juin 1988;240(4860):1759-64.

80. Li E, Wimley WC, Hristova K. Transmembrane Helix Dimerization: Beyond the Search for Sequence Motifs. *Biochim Biophys Acta*. févr 2012;1818(2):183-93.
81. Noordeen NA, Carafoli F, Hohenester E, Horton MA, Leitinger B. A Transmembrane Leucine Zipper Is Required for Activation of the Dimeric Receptor Tyrosine Kinase DDR1. *J Biol Chem*. août 2006;281(32):22744-51.
82. Xu L, Hu TT, Luo SZ. Leucine Zipper Motif Drives the Transmembrane Domain Dimerization of E-cadherin. *Int J Pept Res Ther*. mars 2014;20(1):95-102.
83. Kim S, Jeon TJ, Oberai A, Yang D, Schmidt JJ, Bowie JU. Transmembrane glycine zippers: Physiological and pathological roles in membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci*. 4 oct 2005;102(40):14278-83.
84. Fonte V, Dostal V, Roberts CM, Gonzales P, Lacor P, Magrane J, et al. A glycine zipper motif mediates the formation of toxic β -amyloid oligomers in vitro and in vivo. *Mol Neurodegener*. déc 2011;6(1):61.
85. Johnson RM, Hecht K, Deber CM. Aromatic and Cation- π Interactions Enhance Helix-Helix Association in a Membrane Environment. *Biochemistry*. 1 août 2007;46(32):9208-14.
86. Kobus FJ, Fleming KG. The GxxxG-Containing Transmembrane Domain of the CCK4 Oncogene Does Not Encode Preferential Self-Interactions. *Biochemistry*. 1 févr 2005;44(5):1464-70.
87. Duarte G, Grau B, Mingarro I, Martinez-Gil L. Methodological approaches for the analysis of transmembrane domain interactions: A systematic review. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 1 déc 2021;1863(12):183712.
88. Polyansky AA, Volynsky PE, Efremov RG. Multistate Organization of Transmembrane Helical Protein Dimers Governed by the Host Membrane. *J Am Chem Soc*. 5 sept 2012;134(35):14390-400.
89. Polyansky AA, Chugunov AO, Volynsky PE, Krylov NA, Nolde DE, Efremov RG. PREDDIMER: a web server for prediction of transmembrane helical dimers. *Bioinformatics*. 15 mars 2014;30(6):889-90.
90. Lomize AL, Pogozheva ID. TMDOCK: An Energy-Based Method for Modeling α -Helical Dimers in Membranes. *J Mol Biol*. 3 févr 2017;429(3):390-8.
91. Weinstein JY, Elazar A, Fleishman SJ. A lipophilicity-based energy function for membrane-protein modelling and design. *PLoS Comput Biol*. 28 août 2019;15(8):e1007318.
92. Krissinel E, Henrick K. Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. *J Mol Biol*. 21 sept 2007;372(3):774-97.
93. Kolmar H, Hennecke F, Götze K, Janzer B, Vogt B, Mayer F, et al. Membrane insertion of the bacterial signal transduction protein ToxR and requirements of transcription activation studied by modular replacement of different protein substructures. *EMBO J*. 15 août 1995;14(16):3895-904.
94. Langosch D, Brosig B, Kolmar H, Fritz HJ. Dimerisation of the glycoporphin A transmembrane segment in membranes probed with the ToxR transcription activator. *J Mol Biol*. 8 nov 1996;263(4):525-30.

95. Russ WP, Engelman DM. TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2 févr 1999;96(3):863-8.
96. Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell.* avr 2002;9(4):789-98.
97. Casarotto PC, Girysh M, Fred SM, Kovaleva V, Moliner R, Enkavi G, et al. Antidepressant drugs act by directly binding to TRKB neurotrophin receptors. *Cell.* mars 2021;184(5):1299-1313.e19.
98. Furthmayr H, Marchesi VT. Subunit structure of human erythrocyte glycophorin A. *Biochemistry.* mars 1976;15(5):1137-44.
99. Lofts FJ, Hurst HC, Sternberg MJ, Gullick WJ. Specific short transmembrane sequences can inhibit transformation by the mutant neu growth factor receptor in vitro and in vivo. *Oncogene.* oct 1993;8(10):2813-20.
100. Yin H, Slusky JS, Berger BW, Walters RS, Vilaire G, Litvinov RI, et al. Computational Design of Peptides That Target Transmembrane Helices. *Science.* 30 mars 2007;315(5820):1817-22.
101. Yin H, Flynn AD. Drugging Membrane Protein Interactions. *Annu Rev Biomed Eng.* 11 juill 2016;18:51-76.
102. Slivka PF, Wong J, Caputo GA, Yin H. Peptide Probes for Protein Transmembrane Domains. *ACS Chem Biol.* 1 juill 2008;3(7):402-11.
103. Freeman-Cook LL, Dixon AM, Frank JB, Xia Y, Ely L, Gerstein M, et al. Selection and characterization of small random transmembrane proteins that bind and activate the platelet-derived growth factor beta receptor. *J Mol Biol.* 14 mai 2004;338(5):907-20.
104. Cammett TJ, Jun SJ, Cohen EB, Barrera FN, Engelman DM, DiMaio D. Construction and genetic selection of small transmembrane proteins that activate the human erythropoietin receptor. *Proc Natl Acad Sci.* 23 févr 2010;107(8):3447-52.
105. Zeng X, Wu P, Yao C, Liang J, Zhang S, Yin H. Small Molecule and Peptide Recognition of Protein Transmembrane Domains. *Biochemistry.* 18 avr 2017;56(15):2076-85.
106. Stone TA, Deber CM. Therapeutic design of peptide modulators of protein-protein interactions in membranes. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* avr 2017;1859(4):577-85.
107. Albrecht C, Appert-Collin A, Bagnard D, Blaise S, Romier-Crouzet B, Efremov RG, Sartelet H, Duca L, Maurice P, Bennisroune A. Transmembrane Peptides as Inhibitors of Protein-Protein Interactions: An Efficient Strategy to Target Cancer Cells? *Front Oncol.* 15 avr 2020;10:519.
108. Roth L, Nasarre C, Dirrig-Grosch S, Aunis D, Crémel G, Hubert P, et al. Transmembrane Domain Interactions Control Biological Functions of Neuropilin-1. *Mol Biol Cell.* févr 2008;19(2):646-54.
109. Deb PK, Al-Attraqchi O, Chandrasekaran B, Paradkar A, Tekade RK. Protein/Peptide Drug Delivery Systems. In: *Basic Fundamentals of Drug Delivery.* Elsevier; 2019.
110. Reshetnyak YK, Andreev OA, Segala M, Markin VS, Engelman DM. Energetics of peptide (pHLIP) binding to and folding across a lipid bilayer membrane. *Proc Natl Acad Sci.* 7 oct 2008;105(40):15340-5.

111. Nguyen VP, Alves DS, Scott HL, Davis FL, Barrera FN. A Novel Soluble Peptide with pH-Responsive Membrane Insertion. *Biochemistry*. 3 nov 2015;54(43):6567-75.
112. Bennisroune A, Fickova M, Gardin A, Dirrig-Grosch S, Aunis D, Crémel G, et al. Transmembrane Peptides as Inhibitors of ErbB Receptor Signaling. *Mol Biol Cell*. juill 2004;15(7):3464-74.
113. Bennisroune A, Gardin A, Auzan C, Clauser E, Dirrig-Grosch S, Meira M, Appert-Collin A, Aunis D, Crémel G, Hubert P. Inhibition by transmembrane peptides of chimeric insulin receptors. *Cell Mol Life Sci*. sept 2005;62(18):2124-31.
114. Arpel A, Sawma P, Spenlé C, Fritz J, Meyer L, Garnier N, et al. Transmembrane domain targeting peptide antagonizing ErbB2/Neu inhibits breast tumor growth and metastasis. *Cell Rep*. 25 sept 2014;8(6):1714-21.
115. Bublil EM, Cohen T, Amusch CJ, Peleg A, Pines G, Lavi S, et al. Interfering with the Dimerization of the ErbB Receptors by Transmembrane Domain-Derived Peptides Inhibits Tumorigenic Growth *in Vitro* and *in Vivo*. *Biochemistry*. 4 oct 2016;55(39):5520-30.
116. Nasarre C, Roth M, Jacob L, Roth L, Koncina E, Thien A, et al. Peptide-based interference of the transmembrane domain of neuropilin-1 inhibits glioma growth *in vivo*. *Oncogene*. avr 2010;29(16):2381-92.
117. Arpel A, Gamper C, Spenlé C, Fernandez A, Jacob L, Baumlin N, et al. Inhibition of primary breast tumor growth and metastasis using a neuropilin-1 transmembrane domain interfering peptide. *Oncotarget*. 23 août 2016;7(34):54723-32.
118. Alves DS, Westerfield JM, Shi X, Nguyen VP, Stefanski KM, Booth KR, et al. A novel pH-dependent membrane peptide that binds to EphA2 and inhibits cell migration. *eLife*. 17 sept 2018;7:e36645.
119. Jacob L, Sawma P, Garnier N, Meyer LAT, Fritz J, Hussenet T, et al. Inhibition of PlexA1-mediated brain tumor growth and tumor-associated angiogenesis using a transmembrane domain targeting peptide. *Oncotarget*. 6 sept 2016;7(36):57851-65.
120. Binamé F, Pham-Van LD, Bagnard D. Manipulating oligodendrocyte intrinsic regeneration mechanism to promote remyelination. *Cell Mol Life Sci CMLS*. juill 2021;78(13):5257-73.
121. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. sept 2015;15(9):545-58.
122. Binamé F, Pham-Van LD, Spenlé C, Jolivel V, Birmpili D, Meyer LA, et al. Disruption of Sema3A/Plexin-A1 inhibitory signalling in oligodendrocytes as a therapeutic strategy to promote remyelination. *EMBO Mol Med*. 7 nov 2019;11(11):e10378.
123. Mi S, Miller RH, Lee X, Scott ML, Shulag-Morskaya S, Shao Z, et al. LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci*. juin 2005;8(6):745-51.
124. Llorens F, Gil V, Iraola S, Carim-Todd L, Martí E, Estivill X, et al. Developmental analysis of Lingo-1/Lern1 protein expression in the mouse brain: interaction of its intracellular domain with Myt1l. *Dev Neurobiol*. mars 2008;68(4):521-41.

125. Jepson S, Vought B, Gross CH, Gan L, Austen D, Frantz JD, et al. LINGO-1, a transmembrane signaling protein, inhibits oligodendrocyte differentiation and myelination through intercellular self-interactions. *J Biol Chem.* 22 juin 2012;287(26):22184-95.
126. Kuja-Panula J, Kiiltomäki M, Yamashiro T, Rouhiainen A, Rauvala H. AMIGO, a transmembrane protein implicated in axon tract development, defines a novel protein family with leucine-rich repeats. *J Cell Biol.* 17 mars 2003;160(6):963-73.
127. Ahmed Z, Douglas MR, John G, Berry M, Logan A. AMIGO3 is an NgR1/p75 co-receptor signalling axon growth inhibition in the acute phase of adult central nervous system injury. *PloS One.* 2013;8(4):e61878.
128. Cadavid D, Mellion M, Hupperts R, Edwards KR, Calabresi PA, Drulović J, et al. Safety and efficacy of opicinumab in patients with relapsing multiple sclerosis (SYNERGY): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol.* sept 2019;18(9):845-56.
129. Li X, Pan Y, Gui J, Fang Z, Huang D, Luo H, Cheng L, Chen H, Song X, Jiang L. The Role and Mechanism of AMIGO3 in the Formation of Aberrant Neural Circuits After Status Convulsion in Immature Mice. *Front Mol Neurosci.* 28 sept 2021;14:748115.
130. Ouyang W, O'Garra A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity.* 16 avr 2019;50(4):871-91.
131. Saxton RA, Tsutsumi N, Su LL, Abhiraman GC, Mohan K, Henneberg LT, et al. Structure-based decoupling of the pro- and anti-inflammatory functions of interleukin-10. *Science.* 19 mars 2021;371(6535):eabc8433.
132. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683-765.
133. Walter MR. The Molecular Basis of IL-10 Function: From Receptor Structure to the Onset of Signaling. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2014;380:191-212.
134. Shouval DS, Ouahed J, Biswas A, Goettel JA, Horwitz BH, Klein C, et al. Interleukin 10 Receptor Signaling. In: *Advances in Immunology.* Elsevier; 2014.
135. Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med.* 6 janv 2020;217(1):e20190418.
136. Howes A, Gabryšová L, O'Garra A. Role of IL-10 and the IL-10 Receptor in Immune Responses. In: *Reference Module in Biomedical Sciences.* Elsevier; 2014.
137. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 3 mars 2014;6:13.
138. Lopes RL, Borges TJ, Zanin RF, Bonorino C. IL-10 is required for polarization of macrophages to M2-like phenotype by mycobacterial DnaK (heat shock protein 70). *Cytokine.* 1 sept 2016;85:123-9.
139. Walters RFS, DeGrado WF. Helix-packing motifs in membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12 sept 2006;103(37):13658-63.
140. Mueller BK, Subramaniam S, Senes A. A frequent, GxxxG-mediated, transmembrane association motif is optimized for the formation of interhelical C α -H hydrogen bonds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11 mars 2014;111(10):E888-95.

141. Wheeler DL, Yarden Y, éditeurs. Receptor Tyrosine Kinases: Family and Subfamilies. Cham: Springer International Publishing; 2015.
142. Hubbard SR, Miller WT. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr Opin Cell Biol.* avr 2007;19(2):117-23.
143. Ulloa-Aguirre A, Zariñán T, Castillo-Badillo JA, Maravillas-Montero JL. Membrane Receptor Signaling in Health and Disease. In: Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology. Elsevier; 2017.
144. Wintheiser GA, Silberstein P. Physiology, Tyrosine Kinase Receptors. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cité 30 juin 2022]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538532/>
145. Pareja F, Pines G, Yarden Y. The EGFR/ERBB Receptor Family. In: Wheeler DL, Yarden Y, éditeurs. Receptor Tyrosine Kinases: Family and Subfamilies. Cham: Springer International Publishing; 2015.
146. Gaitanos T, Dudanova I, Sakkou M, Klein R, Paixão S. The Eph Receptor Family. In: Wheeler DL, Yarden Y, éditeurs. Receptor Tyrosine Kinases: Family and Subfamilies. Cham: Springer International Publishing; 2015.
147. Li E, Hristova K. Receptor tyrosine kinase transmembrane domains. *Cell Adhes Migr.* 2010;4(2):249-54.
148. Finger C, Escher C, Schneider D. The single transmembrane domains of human receptor tyrosine kinases encode self-interactions. *Sci Signal.* 22 sept 2009;2(89):ra56.
149. Cobret L, De Tauzia ML, Ferent J, Traiffort E, Hénaoui I, Godin F, et al. Targeting the cis-dimerization of LINGO-1 with low MW compounds affects its downstream signalling. *Br J Pharmacol.* 2015;172(3):841-56.
150. Pham-Van LD, Kuntzel T, Spenlé C, Charmarke Askar I, Birmpili D, El Khamlichi C, et al. Peptide-based inhibition of AMIGO3 antagonizes myelin inhibitory factors and promotes remyelination. Manuscrit en préparation.
151. Goldschneider D, Mehlen P. Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene.* 1 avr 2010;29(13):1865-82.
152. Gibert B, Mehlen P. Dependence Receptors and Cancer: Addiction to Trophic Ligands. *Cancer Res.* 15 déc 2015;75(24):5171-5.
153. Negulescu AM, Mehlen P. Dependence receptors - the dark side awakens. *FEBS J.* nov 2018;285(21):3909-24.
154. Li E, Hristova K. Role of Receptor Tyrosine Kinase Transmembrane Domains in Cell Signaling and Human Pathologies. *Biochemistry.* 1 mai 2006;45(20):6241-51.
155. Du Z, Lovly CM. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol Cancer.* 19 févr 2018;17(1):58.
156. Paul MD, Hristova K. The RTK Interactome: Overview and Perspective on RTK Heterointeractions. *Chem Rev.* 8 mai 2019;119(9):5881-921.

157. Karachaliou N, Codony-Servat J, Bracht JWP, Ito M, Filipiska M, Pedraz C, et al. Characterising acquired resistance to erlotinib in non-small cell lung cancer patients. *Expert Rev Respir Med.* oct 2019;13(10):1019-28.
158. Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, Nabioullin R, Ponugoti AH, Wiedemeyer R, et al. Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science.* 12 oct 2007;318(5848):287-90.
159. Cordes FS, Bright JN, Sansom MSP. Proline-induced distortions of transmembrane helices. *J Mol Biol.* 8 nov 2002;323(5):951-60.
160. Marullo S, Bouvier M. Resonance energy transfer approaches in molecular pharmacology and beyond. *Trends Pharmacol Sci.* août 2007;28(8):362-5.
161. El Khamlichi C, Reverchon-Assadi F, Hervouet-Coste N, Blot L, Reiter E, Morisset-Lopez S. Bioluminescence Resonance Energy Transfer as a Method to Study Protein-Protein Interactions: Application to G Protein Coupled Receptor Biology. *Molecules.* 1 févr 2019;24(3):537.
162. Foale S, Berry M, Logan A, Fulton D, Ahmed Z. LINGO-1 and AMIGO3, potential therapeutic targets for neurological and dysmyelinating disorders? *Neural Regen Res.* août 2017;12(8):1247-51.
163. Hauser SL, Cree BAC. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *Am J Med.* déc 2020;133(12):1380-1390.e2.
164. Lee S, Chong SYC, Tuck SJ, Corey JM, Chan JR. A rapid and reproducible assay for modeling myelination by oligodendrocytes using engineered nanofibers. *Nat Protoc.* avr 2013;8(4):771-82.
165. Guerrero BL, Sicotte NL. Microglia in Multiple Sclerosis: Friend or Foe? *Front Immunol.* 20 mars 2020;11:374.
166. Luo C, Jian C, Liao Y, Huang Q, Wu Y, Liu X, et al. The role of microglia in multiple sclerosis. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2017;13:1661-7.
167. Kuntzel T, Bagnard D. Manipulating Macrophage/Microglia Polarization to Treat Glioblastoma or Multiple Sclerosis. *Pharmaceutics.* 1 févr 2022;14(2):344.
168. Ransohoff RM. Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line. *Nat Neurosci.* 26 juill 2012;15(8):1074-7.
169. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol.* oct 2011;164(4):1079-106.
170. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a Major Cytokine in the Central Nervous System. *Int J Biol Sci.* 25 oct 2012;8(9):1254-66.
171. Chomiak T, Hu B. What Is the Optimal Value of the g-Ratio for Myelinated Fibers in the Rat CNS? A Theoretical Approach. *PLOS ONE.* 13 nov 2009;4(11):e7754.
172. Stikov N, Campbell JSW, Stroh T, Lavelée M, Frey S, Novek J, et al. In vivo histology of the myelin g-ratio with magnetic resonance imaging. *NeuroImage.* sept 2015;118:397-405.

173. Linker RA, Lee DH. Models of autoimmune demyelination in the central nervous system: on the way to translational medicine. *Exp Transl Stroke Med.* 21 oct 2009;1:5.
174. Wei Y, Chang H, Feng H, Li X, Zhang X, Yin L. Low Serum Interleukin-10 Is an Independent Predictive Factor for the Risk of Second Event in Clinically Isolated Syndromes. *Front Neurol.* 2019 Jun 11;10:604.
175. Bettelli E, Das MP, Howard ED, Weiner HL, Sobel RA, Kuchroo VK. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 oct 1998;161(7):3299-306.
176. Mossner S, Kuchner M, Fazel Modares N, Knebel B, Al-Hasani H, Floss DM, et al. Synthetic interleukin 22 (IL-22) signaling reveals biological activity of homodimeric IL-10 receptor 2 and functional cross-talk with the IL-6 receptor gp130. *J Biol Chem.* 28 août 2020;295(35):12378-97.
177. Wong WC, Maurer-Stroh S, Schneider G, Eisenhaber F. Transmembrane helix: simple or complex. *Nucleic Acids Res.* juill 2012;40(Web Server issue):W370-375.
178. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 Therapy—Review of a New Approach. *Pharmacol Rev.* juin 2003;55(2):241-69.
179. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schäffer AA, Noyan F, et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med.* 19 nov 2009;361(21):2033-45.
180. Trifunović J, Miller L, Debeljak Ž, Horvat V. Pathologic patterns of interleukin 10 expression – A review. *Biochem Medica.* 15 févr 2015;25(1):36-48.
181. Wang X, Wong K, Ouyang W, Rutz S. Targeting IL-10 Family Cytokines for the Treatment of Human Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* févr 2019;11(2):a028548.
182. Hannon CW, McCourt C, Lima HC, Chen S, Bennett C. Interventions for cutaneous disease in systemic lupus erythematosus. *Cochrane Database Syst Rev.* 2021 Mar 9;3(3):CD007478.
183. Tilg H, van Montfrans C, van den Ende A, Kaser A, van Deventer SJH, Schreiber S, et al. Treatment of Crohn's disease with recombinant human interleukin 10 induces the proinflammatory cytokine interferon gamma. *Gut.* févr 2002;50(2):191-5.
184. Haase S, Linker RA. Inflammation in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord.* 2021;14:17562864211007688.
185. Peferoen LAN, Vogel DYS, Ummenthum K, Breur M, Heijnen PDAM, Gerritsen WH, et al. Activation status of human microglia is dependent on lesion formation stage and remyelination in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* janv 2015;74(1):48-63.
186. Chu F, Shi M, Zheng C, Shen D, Zhu J, Zheng X, et al. The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 15 mai 2018;318:1-7.
187. Boillée S. Local and remote interactions between macrophages and microglia in neurological conditions. *Curr Opin Immunol.* févr 2022;74:118-24.
188. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 1 mars 2012;122(3):787-95.

189. Cassetta L, Cassol E, Poli G. Macrophage Polarization in Health and Disease. *Sci World J.* 2011;11:2391-402.
190. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* déc 2008;8(12):958-69.
191. Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Macías-Islas MÁ, Flores-Alvarado LJ, Mireles-Ramírez MA, González-Renovato ED, et al. Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *Arch Med Res.* nov 2014;45(8):687-97.
192. Ruffell B, Chang-Strachan D, Chan V, Rosenbusch A, Ho CMT, Pryer N, et al. Macrophage IL-10 Blocks CD8+ T Cell-Dependent Responses to Chemotherapy by Suppressing IL-12 Expression in Intratumoral Dendritic Cells. *Cancer Cell.* 10 nov 2014;26(5):623-37.
193. Ni G, Zhang L, Yang X, Li H, Ma B, Walton S, et al. Targeting interleukin-10 signalling for cancer immunotherapy, a promising and complicated task. *Hum Vaccines Immunother.* 16(10):2328-32.
194. Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci.* janv 2016;19(1):20-7.
195. Qi L, Yu H, Zhang Y, Zhao D, Lv P, Zhong Y, et al. IL-10 secreted by M2 macrophage promoted tumorigenesis through interaction with JAK2 in glioma. *Oncotarget.* 28 sept 2016;7(44):71673-85.
196. Numasaki M. IL-28 and IL-29 in Regulation of Antitumor Immune Response and Induction of Tumor Regression. In: Lustgarten J, Cui Y, Li S, éditeurs. *Targeted Cancer Immune Therapy* [Internet]. New York, NY: Springer; 2009 [cité 3 août 2022]. p. 75-95. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0170-5_5
197. Naing A, Papadopoulos KP, Autio KA, Ott PA, Patel MR, Wong DJ, et al. Safety, Antitumor Activity, and Immune Activation of Pegylated Recombinant Human Interleukin-10 (AM0010) in Patients With Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 oct 2016;34(29):3562-9.
198. He L, Hristova K. Physical-chemical principles underlying RTK activation, and their implications for human disease. *Biochim Biophys Acta.* avr 2012;1818(4):995-1005.
199. Xu W, Li Y, Wang X, Chen B, Wang Y, Liu S, et al. FGFR4 transmembrane domain polymorphism and cancer risk: a meta-analysis including 8555 subjects. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. déc 2010;46(18):3332-8
200. Gamper C, Spenlé C, Boscá S, van der Heyden M, Erhardt M, Orend G, et al. Functionalized Tobacco Mosaic Virus Coat Protein Monomers and Oligomers as Nanocarriers for Anti-Cancer Peptides. *Cancers.* oct 2019;11(10):1609.

Liste des articles et communications

PUBLICATIONS :

- 1) **Kuntzel T, Bagnard D.** Manipulating Macrophage/Microglia Polarization to Treat Glioblastoma or Multiple Sclerosis. *Pharmaceutics*. 2022 Feb 1;14(2):344. doi: 10.3390/pharmaceutics14020344. [Publié]
- 2) **Pham-Van L.D, Kuntzel T, Spenlé C, Charmarke-Askar I, Bimpili D, El Khamlichi C, Morriset Lopez S and Bagnard D.** Peptide-based inhibition of AMIGO3 antagonizes myelin inhibitory factors and promotes remyelination. [En cours de rédaction]
- 3) **Kuntzel T, Spenlé C, Riou A, Pham-Van L.D, Loeuillet A, Bimpili D, Charmarke-Askar I and Bagnard D.** Implication of transmembrane domain in interleukine-10 receptor platform oligomerisation. [En cours de rédaction]
- 4) **Bimpili D, Charmarke-Askar I, Kuntzel T, Spenlé C, Pham-Van L.D, Riou A and Bagnard D.** Toward a combination of biomarkers for molecular characterization of Multiple Sclerosis. [Soumis pour publication]
- 5) **Bimpili D, Charmarke-Askar I, Spenlé C, Pham-Van L.D, Kuntzel T, Riou A, Xhurxhi A and Bagnard D.** A fluorinated apelin-13 peptide ameliorates clinical score and neuropathology of a relapsing-remitting multiple sclerosis mouse model. [En cours de rédaction]

COMMUNICATIONS :

- 1) **Kuntzel T, Spenlé C, Van der Heyden M and Bagnard D.** Controlling microglia / macrophage polarisation in glioblastoma using a peptide targeting the transmembrane domain of the IL10 receptor. *European Association for Cancer Research 2021 Virtual Congress: Innovative Cancer Science*. 9-12 juin 2021. En ligne.
- 2) **Kuntzel T, Spenlé C, Van der Heyden M and Bagnard D.** Targeting the interleukin 10 receptor complex using a transmembrane targeting peptide to control microglia / macrophage polarisation in glioblastoma. *XV European Meeting on glial cells in health and disease*. 5-9 juillet 2021. En ligne.
- 3) **Kuntzel T, Pham-Van L.D, Gioria S, Villa P, Eguida M, Rognan D and Bagnard D.** An automated method to determine the interaction of transmembrane domains. *Les journées du campus d'Illkirch 2022*. 23-24 mai 2022. Faculté de pharmacie, Illkirch-Graffenstaden

Analyse systématique des interactions des domaines transmembranaires : du récepteur de l'interleukine-10 et AMIGO₃ à l'ensemble des récepteurs à activité tyrosine kinase

Résumé

Le domaine transmembranaire (TM) des protéines membranaires possède des rôles clés dans l'oligomérisation et l'activation des récepteurs. De simples mutations de ce segment peuvent être à l'origine de situations pathologiques. Pour ces raisons, il constitue une cible thérapeutique à part entière. Dans le cadre de ce travail, nous avons à la fois démontré l'implication du domaine TM dans l'activation du récepteur AMIGO₃, impliqué dans la plateforme du récepteur NgR et son implication dans l'oligomérisation des sous-unités α et β du récepteur de l'interleukine anti-inflammatoire IL-10. Des peptides mimant les séquences TM de ces récepteurs ont permis de moduler leur activation et celle des voies de signalisation sous-jacentes. Le peptide ciblant AMIGO₃ est capable d'améliorer les signes cliniques dans un modèle de sclérose en plaques, alors que les peptides ciblant l'IL-10R montrent des effets *in vitro* qui n'ont pas permis d'obtenir des effets significatifs *in vivo* dans des modèles de pathologies inflammatoire et cancéreuse. Face à ces nouveaux exemples soulignant l'importance du domaine TM, nous avons également réalisé une analyse systématique des interactions entre domaines TM par un test de BRET. L'interactome complet des domaines TM des 58 récepteurs à activité tyrosine kinase et de six récepteurs à dépendance a ainsi été réalisé. Ces résultats ouvrent la voie à la conception d'un outil permettant de comprendre les interactions entre domaines TM et ainsi de concevoir des peptides thérapeutiques ciblant n'importe quel récepteur.

Domaine transmembranaire – AMIGO₃ – IL-10R – Sclérose en plaques – Glioblastome – RTK – Criblage

Résumé en anglais

The transmembrane (TM) domain of membrane proteins has key roles in oligomerisation and receptor activation. Simple mutations in this segment can lead to disease development. For these reasons, the TM by itself constitutes an interesting therapeutic target. In this work, we have demonstrated the involvement of the TM domain in the activation of both the AMIGO₃ receptor, involved in the NgR receptor platform and in the oligomerisation of the α and β subunits of the anti-inflammatory interleukin 10 receptor. Peptides mimicking the TM sequences of these receptors were used to modulate the activation of the receptors and the underlying signalling pathways. The peptide targeting AMIGO₃ is able to improve clinical signs in a multiple sclerosis model, while the peptides targeting IL-10 receptor were efficient *in vitro* but failed to provide significant therapeutic effect in models of inflammatory and cancer diseases. With these two new examples highlighting the importance of the TM domain, we also performed a systematic analysis of TM domain interactions using a BRET assay. The complete TM domain interactome of the 58 tyrosine kinase receptors and six dependence receptors has been completed. These results pave the way for the design of a tool to understand the interactions between TM domains and thus to design therapeutic peptides targeting any receptor.

Transmembrane domain – AMIGO₃ – IL-10R – Multiple sclerosis – Glioblastoma – RTK – Screening