

# Table des matières

<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>2</b>
<b>TABLE DES FIGURES .....</b>	<b>6</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX.....</b>	<b>10</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>12</b>
<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>14</b>
<b>PRESENTATION DE LA SOCIETE LPS-BIOSCIENCES .....</b>	<b>16</b>
<b>I – INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>17</b>
1) LES ENDOTOXINES ET LES LIPOPOLYSACCHARIDES .....	17
a) <i>Les enveloppes des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif .....</i>	<i>17</i>
b) <i>La découverte des endotoxines et définitions .....</i>	<i>18</i>
c) <i>La structure générale des LPS .....</i>	<i>22</i>
d) <i>La biosynthèse des LPS.....</i>	<i>27</i>
2) LA REPOSE DE L’HOMME AUX LPS .....	33
a) <i>La réponse immunitaire innée aux LPS .....</i>	<i>35</i>
b) <i>L’influence de la structure des LPS sur l’activation du récepteur MD-2:TLR4 .....</i>	<i>40</i>
c) <i>La réponse immunitaire adaptative aux LPS.....</i>	<i>51</i>
d) <i>Les effets des LPS dans l’organisme : activités immuno-modulatrices .....</i>	<i>54</i>
3) LA RECHERCHE ET LES APPLICATIONS THERAPEUTIQUES DES LPS CHEZ L’HOMME.....	60
a) <i>Les méthodes d’extraction et d’étude structurale des LPS.....</i>	<i>60</i>
b) <i>Deux applications immuno-stimulantes des LPS.....</i>	<i>69</i>
<b>II- PRESENTATION DES TRAVAUX DE THESE ET OBJECTIFS .....</b>	<b>80</b>
LES OBJECTIFS DE LA THESE .....	82
<b>III - MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>83</b>
1) APPAREILS .....	83
2) MATERIEL BIOLOGIQUE.....	85

a)	<i>Bactéries</i> .....	85
b)	<i>LPS</i> .....	86
c)	<i>Cellules</i> .....	87
3)	SOLVANTS ET TAMPONS.....	87
a)	<i>Coloration de Gram</i> .....	87
b)	<i>Solvants d'extraction ou de purification des LPS et lipides A</i> .....	88
c)	<i>Chromatographie sur couche mince</i> .....	88
d)	<i>Electrophorèse SDS-PAGE</i> .....	88
4)	METHODES .....	89
a)	<i>Coloration de Gram (Gram 1884)</i> .....	89
b)	<i>Lyse bactérienne pour l'obtention d'échantillons de micro-analyses</i> .....	90
c)	<i>Lyse bactérienne pour l'obtention d'un lysat concentré en LPS : sonication par l'utilisation d'une sonde à ultrasons</i> .....	92
d)	<i>Extraction et purification des LPS</i> .....	93
e)	<i>Analyse structurale des LPS</i> .....	95
f)	<i>Analyse de la pureté des LPS</i> .....	102
g)	<i>Analyse des activités biologiques des LPS</i> .....	104
h)	<i>Analyse en microscopie électronique à transmission (MET)</i> .....	111
	ARTICLE N°1: MICROMETHODS FOR ISOLATION AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF LIPID A, AND POLYSACCHARIDE REGIONS OF BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDES .....	113
	<b>IV- RESULTATS</b> .....	<b>114</b>
	<b>CHAPITRE I : DEVELOPPEMENT DE MICRO-METHODES D'ANALYSE STRUCTURALE A PARTIR DE LYSATS BACTERIENS</b> .....	<b>115</b>
1)	INTRODUCTION ET OBJECTIFS .....	115
2)	ANALYSE DIRECTE DES LPS PAR MS MALDI-TOF A PARTIR DE LYSATS MEMBRANAIRES DE BACTERIES .....	119
a)	<i>Sélection d'une méthode de lyse bactérienne</i> .....	119
b)	<i>Résultats du suivi de la lyse</i> .....	120

3)	ARTICLE N°2: LPS CHARACTERISTICS OBTAINED BY COMPARED INNOVATIVE AND CLASSICAL MASS-SPECTROMETRY	
METHODS	125	
4)	ARTICLE N°3 EN COURS DE PRÉPARATION: MICROMETHODS FOR LIPOPOLYSACCHARIDES STRUCTURAL CHARACTERIZATION APPLIED TO GRAM-NEGATIVE BACTERIAL LYSATES .....	127
a)	<i>Résultats</i> .....	128
b)	<i>Discussion et conclusion</i> .....	135
5)	EXTRAPOLATION : UTILISATION DE LYSAT BACTERIEN POUR L'EXTRACTION DE LPS A PETITE ECHELLE.....	135
6)	DISCUSSION ET CONCLUSION SUR LES DEUX MICRO-METHODES D'ANALYSE .....	137
<b>CHAPITRE II : ETUDE DE LA STRUCTURE DU LIPIDE A ET DES ACTIVITES INFLAMMATOIRES DES LPS D'UNE BACTERIE NON-PATHOGENE : VITREOSCILLA FILIFORMIS..... 140</b>		
1)	INTRODUCTION ET OBJECTIFS .....	140
2)	ARTICLE N°4: STRUCTURAL AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF VITREOSCILLA FILIFORMIS LIPIDS A: USE OF MASS SPECTROMETRY TO HIGHLIGHT STRUCTURAL DISCREPANCIES .....	143
3)	RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	144
a)	<i>Analyse structurale des LPS standards</i> .....	144
b)	<i>Dosages de deux cytokines pro-inflammatoires : TNF-<math>\alpha</math> et IL-6</i> .....	149
c)	<i>Dosages de la production de ROS et de l'activation des caspases 3/7</i> .....	151
4)	DISCUSSION ET CONCLUSION .....	153
<b>CHAPITRE III : DEVELOPPEMENT D'UNE MACRO-METHODE D'EXTRACTION POUR LA PRODUCTION DE LPS A L'ECHELLE INDUSTRIELLE ..... 158</b>		
1)	INTRODUCTION ET OBJECTIFS .....	158
2)	ETAT DES LIEUX DE LA METHODE D'EXTRACTION BREVETEE ACTUELLE .....	160
3)	ETUDE DE L'APPLICATION DU PROCEDE D'EXTRACTION A L'ECHELLE INDUSTRIELLE ET DE SA COMPATIBILITE AVEC LA REGLEMENTATION DES VACCINS .....	161
a)	<i>Compatibilité du procédé</i> .....	161
b)	<i>Compatibilité des solvants utilisés</i> .....	164
c)	<i>Qualité de l'eau</i> .....	166
d)	<i>Locaux et matériel</i> .....	167

4)	APPLICATION ET ADAPTATION A GRANDE ECHELLE DE LA METHODE D'EXTRACTION.....	168
a)	<i>Facteurs limitants pour l'application à grande échelle au laboratoire .....</i>	<i>169</i>
b)	<i>Amélioration de la méthode et résultats : Exemple d'un modèle de LPS compliqué du fait de sa solubilité particulière.....</i>	<i>172</i>
5)	DISCUSSION ET CONCLUSION .....	185
<b>CHAPITRE IV : ETUDE DES ACTIVITES PYROGENES ET IMMUNO-STIMULANTES IN VITRO ET IN VIVO DE LPS MODIFIES CHIMIQUEMENT .....</b>		
<b>189</b>		
1)	INTRODUCTION ET OBJECTIFS .....	189
2)	PLAN DE SCREENING POUR LA VALIDATION PRECLINIQUE DES LPS-MODIFIES.....	195
a)	<i>Choix d'une référence .....</i>	<i>197</i>
b)	<i>Caractérisation physico-chimique.....</i>	<i>198</i>
c)	<i>Etude de la pyrogénicité.....</i>	<i>199</i>
d)	<i>Mécanisme d'action des molécules .....</i>	<i>203</i>
e)	<i>Test d'efficacité : preuve de l'activité adjuvante.....</i>	<i>204</i>
3)	RESULTATS ET COMPARAISON DES ACTIVITES DE DEUX LPS NON-MODIFIES .....	209
a)	<i>Caractérisation physico-chimique.....</i>	<i>209</i>
b)	<i>Etude de la pyrogénicité.....</i>	<i>212</i>
c)	<i>Mécanismes d'action des molécules .....</i>	<i>212</i>
4)	DISCUSSION ET CONCLUSION .....	215
<b>V- CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>		<b>220</b>
<b>VI- PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....</b>		<b>229</b>
PUBLICATIONS :.....		229
COMMUNICATIONS ORALES : .....		229
COMMUNICATIONS PAR AFFICHES : .....		229
<b>VII- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>		<b>230</b>



## ***Table des figures***

Figure 1 : Composition des parois bactériennes.....	17
Figure 2 : Localisation des LPS dans la membrane des bactéries & structure chimique générale.	22
Figure 3 : Structure générale du lipide A. ....	23
Figure 5 : Représentation schématique de la composition du core de différentes bactéries.....	26
Figure 6 : Voie constitutive de la biosynthèse des lipides A d' <i>E. coli</i> K12.....	28
Figure 7 : Assemblage de LPS à partir du complexe core-lipide A et des précurseurs des chaînes-O chez <i>E. coli</i> K12. ....	28
Figure 9 : A) Reconnaissance et transfert séquentiel des LPS par plusieurs acteurs afin d'être présentés à leur récepteur et B) détails de l'interaction LPS :MD-2 :TLR4.....	39
Figure 10 : Liaison du LPS au complexe MD-2:TLR4. ....	41
Figure 11 : Comparaison structurale d'agonistes et d'antagonistes du récepteur MD-2 :TLR4.....	43
Figure 12 : Récepteurs TLRs avec leurs protéines adaptatrices chez l'Homme. ....	46
Figure 13 : Production de ROS par l'activation du TLR4. ....	48
Figure 14 : Voie canonique « classique » de l'inflammasome médiée par les LPS.....	50
Figure 15 : Voies canonique (A) et non-canonique « alternative » (B) de l'inflammasome médiées par les LPS.....	50
Figure 16 : Discrimination des pathogènes par le système immunitaire inné. ....	52
Figure 17 : Orientation Th1 et Th2 de la réponse immunitaire. Par le Pr. Franck Pagès ( <a href="http://www.assim.refer.org">http://www.assim.refer.org</a> ) .....	52
Figure 19 : Balance des activités des LPS entre la réponse contre les pathogènes et le choc septique.....	56
Figure 20 : Avantages de la méthode d'extraction à l'acide isobutyrique/ammonium comparée à la méthode au phénol/eau (propriété LPS-BioSciences).....	62
Figure 21 : Les différents modes d'action des adjuvants de vaccins. ....	72

Figure 22 : Obtention des lysats et des fragments membranaires bactériennes contenant les LPS. .....	90
Figure 23 : Principe du MALDI-TOF en mode linéaire.....	100
Figure 24 : Principe du TOF-SIMS.Détermination de l'état d'agrégation des LPS .....	102
Figure 25 : Protocole d'immunisations et de prélèvements des sera de souris.....	106
Figure 26 : Principe du test ELISA en double-sandwich.....	108
Figure 27 : Principe d'un cytomètre en flux.....	110
Figure 28 : Des bactéries aux applications utilisant des LPS biologiquement actifs.....	114
Figure 29 : Obtention des membranes bactériennes contenant les LPS par choc osmotique et sonication. ....	120
Figure 30 : Suivi des LPS lors des centrifugations post-lyse par gel SDS-PAGE.....	121
Figure 31 : Observation en MET de différentes fractions issues de la lyse par choc osmotique des bactéries <i>B. pertussis</i> .....	123
Figure 32 : Récupération des PS clivés dans le surnageant de centrifugation après hydrolyse (TEA- CA 0,05M) des membranes d' <i>E.coli</i> J5. ....	128
Figure 33 : Structure des cores des LPS de différentes bactéries.....	132
Figure 34 : Analyse par MALDI-MS en mode linéaire négatif des Lipides A et PS obtenus après hydrolyse (TEA-CA 0.5M) des membranes bactériennes d' <i>E. coli</i> J5, de <i>B. pertussis</i> , de <i>B. holmesii</i> et d' <i>E.coli</i> O157:H7. ....	134
Figure 35 : Comparaison de l'extraction des LPS d' <i>E. coli</i> J5 à partir de bactéries entières et de lysat bactérien. ....	136
Figure 36 : Origine des deux lots de LPS de <i>V. filiformis</i> .....	142
Figure 37 : Spectres MALDI-TOF en mode linéaire négatif des lipides A obtenus après hydrolyse TEA-CA des LPS.....	148
Figure 38 : Expériences préliminaires de dosage du TNF- $\alpha$ et de l'IL-6 après stimulation des cellules THP-1 avec les LPS d' <i>E. coli</i> J5.....	150

Figure 39 : Contrôles des mesures en cytométrie en flux de l'induction de ROS.....	152
Figure 40 : A) Activation des caspases 3/7 après 12h, 24h et 48h de stimulation avec les LPS de <i>E. coli</i> J5 ; B) Activation des caspases 3/7 après 3h de stimulation avec du PMA. ....	152
Figure 41 : A) Processus d'extraction des LPS selon la méthode brevetée (Caroff 2004) ; B) méthodes de purification des LPS bruts (Tirsoaga, Novikov, et al. 2007).....	160
Figure 42 : Facteurs limitants associés à l'extraction de LPS à partir de 40 g de bactéries.....	170
Figure 43 : Analyse par gel SDS-PAGE de différentes fractions de l'extraction des LPS d' <i>E. coli</i> O157:H7 à partir de bactéries ou de lysat bactérien. ....	172
Figure 44 : Récupération du lysat bactérien et présence d'un « gel » après les centrifugations. ....	173
Figure 45 : Récapitulatif des extractions et des étapes de purification en milieu aqueux sur A) les bactéries et B) les lysats bactériens et le gel.....	175
Figure 46 : Comparaison sur gel SDS-PAGE des LPS extraits des lysats bactériens, du gel ou des bactéries <i>E. coli</i> :H7 à quantité égale d'échantillon déposé. ....	176
Figure 47 : Spectres de lipides A obtenus par MS MALDI-TOF en mode linéaire des LPS d' <i>E. coli</i> O157:H7.....	177
Figure 48 : Spectre d'absorbance des échantillons extraits et +/- purifiés d' <i>E. coli</i> O157:H7 pour l'estimation de la contamination en acides nucléiques ( $A_{260nm}$ ) et en protéines ( $A_{280nm}$ ).....	179
Figure 49 : Cycle de vie d'un médicament.....	190
Figure 50 : Structure du MPL® commercialisé par GlaxoSmithKline. ....	192
Figure 52 : Spectres de masse MALDI-TOF réalisés en mode linéaire négatif des LPS extraits de deux cultures d' <i>E. coli</i> J5 et non-modifiés chimiquement. ....	210
Figure 53 : Activation du TLR2 dans le système HEK-Blue par les LPS J5 4AG et J5 6AG.....	211
Figure 55 : Activation du TLR4 dans le système HEK-Blue par les LPS J5 4AG et J5 6AG.....	213
Figure 56 : Sécrétion d'IL-6 dans le sang total de trois donneurs stimulé 24h avec les LPS J5 4A et J5 AG.....	214

Figure 57 : Sécrétion d'IFN- $\gamma$  dans le sang total de deux donneurs stimulé à 24h avec les LPS J5

4AG et J5 6AG..... 214



## ***Table des tableaux***

Tableau I : Les TLRs, leurs ligands et leurs localisations. ....	37
Tableau II: Maladies prévenues par les vaccins viraux avant et après vaccination aux Etats-Unis (S. Plotkin). ....	76
Tableau III: Caractéristiques des bactéries dont les LPS ont été utilisés dans ces travaux. ....	85
Tableau IV: Caractéristiques des marqueurs utilisés en cytométrie en flux. ....	111
Tableau V: Différentes méthodes de lyse cellulaire existantes. ....	117
Tableau VI: Avantages et inconvénients des différentes techniques de lyse testées. ....	120
Tableau VII: Principaux référentiels ou textes de lois, et autorités de santé nationales et internationales. ....	163
Tableau VIII : Intervalles des PDE et ppm autorisés en fonction des solvants décrits dans l'ICH-Q3C5 R2. ....	164
Tableau IX : Liste et caractéristiques des solvants utilisés dans notre processus (ICHQ3C (R5) et ICH-PDE for TEA and PDE of MIBK). ....	165
Tableau X: Quantité de LPS bruts obtenus à l'issue des trois extractions. ....	174
Tableau XI: Masses des différentes fractions obtenues après les étapes de purification des LPS bruts. ....	175
Tableau XII: Contamination protéique dans différentes fractions. ....	179
Tableau XIV: Quantité et qualité de LPS à l'issu des manipulations. ....	183
Tableau XV: Temps optimisé alloué à l'extraction sur les lysats bactériens et celles sur les bactéries . ....	184
Tableau XVI: Test d'immunisation prouvant l'activité adjuvante des LPS-modifiés chez les souris avec de l'ovalbumine comme antigène. ....	207
Tableau XVII: Composition de deux vaccins commerciaux contre l'hépatite B : Fendrix® et Engerix®. ....	207
Tableau XVIII: Groupe de souris à immuniser pour le test utilisant un antigène thérapeutique. ....	208



## **Remerciements**

*Après ces trois années, je suis intimement persuadée que cette thèse est le fruit d'un travail d'équipe où chacune des personnes impliquées, à quelque niveau que ce soit, a été indispensable. Les échanges et les interactions avec vous tous, qui m'avez entouré professionnellement ou personnellement, ont ensemble permis l'aboutissement de ces recherches. Merci.*

Premièrement, je tiens à remercier chaleureusement ma directrice de thèse, Martine Caroff, pour m'avoir ouvert les portes de son équipe, pour m'avoir fait découvrir le monde des LPS et pour m'avoir transmis de nombreuses connaissances. Merci pour ton encadrement, ta disponibilité, tes conseils et pour la confiance que tu m'as accordée.

Egalement, je dis un grand merci à Pierre Tissières, co-directeur de thèse, pour son temps, pour nos discussions scientifiques très intéressantes, pour l'apprentissage autour de la cytométrie en flux, pour avoir été à mon écoute et pour les déjeuners bo bun.

Merci à Alexey Novikov pour les enseignements et le savoir-faire qu'il m'a prodigué. J'ai réellement apprécié le travail effectué ensemble, que ce soit du travail à la paillasse ou plutôt celui d'ordre cérébral, il a toujours été très enrichissant.

Merci à Frédéric Caroff, CEO de LPS-BioSciences, de m'avoir accueillie dans la société LPS-BioSciences et intégrée au projet "adjuvant", ainsi que pour l'obtention du financement CIFRE. Merci aussi pour tous les précieux conseils en matière de Power Point.

A mes tuteurs, Jean-Marc Cavaillon et Michael Dubow, ainsi qu'à Jean-Luc Pernodet et Muriel Decraene, votre implication, votre relationnel et votre aide pendant ces trois années m'ont touché. Merci d'avoir suivi mon travail lors des comités de thèse et d'avoir répondu présent lorsque j'en avais besoin.

A tous les membres de l'équipe « Endotoxines : structures et réponse de l'hôte » et de la société LPS-BioSciences, merci pour nos nombreux échanges scientifiques et constructifs, ainsi que pour tous les moments conviviaux partagés. Ce sont ces petits moments passés ensemble qui embellissent quotidiennement la vie au labo.

A tous les collaborateurs avec qui j'ai eu la chance de travailler et particulièrement à J-M. Cavaillon et C. Fitting pour le don des cellules THP-1, merci. Votre contribution et votre investissement ont permis la bonne réalisation de ce travail.

Merci à tous les membres de l'Institut pour leur disponibilité et les événements festifs passés ensemble ainsi qu'à tous les joueurs qui ont participé à la création de l'équipe de basket de l'I2BC ! J'espère qu'elle va perdurer et décrocher la première place aux prochains tournois !

Je souhaiterai aussi remercier plus personnellement des personnes chères et « quelques » amis ...

Premièrement, je pense à Benjamin et Audrey, qui m'ont rassuré et encouragé à faire une thèse. Tout a commencé grâce à eux et suite à nos folles années à Rennes 1 « ton univers impitoyable » ! Dr. Drey, « toi-même tu sais » l'importance de nos retrouvailles pendant ses trois dernières années !

A Marlène, Seb, Mathis, et Romain, toujours présents malgré la distance et le temps, vous comptez beaucoup pour moi. Ce sont nos amitiés qui ont façonné nos réussites !

Ensuite, je n'oublierai pas de remercier « les copains » dont particulièrement Midoux (une pensée pour les soirées du lundi), Coco, Romane, Aurélien, Gautier, Phiphi, Pierre, Julien, Justine et Camille, merci pour nos soirées, nos grands moments sportifs, nos bons repas, et toutes les idées pas forcément très intelligentes que nous avons partagées ces trois dernières années ! Merci aussi à tous les copains parisiens, Nico, Tsioukis, Nina, Célia, Loïc, Jerem et les autres... qui m'ont accueilli les bras grands ouverts, cet accueil me va droit au cœur ! Je pense également à Morgane, David, et Vianney, nos retrouvailles sont toujours des moments agréables !

De plus, je dis merci à l'OC Gif Basket pour ces saisons pleines de rebondissements. Grâce à vous, j'ai pu me défouler et me sentir tout de suite bien en région parisienne, merci les filles, merci coach. Ce sont ces valeurs sportives, et cette envie de se dépasser ensemble qui me rappellent pourquoi j'aime ce sport d'équipe.

En ce qui concerne l'accueil parisien, je remercie généreusement Elisabeth, pour son soutien et son écoute. Je me suis tout de suite sentie « comme à la maison » et « en famille ». Cette bienveillance m'a apporté beaucoup de sérénité. J'en suis extrêmement reconnaissante et je le serai toujours.

Henri, j'aimerais de te dire à quel point ta présence et ton soutien m'ont apporté pendant ces dernières années. Merci d'avoir été si compréhensif, d'avoir supporté mes coups de blues, mes moments de paniques, ... merci de m'avoir rassuré. Surtout, merci pour tous ces moments de bonheur et de rire passés ensemble, et de croire en tous les rêves qu'ils nous restent à réaliser.

Merci à mes sœurs, Anne et Armelle, pour leur important soutien et tous les moments de décompressions partagés. Armelle, l'origine de nos fous rires restera toujours aussi mystérieuse pour les autres et pour la science, mais qu'est-ce qu'ils font du bien ! Aussi, un sincère merci à toute ma famille qui a toujours été présente et avec qui chaque occasion de se revoir est un immense plaisir. Sans vous et votre soutien, ce travail n'aurait pas été possible.

Mes plus grands remerciements s'adressent à mes parents, merci de m'avoir soutenue et encouragée depuis toutes ces années, merci de m'avoir permis de faire les études que je souhaitais, merci de m'avoir toujours fait confiance, et ce, dans tous les domaines. Je vous dédie ce mémoire.



## ***Abréviations***

ABC : ATP Binding Cassette  
AG : Acide Gras  
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché  
BCR : récepteur des cellules B  
C : Carbone  
CCM : Chromatographie sur Couche Mince  
CELD : Test de Cytotoxicité sur les Embryons de Poulets  
CFR : Code of Federal Regulation  
C/M : Chloroforme/Méthanol  
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
CMO : Chloroforme/Méthanol/Eau  
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène  
CpG : Oligodesoxynucléotide composé de Cytosine et de Guanine  
DAMPs : Damages Associated Molecular Patterns (Motifs Moléculaires Associés aux dommages)  
DC : Cellule Dendritique  
DO : Densité Optique  
DMSO : DiMethylSulfOxide  
DNase : DésoxyriboNucléAse  
EA : EthanolAmine  
EC<sub>50</sub> : Concentration Efficace médiane  
FSC : Forward Scatter (lumière diffractée)  
GC : Chromatographie en Phase Gazeuse  
GlcN : Glucosamine  
GPI : GlycoPhosphatidylInositol  
HBsAg : Antigène de surface de l'Hépatite B  
HEK : cellules rénales embryonnaires humaines  
ICH : International Council for Harmonization  
IFN : InterFeroN  
IgG : Immunoglobuline G  
Kdo : 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (acide-3-deoxy-D-manno-octulosonique)  
KeV : KiloelectronVolt  
LAL : Lysat d'Ameboocytes de Limule  
LB : Lysogenic Broth (Bouillon Lysogène)  
LBP : Lipopolysaccharide Binding Protein (Protéine de liaison aux LPS)  
LPS : LipoPolySaccharide  
LPS-R: LPS courts  
LPS-S : LPS longs  
MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time-Of-Flight ( Désorption/Ionisation Laser Assistée par la Matrice – Temps de Vol)  
MET : Microscopie Electronique à Transmission  
MD-2 : Myeloid Differentiation Protein-2 (Protéine de Différenciation Myéloïde-2)  
MPL® : Adjuvant produit par GSK, MonoPhosphoryl Lipide A  
MPLA : MonoPhosphoryl Lipide A  
MS: Spectrométrie de Masse  
MyD88 : Myeloid Differentiation primary response gene 88 (Protéine de Différenciation Myéloïde 88)  
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, forme réduite  
NOD : Nucleotide-binding Oligomerization Domain (Domaine d'Oligomérisation de Nucléotide)

NLRP 3: NOD-Like Receptor Pyrin-domain containing 3  
OMS : Organisation Mondiale de la santé  
O/N : OverNight (toute la nuit)  
Ova : Ovalbumine  
P : Phosphate  
PAGE : Poly Acrylamide Gel Electrophoresis(Electrophorèse sur Gel de Poly Acrylamide)  
PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns (Motifs Moléculaires Associés aux Pathogènes)  
PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne  
PDE : Permitted Daily Exposure (dose d'exposition acceptable quotidienne)  
PEA : PhosphoEthanolAmine  
PK : Protéinase K  
PP : PyroPhosphate  
PPCO : PolyPropylene COpolymer  
PS : PolySaccharide  
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
dsRNA : ARN double brin  
ss RNA : ARN simple brin  
RNase : RiboNucléAse  
ROS : Reactive Oxygen species (Dérivés Réactifs de l'Oxygène)  
RPT : Test de Pyrogénicité chez le Lapin  
SDS : Dodécyl Sulfate de Sodium  
SIRS : Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique  
SSC : Side Scatter (lumière réfléchie et réfractée)  
SVF : Serum de Veau Fœtal  
T.A. : Température Ambiante  
TEA-CA : TriEthylAmine-CitrAte  
TEMED : TetraEthylMéthylèneDiamine  
TLR : Toll-Like-Receptor (Recepteur Toll)  
Th : Lymphocytes T helper (Lymphocytes Auxiliaires)  
TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor alpha  
TRIF : Toll/IL-1 Receptor (TIR)-domain-containing adapter-inducing IFN- $\beta$   
TRAM : TRIF-Related Adaptor Molecule  
TIRAP : MyD88 Adaptor-like Protein  
TSB : Tryptic Soy Borth (Bouillon Tryptone Soja)  
Und-P : Undécaprenylphosphate  
USP : Pharmacopée Américaine  
Vf : *Vitreoscilla filiformis*

## ***Présentation de la société LPS-BioSciences***

La société LPS-BioSciences a été créée le 25 novembre 2011 par le Dr. Martine Caroff et le Dr. Jean-Marc Cavaillon. Elle est propriétaire d'une licence d'exploitation exclusive de méthode d'extraction innovante des lipopolysaccharides (LPS) développée par Martine Caroff et brevetée par l'Université Paris-Sud. PME Innovante en biotechnologies, LPS-BioSciences est spécialiste des endotoxines bactériennes et concepteur de vaccins.

La société a deux activités, une activité de recherche sous contrat pour des grandes sociétés de l'industrie des vaccins, du diagnostic et de la cosmétique ainsi qu'une propre activité de R&D pour le développement de produits innovants.

Les prestations de recherche réalisées pour l'industrie répondent à trois types de demandes : production, analytique et élimination. La société produit à la demande des LPS de n'importe quelles souches bactériennes à Gram négatif au niveau de qualité souhaité. La société utilise la spectrométrie de masse MALDI-TOF ou la RMN pour réaliser des caractérisations structurales fines de LPS. La société accompagne les industriels pour le dosage ou l'élimination des endotoxines en tant que contaminants pyrogènes dans un produit pharmaceutique.

Côté R&D, la société participe à des projets collaboratifs comme le projet de recherche BactiDIAG avec la société Biorad et le CEA Irti visant à développer un test rapide de détection du sepsis. La société a aussi un projet de recherche propre, elle développe depuis 2012 une plateforme de production d'endotoxines détoxifiées qui vise à fournir aux grands acteurs de l'industrie pharmaceutique, des adjuvants et antigènes innovants, permettant de décupler l'efficacité des vaccins. C'est dans le cadre de ce projet de la société LPS-BioSciences, que la réalisation de cette thèse CIFRE a eu lieu, en collaboration avec le laboratoire académique de l'I2BC « Endotoxines : structures et activités ».

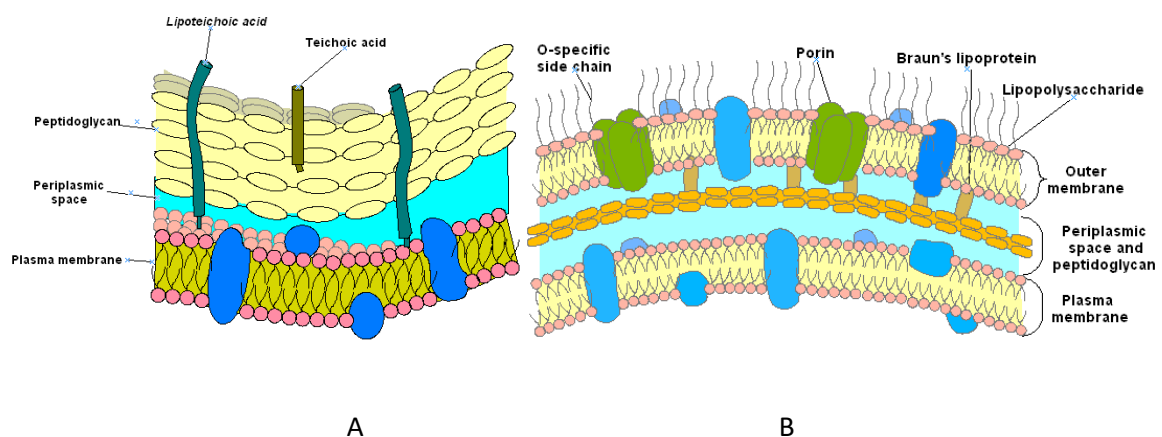
# I – Introduction générale

Les endotoxines d'origine bactérienne sont caractérisées chimiquement comme des lipopolysaccharides, ou LPS. Cette introduction a pour but de rappeler les généralités concernant la découverte, la localisation, la biosynthèse, la structure, et les activités des LPS ainsi que leurs applications.

## 1) Les endotoxines et les lipopolysaccharides

### a) Les enveloppes des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif

Les bactéries peuvent être classées en deux groupes en fonction de leur réaction à la coloration de Gram. Cette méthode a été mise au point en 1884 par le bactériologiste danois Hans Christian Gram (Gram 1884). En fonction de la rétention ou non d'un colorant par les bactéries, elles sont respectivement classées en bactéries à Gram positif ou bactéries à Gram négatif. Cette différence est due à la composition de leur paroi bactérienne (Figure 1).



**Figure 1 : Composition des parois bactériennes.**

A) bactérie à Gram positif ; B) bactérie à Gram négatif.  
(www.ebiologie.fr).

L'enveloppe d'une bactérie à Gram positif est constituée d'une épaisse couche de peptidoglycane, un polymère composé de *N*-acétylglucosamine et d'acide *N*-acétylmuraminique

reliés entre eux par des chaînes peptidiques. Cette couche de peptidoglycane est située du côté externe de la bicouche lipidique définissant la membrane des bactéries. Elles sont donc aussi appelées bactéries unimembranées. Ce constituant donne sa forme à la bactérie et la protège contre des agressions mécaniques, physiques et immunologiques (protection contre la lyse osmotique et rôle dans l'activation du complément par exemple). Il peut aussi être la cible d'antibiotiques, comme la pénicilline, qui inhibent une de ses étapes de biosynthèse. Des acides teïchoïques et lipoteïchoïques s'enchaînent dans le peptidoglycane et affleurent côté externe pour garantir son maintien en plus des propriétés antigéniques qu'ils confèrent à la bactérie.

Pour les bactéries à Gram négatif, aussi dénommées bactéries bimembranées, le peptidoglycane ne représente qu'une mince couche et il est surmonté d'une bicouche lipidique appelée membrane externe. Cette membrane externe contient des protéines telles que des porines, qui participent au transport protéique. Elle est constituée de phospholipides côté interne et principalement de lipopolysaccharides (LPS) côté externe. Un large espace périplasmique est défini entre la membrane externe et la membrane interne et assure un rôle de stockage d'enzymes et de nutriments en plus d'être le site de la synthèse de certains constituants bactériens. Les LPS, côté externe de la membrane externe, ont des rôles antigéniques grâce à ses sucres et des rôles pathogéniques en initiant l'inflammation lors d'une infection.

### ***b) La découverte des endotoxines et définitions***

La découverte des endotoxines date de 1856. Le physiologiste danois Peter Ludvig Panum, montra qu'un « poison putride » menait à des infections. Il a été le premier à émettre que ce poison pouvait être un produit d'origine bactérienne (Kolmos 2006). En 1862, Theodor Billroth employa pour la première fois le terme « substance pyrogène » en décrivant sa présence dans des produits putrides liquides ou desséchés et dans du pus frais (Billroth 1862).

En 1888, le microbiologiste russe Nicolai Gamaleia mit en exergue que des bactéries mortes et injectées chez le lapin induisaient de la fièvre (Duclaux 1888). S'ensuivit la découverte de Marc

Armand Ruffer, bactériologiste français, qui exposa en 1889, que les surnageants de culture, sans bactéries vivantes ou mortes, induisaient également de la fièvre chez les lapins injectés (Cavaillon 2009).

A la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, le chirurgien et chercheur spécialiste des cancers William Coley, développa des mélanges de bactéries mortes pour soigner certains cancers, comme le sarcome, et observa la régression des tumeurs (Coley 1910). Il fut démontré plus tard que c'est l'activation du système immunitaire contre les bactéries injectées (notamment *via* leurs endotoxines) qui aboutissait à la sécrétion de molécules aux propriétés anti-tumorales. Ces travaux ont mené à la découverte du Tumor-Necrosis-Factor-alpha ou TNF- $\alpha$ . En même temps, Hans Buchner, souligna que l'injection d'extraits bactériens à des animaux engendrait une augmentation importante du nombre de globules blancs. Il décrit ce phénomène comme une « réaction d'alarme » faisant suite à l'activation des mécanismes de défense de l'hôte contre l'infection (Buchner 1890). Les travaux de ces deux scientifiques ont été les premiers sur la protection non-spécifique pouvant être conférée par les bactéries.

Le concept d'endotoxine apparût en 1892 grâce aux travaux du bactériologiste et physicien allemand Richard Pfeiffer qui travaillait avec Robert Koch à Berlin. Il émit l'hypothèse que les propriétés toxiques des bactéries *Vibrio* étaient dues à un facteur conservé et libéré lors de leur lyse (Pfeiffer 1892). Il nomma alors ce facteur « endotoxine » par opposition aux exotoxines protéiques secrétées dans le milieu extérieur par les bactéries. Un an après, le pathologiste italien Eugenio Centanni montra que la pyrogénicité est indissociable de l'endotoxine (Centanni & Bruschetti 1894).

Le bactériologiste italien Giuseppe Sanarelli, en 1894, fut le premier à mentionner ce qui a été appelé en 1928 la réaction de Sanarelli-Shwartzman, c'est-à-dire l'apparition de lésions, nécroses, et thromboses dans les tissus touchés par des infections par des bactéries à Gram négatif (Szentivanyi et al. 1986). Ces effets sont dus aux productions excessives de cytokines déclenchées par les endotoxines des bactéries infectieuses.

En 1906, le médecin et biologiste français Alexandre Besredka fut le premier à démontrer une protection contre l'injection d'endotoxines de la fièvre typhoïde chez un cobaye (Cavaillon 2009). Le cobaye a reçu une injection de serum de cheval, mais ce cheval avait lui-même été préalablement injecté par voie intraveineuse avec des germes vivants de *Salmonella enterica Typhi*. Cette protection est le résultat de la présence d'anticorps anti-endotoxines dans le serum du cheval permettant la protection du cobaye.

Dans les années 1915, les travaux des chercheurs Edmund Weil et Arthur Felix permirent d'élucider, par agglutination, la réactivité croisée de différents anticorps sur des bactéries *Rickettsia* et *Proteus* de sérotypes différents (Cruickshank 1927). Ces bactéries sont agglutinées lors de leur contact avec des sera prélevés de personnes malades de la fièvre typhoïde. C'est en fait, l'antigène-O des endotoxines à la surface des bactéries qui en est responsable. Dans les années 1930, le bactériologiste allemand Fritz Kauffmann classa les salmonelles en fonction de la variation de leur antigène-O en 44 sérotypes (Grimont & Weill 2007).

Jusqu'en 1933, malgré une meilleure compréhension de ce qu'était une endotoxine en tant que molécule, aucune extraction d'endotoxines n'avait encore été conciliante, et ce sont les chercheurs André Boivin et Lydia Mesrobian qui effectuèrent en premier une extraction des endotoxines *via* une technique à l'acide trichloracétique. L'obtention d'un extrait contaminé en protéines leur a permis de réaliser les premières analyses des endotoxines. Ils les qualifièrent « d'antigènes glucido-lipidiques » (Cavaillon 2009).

Ce n'est qu'en 1943 que le terme de **lipopolysaccharides (LPS)** fut employé pour la première fois par l'équipe du biochimiste Murray Shear en purifiant et en analysant chimiquement les endotoxines de *Serratia marcescens* (Hartwell & Shear 1943).

Au début des années 50, la méthode d'extraction au phénol/eau des LPS sans protéine fut publiée par Westphal et Lüderitz (Westphal et al. 1952). Vingt ans plus tard, ils décrivent la

structure de la partie lipidique et ils identifèrent son rôle primordial en termes d'activités biologiques (Galanos et al. 1972).

En 1964, avec les progrès de la microscopie électronique, Bladen et Mergenhagen observèrent la structure de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif et associèrent la membrane externe à l'activité endotoxinique (Bladen & Mergenhagen 1964). En 1972, il fut démontré, par Mary Jane Osborn, que les LPS étaient biosynthétisés au niveau de la membrane interne mais localisés dans la membrane externe des bactéries (Osborn et al. 1972). En 1975, Mulhradt démontra l'asymétrie de la membrane externe en localisant les LPS du côté extracellulaire (Mulhradt & Golecki 1975). Au cours de ces années, les LPS étaient considérés comme des polymères de haut poids moléculaire liés par des liaisons phosphodiester. Ce n'est qu'en 1983 que Strain proposa des structures monomériques de LPS (Strain et al. 1983).

Dès lors, à partir des années 1980, la composition et la structure générale étaient connues ainsi que certaines méthodes d'extraction des LPS.

En 2015, les endotoxines ont été définies, par l'U.S. National Library of Medicine, comme étant « des toxines d'origine interne, et plus spécifiquement une substance toxique présente chez les bactéries (comme l'agent causant la fièvre typhoïde par exemple) mais séparable de la cellule seulement lors de sa désintégration ». Elles sont aussi libérées lors de la division bactérienne ou au sein des vésicules secrétées (ou blebs).

Afin de lever toute ambiguïté sur les termes endotoxines et LPS voici une définition :

Les LPS sont tous d'un point de vue structural composés d'une partie lipidique et d'une partie osidique ; mais tous les LPS n'ont pas forcément d'effets biologiques néfastes et ne sont pas par définition des endotoxines.

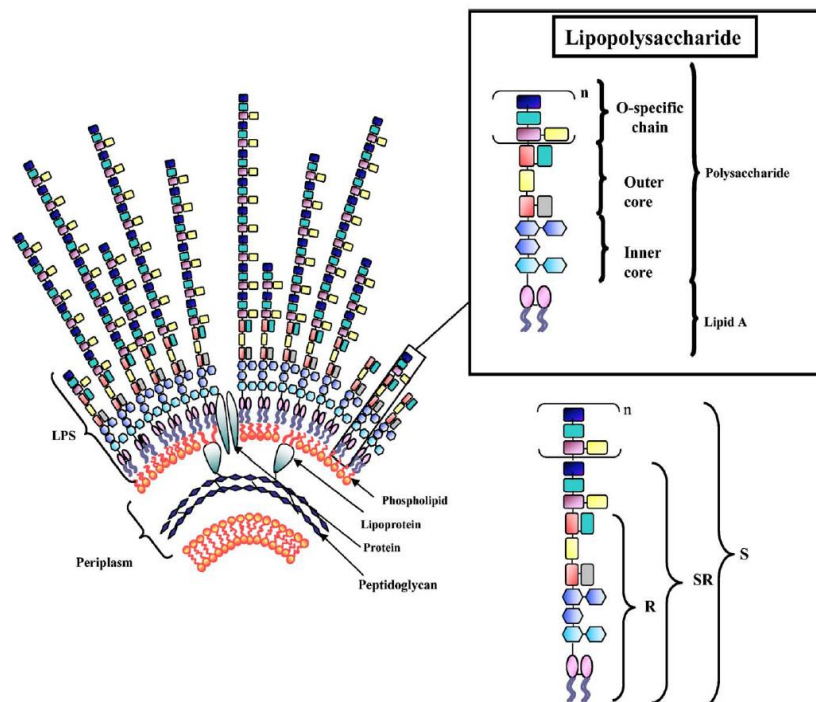


### c) La structure générale des LPS

La connaissance des structures des LPS est un élément clé pour la compréhension de leurs activités. En effet, les activités des LPS sont, entre autres, définies et modulées par leurs structures.

#### Les LPS

Les LPS sont des molécules composées de deux parties bien distinctes. Une première partie lipidique, ancrée dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif, et une seconde partie osidique, dirigée vers le milieu extérieur. La partie lipidique est appelée le lipide A. La partie osidique se scinde entre une partie nommée « core » et une autre partie appelée « chaîne-O » ou « antigène-O ». Il existe trois types de LPS : les smooth (S-LPS), les rough (R-LPS) et les semi-rough (SR-LPS) (Figure 2). Ces appellations ont été déterminées par l'aspect des colonies formées sur les boîtes de petri lors de leur culture (smooth = lisse ; rough = rugueux). Les LPS sont maintenus entre eux dans le feuillet externe de la membrane externe par interactions électrostatiques où les charges négatives des lipides A interagissent avec des cations divalents ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ). Les LPS sont les premiers éléments bactériens en contact avec le milieu extérieur.

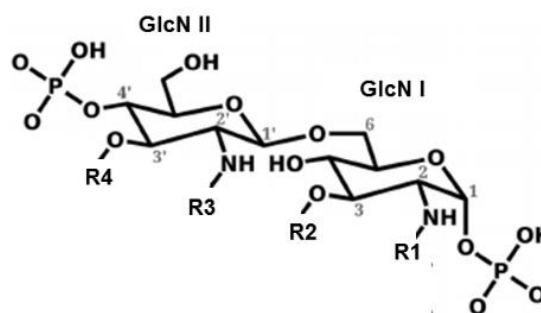


**Figure 2 : Localisation des LPS dans la membrane des bactéries & structure chimique générale.** (Caroff & Karibian 2003).

Les LPS smooth, ou LPS longs, possèdent les régions lipide A, core et chaîne-O. Les chaînes-O comportent de nombreuses répétitions d'unités de sucres, donnant de ce fait un aspect lisse aux colonies sur les boîtes de petri (hydrophilie). Les LPS rough, ou LPS courts, possèdent seulement les parties lipide A et core, et donne un aspect rugueux aux colonies sur boîte de petri (hydrophobicité). Les LPS semi-rough sont des LPS courts ne comportant qu'une seule unité de sucres de la chaîne-O. Il est important de savoir que les LPS sont caractéristiques d'une espèce bactérienne. En effet, chaque bactérie possède sa propre signature de LPS, comme chaque être humain possède sa propre empreinte digitale.

### ***La région lipide A***

La partie lipidique, ou lipide A, est constituée d'un disaccharide. Il s'agit le plus souvent de deux D-glucosamines liées en  $\beta$ -(1-6) : la glucosamine I (GlcN I) et la glucosamine II (GlcN II). Cependant, d'autres disaccharides ont été identifiés comme par exemple des amino-gluconolactones pour *Rhizobium* (Jeyaretnam et al. 2002) ou des 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-glucopyranose pour *Campylobacter jejuni* et *Leptospira interrogans* (Moran et al. 1991; Sweet et al. 2004) . Les fonctions alcool sur les carbones en C3 et C3' et les fonctions amine sur les carbones en C2 et C2' de ces GlcN sont substituées par un nombre variable d'acides gras (habituellement de 4 à 7) par le biais de liaisons ester et amide (Figure 3 et Figure 4). Certains acides gras primaires peuvent être eux-mêmes estérifiés par des acides gras secondaires.



**Figure 3 : Structure générale du lipide A.**

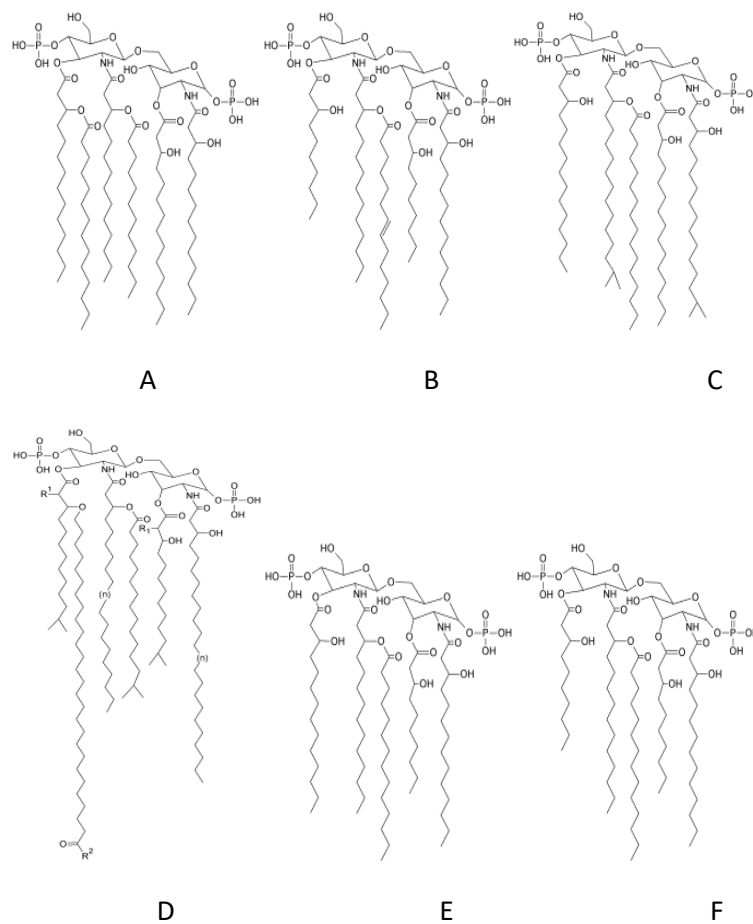
Dans la plupart des cas, le disaccharide est substitué au niveau des carbones C1 et C4' par des groupements phosphate. Parfois, d'autres substituants comme des amino-desoxy-sucres ou des phosphatethanolamines (PEA), sont présents et substituent ces phosphates. Les variations :

de longueur, position, et nombre d'acides gras ;

de présence ou d'absence de certains substituants sur le disaccharide ;

sont directement responsables des propriétés dites toxiques des lipides A.

Les lipides A sont très hétérogènes d'une bactérie à l'autre comme illustré dans la Figure 4.



**Figure 4 : Hétérogénéité des structures des lipides A : exemple de cinq bactéries.**

A) *Escherichia coli* ; B) *Rhodospseudomonas sphaeroides* (Takayama et al. 1989); C) *Porphyromonas gingivalis* (Reife et al. 2006); D) *Legionella pneumophila* avec  $n=16-18$   $R_1=H$  ou  $OH$ ,  $R_2=H$  ou  $OH$  ou  $CH_3$  (Girard et al. 2003); E) *Bordetella pertussis* 1414 et F) *Bordetella pertussis* 18-323 (Marr, Novikov, et al. 2010).

## ***La région polysaccharide (PS)***

La partie osidique (PS) se divise en trois sous-parties : le core interne, le core externe et les chaînes-O.

- Le core interne, présent dans tous les LPS, est relié au lipide A sur le carbone C6' du deuxième ose composant le disaccharide (généralement la GlcN II). Ses premiers sucres, composés de 8 carbones, sont des acides 3-deoxy-D-manno-octulosonique, aussi appelés Kdo. Généralement les cores en contiennent un ou deux directement liés à la GlcN II. Le core interne est aussi constitué de quelques sucres à 7 carbones (heptoses) dont l'enchaînement et la composition varient en fonction des espèces. Les Kdo et les heptoses sont fréquemment présents et ils peuvent être phosphorylés ou substitués par d'autres sucres mais aussi par des acides aminés dans certains cas.
- Le core externe est composé de sucres à 6 ou 7 carbones et de substitutions de même type que le core interne (Figure 5).
- Les chaînes-O, qui correspondent à un enchaînement d'unités répétitives de sucres, peuvent substituer le core. Ces unités oligosaccharidiques comprennent de 1 à 8 sucres, de nature variée en fonction des LPS, et peuvent être répétées jusqu'à 50 fois. La partie polysaccharidique est utilisée afin de classer certaines bactéries en différents sérotypes.

Enfin, il est important de souligner que les structures des LPS sont très variables d'une bactérie à l'autre (Figure 4 et Figure 5). Elles varient également au sein de l'enveloppe de la même bactérie en réponse à des changements environnementaux où selon l'état de la biosynthèse. Ces variations concernent le nombre d'acides gras sur le lipide A et leur longueur, la présence de substituant sur le disaccharide comme par exemple l'absence ou la présence de groupements phosphate (P), pyrophosphate (PP), éthanolamine (EA), acétate, ou d'autres sucres aminés ou non (arabinose, glucose). Le nombre d'unités répétitives de la chaîne-O est aussi variable au sein des LPS d'une même



#### ***d) La biosynthèse des LPS***

Les LPS sont essentiels pour la survie des bactéries à Gram négatif dans l'environnement, sauf exceptions démontrées pour les bactéries *Neisseria meningitidis* et *Moraxella catarrhalis*. Ces exceptions ne sont pas naturelles, elles ont été produites par mutation génétique et la croissance de ces souches est délicate (Peng et al. 2005; Maeshima & Fernandez 2013). Les étapes de biosynthèse des LPS sont entièrement décrites pour les LPS d'*E. coli* et de *S. enterica Typhimurium* (Raetz & Whitfield 2002). La biosynthèse des LPS est un processus extrêmement conservé bien qu'il existe une grande diversité de structures. Différents mécanismes sont responsables de cette variabilité entre les espèces.

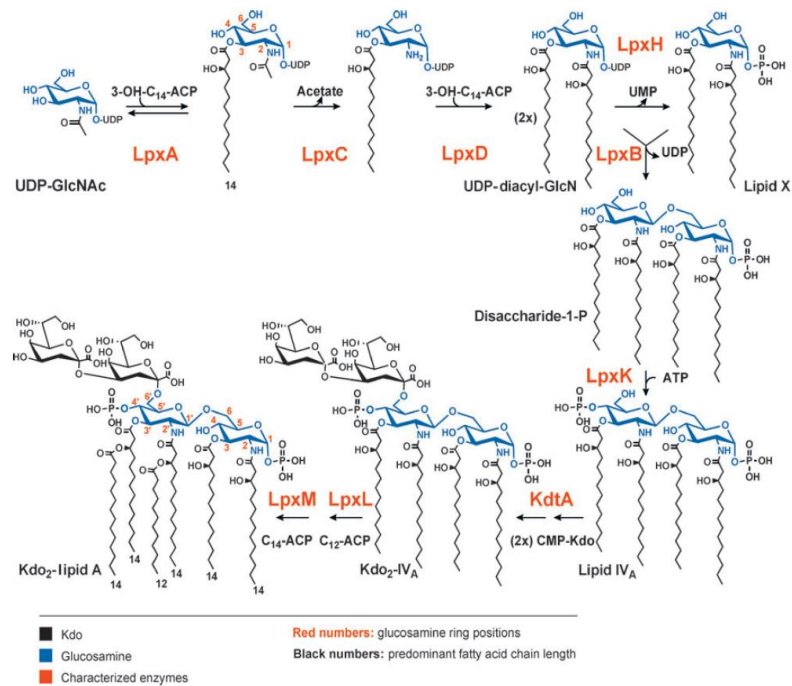
Les étapes de ce processus sont dirigées par des enzymes (Figure 6) exprimées, soit de manière constitutive, soit en réponse à des stimuli extérieurs. La modulation de l'expression de certaines enzymes de la biosynthèse, et donc de la structure des molécules de LPS synthétisées, permettent une adaptation constante des bactéries. Ces dernières peuvent ainsi échapper à la reconnaissance du système immunitaire, se protéger de changements environnementaux, ou garantir leur croissance bactérienne (Ciornei et al. 2010; Richards et al. 2010).

De plus, durant l'évolution, des duplications ou des pertes partielles voire complètes de gènes codant pour certaines enzymes de biosynthèse du fragment Kdo-lipide A sont apparues de multiples fois (Opiyo et al. 2010). Chaque bactérie y a gardé un avantage afin de survivre, de garantir sa croissance ou de se protéger des défenses immunitaires.

Globalement, les composants des LPS (core, lipide A, chaîne-O) sont synthétisés dans le feuillet interne de la membrane interne puis sont transférés de façon unidirectionnelle vers la membrane externe par des transporteurs et des flippases.

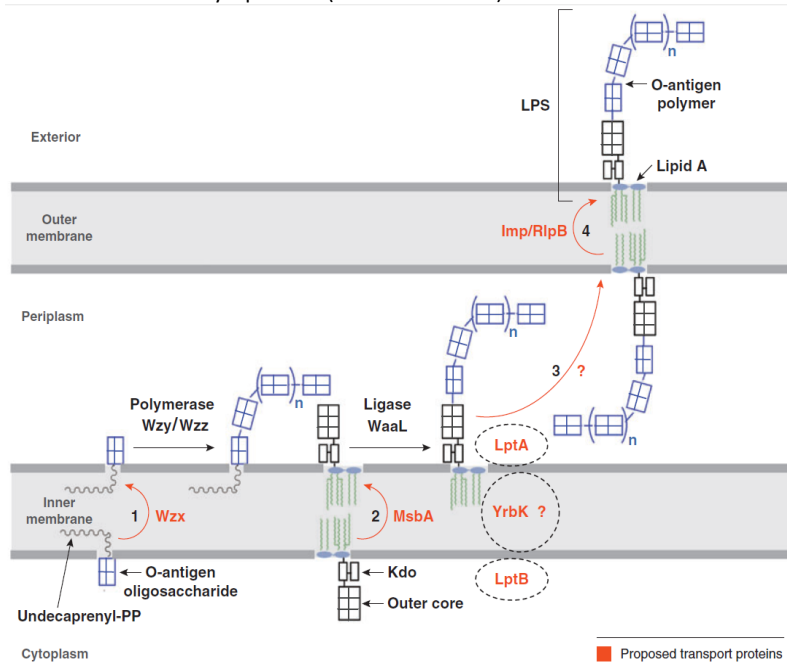
Le lipide A et le core sont liés dans le feuillet interne de la membrane interne puis sont transloqués vers la membrane externe pour former les LPS courts. Les chaînes-O sont indépendamment acheminées du feuillet interne de la membrane interne vers le feuillet externe de la membrane interne où elles sont assemblées avec les molécules « lipide A-core » déjà formées.

Chaque étape de biosynthèse est gouvernée par une enzyme spécifique (Figure 7). A la fin du processus les molécules entières de LPS sont produites.



**Figure 6 : Voie constitutive de la biosynthèse des lipides A d'*E. coli* K12.**

Chaque enzyme est codée par un seul gène. LpxA, -C, et -D sont solubles dans le cytoplasme, LpxH and -B sont des protéines périphériques membranaires. Les enzymes finissant le processus à partir de LPxK sont intégrées dans la membrane interne avec un site actif côté cytoplasme. (Raetz et al. 2007).



**Figure 7 : Assemblage de LPS à partir du complexe core-lipide A et des précurseurs des chaînes-O chez *E. coli* K12.**

Le transporteur ABC MsbA flippe le complexe core-lipide A nouvellement synthétisé à la surface externe de la membrane interne. L'antigène-P est assemblé séparément sur l'undecaprenyl diphosphate et il est transloqué par le transporteur putatif Wzx. Les antigènes-O sont polymérisés à la surface périplasmique de la membrane interne par Wzy and Wzz puis transférés sur le core par WaaL. Le complexe Imp/RlpB est essentiel pour l'assemblage du LPS dans le feuillet externe de la membrane interne. (Raetz et al. 2007).

## ***Le lipide A***

La synthèse du lipide A d'*E. coli* nécessite 9 enzymes. Lors de la biosynthèse du lipide A, les acides gras sont ajoutés sur le disaccharide de GlcN par des acyltransférases précoces et tardives. Ces enzymes ont des séquences d'acides aminés très proches d'un genre bactérien à l'autre, mais des petites variations de séquences, comme le changement d'un seul ou de quelques acides aminés, influent grandement sur leur spécificité pour leur substrat. Certaines bactéries ne possèdent pas de façon constitutive un lipide A à 6 acides gras. Elles peuvent exprimer des enzymes qui catalysent l'ajout d'acides gras ou qui dé-acylent les lipides A, ou alors elles ne possèdent pas certaines acyltransférases comme *Chlamydia trachomatis* (Sweet et al. 2001; Wang & Quinn 2010). Par exemple, l'enzyme *LpxA* d'*E. coli* K12 privilégie l'incorporation d'un 14:0(3-OH) alors que pour *P. aeruginosa* c'est un 10:0(3-OH) pour *N. meningitis* un 12:0(3-OH), et pour *Leptospira interrogans* c'est un 12:0(3-OH) (Raetz et al. 2007). Chez *Rhizobium elti*, *R. leguminosarum* et *Sinorhizobium meliloti*, l'enzyme *LpxXL*, catalyse l'ajout atypique d'un acide gras à 28C. Un autre exemple est celui de la biosynthèse du lipide A de *Yersinia pestis* dont le laboratoire a décrit la première structure (Karibian et al. 1999). A 21-27°C le lipide A comporte 6 acides gras, mais à 37°C le lipide A synthétisé ne comporte plus que 4 acides gras. Les acyltransférases ajoutant les deux acides gras concernés sont sous-régulées à 37°C (Trent et al. 2006). Ainsi la forme à 4 acides gras a été sélectionnée car les bactéries portant ces LPS échappent à la reconnaissance par le système immunitaire de l'homme.

Les lipides A, peuvent aussi subir des modifications enzymatiques après leur biosynthèse, appelées modifications post-traductionnelles, ce qui va amplifier leur hétérogénéité. Les modifications peuvent avoir lieu dans la région hydrophobe (acides gras) et la région hydrophile (disaccharide) du lipide A (Wang & Quinn 2010).

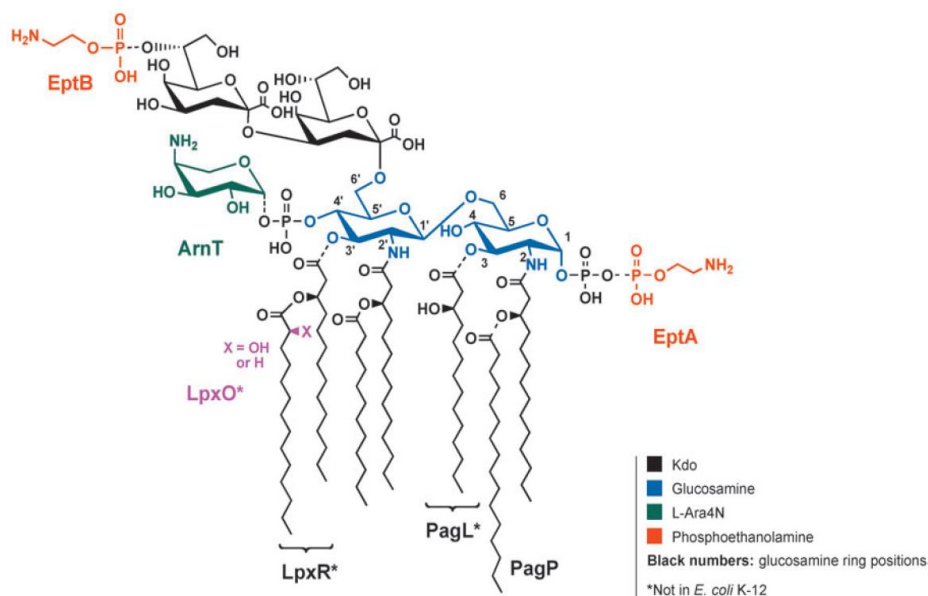
Un des exemples importants est celui des acides gras de type palmitate qui peuvent être ajoutés par le système *PagP/PagL* dépendant du facteur de transcription *PhoP* du système PhoP/PhoQ (K. Kawasaki et al. 2004). L'activation du système PhoP/PhoQ peut être stimulée par un pH acide, par



des peptides antimicrobiens ou par une concentration réduite en  $Mg^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$  dans le milieu. *PagP* est une palmitoyl transférase de la membrane externe, elle transfère et estérifie un palmitate (16 :0) en l'extrayant des phospholipides et en l'ajoutant sur l'acide gras en C2 des LPS. *PagL* est une lipase, aussi localisée dans la membrane externe, qui clive l'acide gras lié en C3. Ces enzymes sont exprimées chez les salmonelles, et certaines bordetelles (comme *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*) mais pas chez *B. pertussis*. Des souches génétiquement modifiées de *B. pertussis* possédant le gène *PagL* de *B. bronchiseptica* ont été construites dans le but de détoxifier les LPS de *B. pertussis*. En effet, cette enzyme clive un acide gras et les lipides A sont donc constitués de 4 au lieu de 5 acides gras. Ils sont ainsi moins toxiques mais permettent tout de même la clairance bactérienne lors d'une infection. Cette stratégie a pour but de développer un vaccin coquelucheux amélioré (Geurtsen et al. 2007).

*LpxR*, une autre enzyme présente chez les Salmonelles aussi située dans la membrane externe, clive l'acide gras en C3' en présence d'ions  $Ca^{2+}$ . Cette enzyme est aussi retrouvée dans de nombreuses bactéries à gram négatif comme *E. coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* et *Vibrio cholerae*.

Enfin *LpxO*, est une enzyme de la membrane interne capable d'hydroxyler l'acide gras secondaire porté par le C3' (Figure 8). *LpxR* et *LpxO* ne sont pas régulées par le système PhoP/PhoQ.



**Figure 8 : Modifications tardives du lipide A de *Salmonella Typhimurium*.**  
(Raetz et al. 2007).

Les phosphates des lipides A sont aussi la cible de modifications. Le système régulateur de transcription PmrA/PmrB régule les enzymes impliquées dans ces modifications. Ce système peut lui-même être activé par le système Phop/PhoQ mais aussi par de fortes concentrations en  $Fe^{3+}$ ,  $Al^{3+}$ , et un pH faible. L'activation de ce système conduit à l'expression d'enzymes comme *EptA* ou *ArnT*.

Plusieurs espèces bactériennes comme *E. coli* et *S. Typhimurium*, *Helicobacter pylori*, *V. cholerae*, *Nisseria meningitidis* et *Nisseria gonorrhoeae* peuvent être substitués par des phosphoéthanolamines (PEA) ajoutées par l'enzyme *EptA*. Des résidus amino-desoxy-arabinose (L-Ara4N) peuvent aussi être ajoutés par l'enzyme *ArnT* chez de multiples espèces (*E. coli*, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Shigella flexneri*, *Burkholderia cepacia*, *Y. enterocolitica*, *Y. pestis*, *Klebsiella pneumoniae*). Les résidus L-Ara4N aident les bactéries à résister aux peptides antimicrobiens. Ces modifications dépendent de l'activation constitutive ou de la réponse à un milieu légèrement acide du facteur de transcription *PmrA* (Trent et al. 2006). Un orthologue de cette enzyme *ArnT*, nommé *PmrK*, est aussi responsable de l'ajout de GlcN sur les phosphates de Bordetelles comme démontré dans l'équipe (Marr et al. 2008). L'enzyme membranaire *LmtA* chez *L. interrogans* ajoute un méthyl sur le phosphate 1 du lipide A (Boon Hinckley et al. 2005).

Globalement, toutes ces variations post-traductionnelles sont le fait d'activation d'enzymes en réponse à des stimuli extérieurs (variation de température, changement de milieu de culture, différence dans l'environnement). Ces modifications effectuées en réponse à l'environnement altèrent la reconnaissance des LPS par leur récepteur.

Pour finir, cette synthèse du lipide A se termine par l'ajout, *via* deux Kdo-transférases, de deux résidus de Kdo sur la glucosamine non-réductrice du disaccharide portant les acides gras. Chez certaines espèces bactériennes d'autres sucres ont été observés à la place des Kdo comme des Ko (acide D-glycero-D-talo-oct-2-ulosonique) chez *Acinetobacter haemolyticus* par exemple (Vinogradov et al. 1997). Chez les *Bordetelles* un seul Kdo est ajouté, mais il est substitué par un groupement phosphate pour équilibrer les charges (Isobe et al. 1999; Caroff et al. 1994).

## ***Le core***

Pour ce qui est du core, des glycosyltransférases membranaires utilisent comme substrats des nucléotides-sucre afin d'assembler le noyau oligosaccharidique au niveau de la face cytoplasmique de la membrane interne. La base est constituée de 6 sucres linéaires mais d'autres sucres peuvent être ramifiés. Communément, les sucres trouvés sont des Kdo, des heptoses, des glucoses et des galactoses. Le sucre terminal est l'accepteur de la chaîne-O. Le core et le lipide A sont reliés côté interne de la membrane interne par des glycosyltransférases et subissent un flip-flop côté périplasmique. Différentes modifications affectent ces structures. Des groupements tels que des phosphates, PEA, et résidus glycosidiques, peuvent s'y substituer.

## ***Les chaînes-O***

Elles sont synthétisées indépendamment et parallèlement au fragment lipide A-core dans la membrane interne. Cette synthèse peut être découpée en plusieurs étapes.

- Les sucres sont synthétisés sous forme de nucléotides-sucre dans le cytoplasme.
- Chacun de ces nucléotides-sucre phosphorylés est transféré sur un lipide porteur. Il s'agit de l'undécaprenylphosphate (Und-P) présent dans la membrane interne. La synthèse des chaînes-O peut alors commencer.
- Le premier sucre est transféré *via* une transférase initiatrice reconnaissant l'Und-P pour créer une liaison pyrophosphate (PP).
- Les sucres suivants sont transférés par des transférases reconnaissant des sucres et ils sont reliés par des liaisons osidiques.
- Enfin, les complexes Und-P-P-sucre sont exportés vers le périplasme où a lieu la polymérisation. Plusieurs voies de biosynthèse sont identifiées (Raetz & Whitfield 2002; Knirel & Valvano 2011). Les chaînes-O sont liées au core-lipide A dans le périplasme pour être exportés ensemble vers le feuillet interne de la membrane externe.

Les LPS ont donc des structures complexes et hétérogènes variant d'une bactérie à l'autre. C'est pourquoi ils sont reconnus différemment et ont des effets variables sur l'organisme.

## ***2) La réponse de l'homme aux LPS***

Les procaryotes sont apparus il y a près de 4 milliards d'années (Bell et al. 2015). La théorie endosymbiotique de Lynn Margulis propose que les cellules eucaryotes actuelles auraient ensuite été formées par endocytose de protéobactéries. Ces protéobactéries auraient donné les mitochondries permettant la respiration cellulaire (Sagan 1967). Les premiers mammifères sont apparus il y a 160 millions d'années. Quant aux hominidés, ils existent seulement depuis 7 millions d'années. Les mammifères et les hommes ont donc dû s'adapter et évoluer avec les bactéries déjà présentes. Les bactéries apportent de nombreux bénéfices indispensables à la survie des hommes. Elles sont présentes en très grand nombre dans les muqueuses et sur la peau. A titre d'exemple, les bactéries commensales du microbiote intestinal aident à l'absorption de nutriments. Elles peuvent aussi synthétiser des vitamines, et lutter contre la prolifération de bactéries potentiellement dangereuses.

Toutefois, l'homme est également entouré de pathogènes (virus, bactéries, champignons, parasites) qui au cours de l'évolution ont exercé une pression de sélection et ont conduit à la diversité et à la complémentarité des réponses immunitaires. Les bactéries pathogènes, pour un organisme, ont été sélectionnées en fonction de leur équilibre avec les autres espèces bactériennes, mais aussi pour leur résistance aux mécanismes de défenses immunitaires des organismes infectés.

Les LPS sont parmi les facteurs de virulence les plus puissants chez les eucaryotes (Alexander & Rietschel 2001; Raetz & Whitfield 2002; Silipo et al. 2009) et pour appréhender leurs activités, il faut connaître leurs structures. L'évolution a sélectionné les mécanismes favorisant la survie, la virulence et l'échappement des bactéries aux défenses immunitaires. Les souches sélectionnées sont capables d'adapter la structure de leurs LPS à la virulence bactérienne. Par exemple, au cours de l'infection, *Shigella flexnerii* est capable de réduire ses chaînes polysaccharidiques pour se protéger du système du complément et sécréter efficacement ses toxines. Les lipides A des Bordetelles ont conservé des

substitutions au niveau de leur lipide A et des chaînes courtes d'acides gras, ainsi elles sont faiblement reconnues par le système immunitaire (Al Bitar Nehmé 2014). Lors d'infections par *Pseudomonas aeruginosa* de patients atteints de mucoviscidose, les souches bactériennes ayant perdu une activité enzymatique de dé-acylation sont favorisées. Cette présence de LPS hepta-acylés augmente la résistance des bactéries à certains antibiotiques ( $\beta$ -lactames) (Hajjar et al. 2002).

Les chaînes-O contribuent aussi à la virulence des bactéries et à leur maintien dans l'organisme. Elles sont des interfaces d'adhésion et d'interaction entre les bactéries et l'hôte. L'adhésion et la colonisation de l'hôte sont des étapes clés de la virulence bactérienne. Leurs modifications permettent l'échappement à la reconnaissance par le système immunitaire inné. Chez *H. pylori*, les antigènes-O miment ceux des antigènes sanguins de l'hôte et ainsi ils ne sont pas détectés par les défenses immunitaires (Aspinall et al. 1995; Lerouge & Vanderleyden 2002).

Il convient donc de comprendre comment les LPS sont reconnus par le système immunitaire et quel est l'impact de la structure sur cette reconnaissance.

Le système immunitaire peut être décomposé en deux systèmes : le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. Ces deux systèmes sont intimement liés. Le premier permet la détection des agents étrangers de façon non-spécifique pour défendre immédiatement l'organisme de l'agression. Le deuxième, spécifique du pathogène, plus lent à se mettre en place et doté de mémoire, est constitué de deux axes : la réponse humorale médiée par les anticorps et la réponse à médiation cellulaire. L'activation de la réponse immunitaire adaptative peut s'effectuer seulement quand la réponse innée a été initiée.

Les LPS ont un rôle dans l'activation de la réponse immunitaire innée et dans l'orientation de la réponse immunitaire adaptative.

### ***a) La réponse immunitaire innée aux LPS***

Le système de défense inné possède plusieurs composantes :

- les barrières physiques (peau, muqueuse), chimiques (suc gastrique, salive, larme, sueur) et biologiques (flore commensale) ;
- les protéines sériques telles que les protéines du système du complément et les protéines de phase aiguë de l'inflammation ;
- les peptides antimicrobiens dans les cellules phagocytaires et secrétés par les cellules de la peau et des muqueuses ;
- les cellules immunitaires qui reconnaissent les pathogènes de façon aspécifique ;

Les LPS interagissent avec ces composantes :

Leurs chaînes-O ou des substitutions sur le lipide A peuvent conférer à la bactérie une résistance à certains antimicrobiens secrétés par les cellules du système immunitaire inné comme les  $\beta$ -défensines par exemple (Sahly et al. 2003).

Pour le système du complément, les voies alternes et classiques peuvent être respectivement activées par les régions PS et lipides A (Morrison & Kline 1977). Elles induisent la formation du complexe d'attaque membranaire qui conduit à la lyse des bactéries, le recrutement des cellules du système immunitaire sur le site de l'infection par chimiotactisme, et l'opsonisation. De façon opposée, les LPS peuvent, chez certaines bactéries, agir comme un système d'échappement à la reconnaissance du complément en raison de la longueur et de la composition de leurs chaînes-O et donc échapper à la phagocytose (Rautemaa & Seppo 1999; Futoma-koloch 2016).

Enfin, certaines cellules du système immunitaire inné repèrent les pathogènes de façon aspécifique afin de les détruire. C'est le cas des phagocytes : neutrophiles, cellules dendritiques (DC) et macrophages, qui les éliminent en plus de leurs rôles charnières dans le déclenchement de l'immunité adaptative. Les LPS font partie des motifs moléculaires reconnus par ces cellules de l'immunité innée.

## ***L'activation de l'inflammation : PAMPS et PRR***

La mise en place de l'immunité innée s'effectue lorsque des cellules sont affectées par des dommages ou des pathogènes. Les cellules affectées relarguent des médiateurs chimiques, ces derniers étant des signaux qui vont attirer les cellules du système immunitaire inné (DC, macrophages, neutrophiles) sur le site de l'inflammation. En effet, les pathogènes possèdent des « Pathogen Associated Molecular Patterns » ou PAMPs (motifs moléculaires associés aux pathogènes). Ce terme a été introduit par Janeway en 1989 (Janeway 1989). Ce sont des molécules membranaires (protéines, lipoprotéines, LPS, acides lipoprotéiques, peptidoglycane, sucres) ou des molécules internes (ADN, ARN) appartenant aux pathogènes. Ces motifs de structures relativement conservées sont reconnus par des « Pattern Recognition Receptor » dits PRR (Récepteur de Reconnaissance de Motif) à la surface des cellules de l'organisme. C'est à travers cette reconnaissance par un PRR particulier que les LPS jouent un rôle crucial dans l'activation de la réponse innée, dans l'activation de l'inflammation et dans l'orientation de la réponse adaptative (Maeshima & Fernandez 2013). Cependant, la modification de la structure de ces PAMPs est aussi l'une des stratégies d'évasion ou de modulation de la réponse immunitaire par des microorganismes (Matsuura 2013).

## ***Les récepteurs Toll-like (Toll-Like-Receptors)***

Plusieurs types de PRR coexistent. Il s'agit des PRR membranaires, des PRR sécrétés et des PRR cytoplasmiques. Les LPS sont reconnus par un PRR appartenant à la famille des Toll-Like-Receptors (TLR). Ces TLRs forment une famille de récepteurs conservés chez les mammifères et homologues aux récepteurs Toll découverts chez les insectes par Bruno Lemaitre. Il découvrit qu'une souche de drosophile était incapable de se défendre contre des infections fongiques suite à une mutation du gène du récepteur Toll, présent à la surface des cellules. Ce récepteur était déjà décrit pour son rôle dans la mise en place de la symétrie dorso-ventrale de l'embryon de drosophile (Lemaitre et al. 1995; Medzhitov et al. 1997). La famille des récepteurs TLR comporte actuellement 13 récepteurs connus,

allant de TLR1 à TLR13, l'homme exprime les TLR1 à TLR10 (Akira 2003). Les TLRs sont principalement présents sur les monocytes, macrophages, DC, neutrophiles. Les cellules épithéliales et endothéliales peuvent exprimer certains TLRs. Chaque TLR reconnaît un type de PAMPs, et pour certains, aucun ligand n'est encore connu (ces ligands sont résumés dans le Tableau I et dans la Figure 12). Cette reconnaissance induit la dimérisation du récepteur TLR (hétéro- ou homo-dimère) et engendre des cascades de signalisations grâce à des protéines adaptatrices différentes. Ces cascades peuvent mener à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et à l'inflammation.

**Tableau I : Les TLRs, leurs ligands et leurs localisations.**

Récepteur	PAMPs	Localisation
<b>TLR1/TLR2</b>	Lipoprotéines triacylées, lipoglycanes	Membrane plasmique
<b>TLR2/TLR6</b>	Lipoprotéines diacylées	Membrane plasmique
<b>TLR2</b>	Lipoprotéines + Peptidoglycane	Membrane plasmique
<b>TLR3</b>	dsRNA	Endosome
<b>TLR4</b>	LPS	Membrane plasmique et endosome
<b>TLR5</b>	Flagelline	Membrane plasmique
<b>TLR7</b>	ssRNA	Endosome
<b>TLR8</b>	ssRNA	Endosome
<b>TLR9</b>	CpG DNA	Endosome

Les LPS sont reconnus par le récepteur transmembranaire TLR4 couplé à son corécepteur nommé MD-2 (Beutler 2000; Kawai & Akira 2010). Ce sont les travaux de Poltorak en 1998 qui ont prouvé que les LPS étaient des ligands de TLR4. Il a découvert que les signaux induits par les LPS n'aboutissaient pas à la production de médiateurs de l'inflammation chez les souris déficientes en TLR4 (Poltorak 1998). Le TLR4 est exprimé au niveau basal ou est inductible par les DC, monocytes, macrophages, neutrophiles, cellules endothéliales, cellules épithéliales (poumons, intestins, reins, colon) mais aussi par les kératinocytes (Pugin et al. 1993; Guillott et al. 2004; Song et al. 2002; Muller-Decker et al. 2005; Tissières & Pugin 2009; Vaure & Liu 2014).



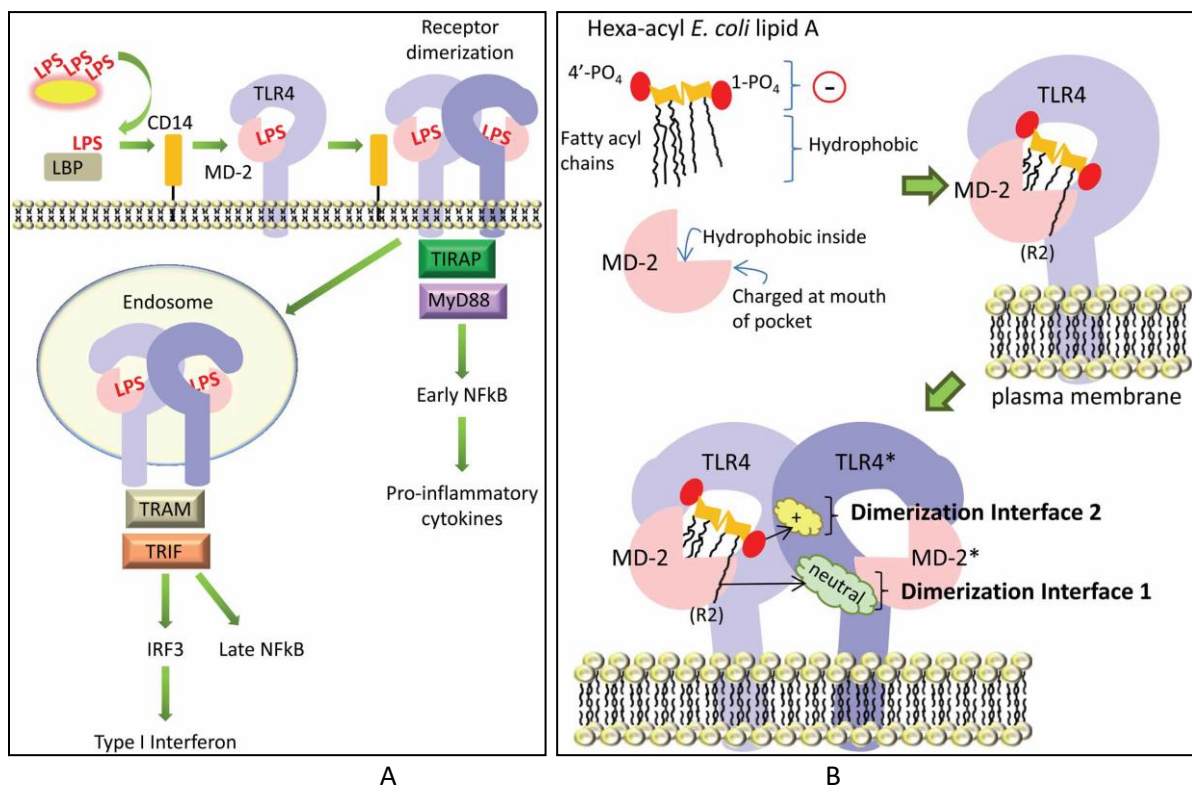
## ***La reconnaissance des LPS par le TLR4***

La reconnaissance des LPS implique plusieurs acteurs (Figure 9). Premièrement, les LPS sont pris en charge par la LBP (Lipopolysaccharide Binding Protein), une protéine plasmatique de phase aiguë de l'inflammation qui possède une forte affinité pour les LPS, y compris pour les LPS hypo-acylés (Schumann et al. 1990; Mathison et al. 1992). La LBP est responsable de plusieurs effets biologiques et peut augmenter l'efficacité ou neutraliser les activités des LPS (Schumann et al. 1990; Wurfel et al. 1994). A faible concentration, elle extrait les LPS des parois bactériennes (Vesey et al. 2000) ou les désagrège lorsqu'ils sont libérés par lyse ou division bactérienne pour les présenter au corécepteur CD14 (Wright et al. 1990). Le CD14 peut être présent sous forme membranaire grâce à un ancrage GPI, c'est le cas pour les cellules myéloïdes. Il est aussi présent sous forme soluble dans le sérum, ce qui permettra la présentation des LPS aux cellules épithéliales, endothéliales, et dendritiques qui n'expriment pas le récepteur CD14 à leur surface. Sans LBP, la fixation du LPS par le CD14 sous sa forme soluble peut se produire mais de façon très peu efficace (Fujihara et al. 2003; Viriyakosol et al. 2001). Egalement, à faible concentration de LPS, le CD14 est indispensable à leur présentation au TLR4 (Gioannini et al. 2004). La concentration nécessaire du lipide A pour activer les macrophages est réduite de 100 à 1000 fois, lorsque le complexe CD14-lipide A est formé (Fujihara et al. 2003). Sans ces deux protéines accessoires de forte affinité, les LPS se lient au récepteur MD-2:TLR4 de façon bien moins efficace.

Ainsi les LPS sont transportés par le CD14 soluble ou membranaire jusqu'à leur récepteur, le complexe MD-2:TLR4. Le MD-2 est une glycoprotéine associée au TLR4 afin de lui procurer une poche hydrophobe pouvant prendre en charge les acides gras des LPS. Sans MD-2, les LPS ne peuvent pas induire de réponse TLR4 (Shimazu et al. 1999; Kawasaki et al. 2000; Schromm et al. 2001). Ce sont les monomères de LPS qui sont capables d'interagir avec le MD-2:TLR4 (Teghanemt et al. 2005) et la liaison du LPS engendre la dimérisation du complexe MD-2:TLR4 (Park et al. 2009a). Les prérequis minimums pour l'activation du complexe sont : une tête hydrophile avec des charges négatives

(phosphate) correctement espacées, et une moitié hydrophobe volumineuse qui peut remplir la poche de MD-2 en exposant partiellement une chaîne d'acide gras (celle en position C2). Cette configuration aboutit à des signaux et des interfaces de dimérisation permettant la dimérisation symétrique du complexe MD-2:TLR4 et des domaines cytosoliques TIR (Toll-Interleukin-1 Resistance) de chacun des complexes. La dimérisation des domaines TIR engendre le recrutement de protéines adaptatrices et l'initiation de la signalisation cellulaire. La signalisation cellulaire induite varie en fonction de la structure des LPS. Elle aboutit généralement à la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'interleukine-1 (IL-1).

C'est la région lipide A des LPS qui est responsable de la plupart des activités biologiques de la molécule car c'est elle qui est reconnue par le récepteur (Westphal & Lüderitz 1954; Raetz & Whitfield 2002).



**Figure 9 : A) Reconnaissance et transfert séquentiel des LPS par plusieurs acteurs afin d'être présentés à leur récepteur et B) détails de l'interaction LPS :MD-2 :TLR4.**

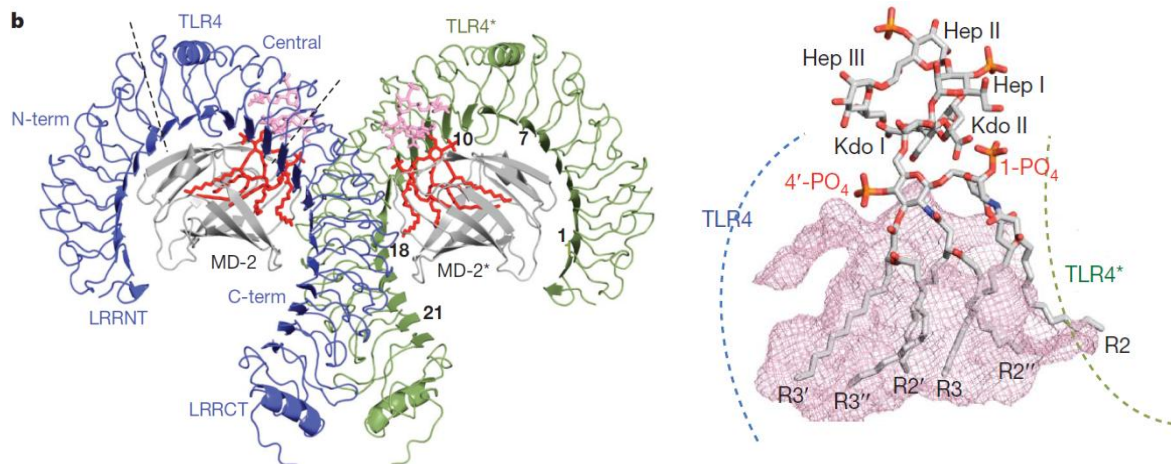
(Maeshima & Fernandez 2013).

Cependant, la partie core a son importance, notamment pour la présentation du lipide A dans une bonne conformation au récepteur (Mancek-Keber & Jerala 2015). Plusieurs études ont souligné une activité plus intense des LPS par rapport aux lipides A. En effet, en comparant la sécrétion d'IL-1 induite après stimulation de monocytes, il a été mesuré une sécrétion bien plus importante via la stimulation par les LPS de *B. pertussis* que par ses lipides A (Caroff et al. 1986; Haeffner-cavaillon 1989), idem pour *Salmonella* avec l'IL-1 (Loppnow et al. 1989) et le TNF- $\alpha$  (Feist et al. 1989). Il est aussi décrit l'importance de la présence du Kdo sur le core pour induire la sécrétion d'IL-1 et l'activation du TLR4 (Haeffner-Cavaillon et al. 1989; Raetz et al. 2006). Il a également été décrit que l'ajout de la région polysaccharidique au lipide A de *Salmonella* permettait une meilleure reconnaissance par le MD-2:TLR4 chez l'homme (Muroi & Tanamoto 2002). Enfin, un autre élément jouant sur une meilleure reconnaissance s'explique par la différence de fluidité des chaînes d'acides gras des LPS aux températures physiologiques. Seydel et Brandenburg ont démontré que cette fluidité dépendait largement du pH et de la concentration en Mg<sup>2+</sup>. Ils ont aussi mentionné qu'une meilleure fluidité à 37°C induisait des activités biologiques plus importantes qu'une faible fluidité à cette même température (Brandenburg & Seydel 1990).

### ***b) L'influence de la structure des LPS sur l'activation du récepteur MD-2:TLR4***

Tous les LPS n'engendrent pas les mêmes effets en activant le récepteur MD-2:TLR4 et ce à cause de leurs structures très variables. Également, les interactions entre les LPS et les complexes MD-2:TLR4 humains ne sont pas les mêmes qu'entre les LPS et les complexes MD-2:TLR4 murins. Certains LPS antagonistes chez l'humain sont agonistes chez la souris. C'est grâce à Park en 2009 que la structure du complexe MD-2:TLR4 humain a été pour la première fois co-cristallisée (Figure 10) avec des LPS et nous a permis d'en comprendre davantage sur le processus d'interaction des LPS avec ce récepteur (Park et al. 2009a). C'est l'ensemble des interactions hydrophobes, de liaisons hydrogènes et des interactions ioniques entre les LPS, le MD-2 et le TLR4 qui rend possible la dimérisation du

complexe, influence sa structure et permet d'enclencher les cascades de signalisation. Ces interactions sont modulées par plusieurs éléments : la présence ou l'absence d'un groupement chargé sur les phosphates ; la longueur, la position et le nombre des acides gras.



**Figure 10 : Liaison du LPS au complexe MD-2:TLR4.**  
(Park et al. 2009b)

Les structures des LPS d'*E. coli* sont parmi les plus étudiées. Ce modèle de LPS bis-phosphorylé et hexa-acylé est décrit comme étant l'un des plus puissants activateur du TLR4 humain (Heine et al. 2001). Lorsque cette structure varie, une perte partielle ou totale d'activité endotoxinique est observée (Zaehring et al. 1994; Raetz & Whitfield 2002).

**Les charges** portées par les phosphates 1 et 4' des glucosamines sont cruciales dans l'interaction avec le MD-2:TLR4. Elles permettent la formation de ponts hydrogène avec les résidus chargés du dimère. Lorsque l'un des deux phosphates est perdu, l'activité des lipides A est grandement diminuée (Caroff 1982; Caroff et al. 1986; Zaehring et al. 1994). C'est ainsi que le Monophosphoryl Lipide A (MPLA, ou MPL® pour le dérivé commercial utilisé comme adjuvant de vaccin) a été développé comme un faible activateur du système immunitaire inné. Le MPLA correspond au lipide A de *Salmonella enterica Minnesota* dont le phosphate 4' est manquant. L'absence du groupement phosphate (remplacement par un hydrogène) diminue fortement sa pyrogénicité (Ribi et al. 1979; Qureshi et al. 1982).

Il a été montré que le remplacement des phosphates chargés par d'autres groupements négativement chargés, comme des groupes carboxyméthyl, n'altère pas la réponse aux LPS d'*E. coli*, mais ce n'est pas le cas pour ceux de *Rubrivivax gelatinosus* (Fujimoto et al. 2005).

Chez certaines bactéries, les groupements phosphates sont substitués par différents motifs (phosphoéthanolamine (PEA), hexose ou amino-desoxy-hexose) qui modulent aussi la reconnaissance des LPS par les complexes MD-2:TLR4. Comme démontré dans l'équipe, l'ajout de glucosamine sur les lipides A de *B. pertussis* (LPS à 5 acides gras) augmente significativement leurs activités *via* le MD-2:TLR4 (Marr, Hajjar, et al. 2010).

La présence d'amino-desoxy-arabinose sur d'autres bactéries comme *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *B. pseudomallei* et *B. thailandensis* est décrite comme promouvant l'inflammation aigüe (Hollaus et al. 2015). Pour *N. meningitis*, la présence d'un groupement PEA amplifie grandement la réponse TNF- $\alpha$  du lipide A hexa-acylé (John et al. 2009).

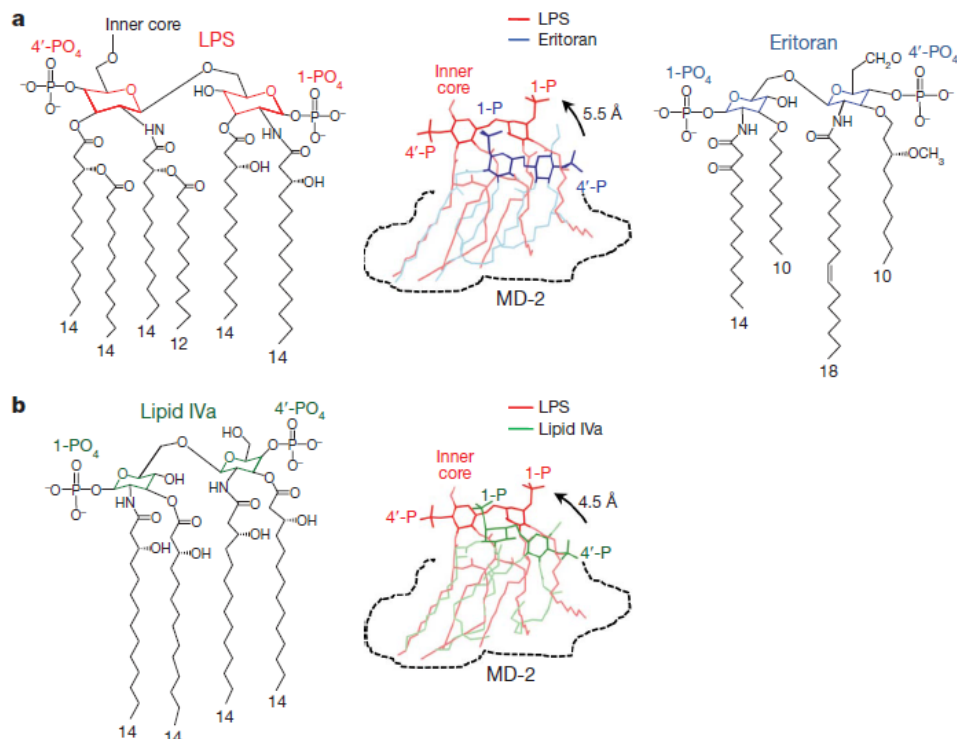
**La position** des acides gras influence aussi grandement l'activité des molécules de LPS. L'exemple des LPS de synthèse de *Rubrivivax gelatinosus* nous montre qu'en fonction de leur position, ils ont des activités différentes : antagoniste, endotoxique, ou aucune activité (Fujimoto et al. 2005).

**Le nombre** des acides gras est aussi un facteur important à prendre en compte pour comprendre les activités des LPS (Caroff et al. 2002). Les LPS penta- ou hepta-acylés perdent leur activité d'un facteur 10 à 100 par rapport aux hexa-acylés. Lorsque les LPS sont hypo-acylés, l'interaction LPS:MD-2 avec le TLR4 est impactée à cause d'une modulation de la reconnaissance monomérique du LPS par MD-2 (Teghanemt et al. 2005). Le cas de *Pseudomonas aeruginosa* est un bon exemple, les souches de laboratoires contenant majoritairement 5 acides gras induisent une réponse bien plus faible que les LPS hexa-acylés des souches isolées chez des personnes atteintes de pathologies pulmonaires (Hajjar et al. 2002). Un autre exemple est celui de *Salmonella enterica Minnesota*. Ses LPS à 5 et 7 acides gras induisent une réponse 10 à 100 fois plus faible que ses LPS hexa-acylés (Janusch et al. 2002; K. Kawasaki et al. 2004). Chez *E. coli*, on observe un effet cumulé de la déphosphorylation et de

l'hypo-acylation. En effet, l'activité des LPS penta-acylés est détectable mais plus faible lorsqu'ils sont déphosphorylés. La déphosphorylation en C4' éteint davantage l'activité des LPS que la déphosphorylation en C1 (Coats et al. 2011).

Il a aussi été montré que des lipides A tri-acylés synthétiques étaient de forts activateurs du MD-2 :TLR4 mais de faibles activateurs du TLR2 (Dunn-Siegrist et al. 2012).

Pour ce qui est des LPS tetra-acylés, ils peuvent avoir des activités antagonistes chez l'Homme et inhiber l'activation du récepteur par d'autres LPS d'un facteur 10 à 100 (Golenbock et al. 1991). Ils sont complètement engoutis dans la poche du MD-2 et n'exposent pas les charges des phosphates à la surface de cette dernière. Par exemple l'Eritoran, une molécule de synthèse, et le lipide IV, un intermédiaire de la biosynthèse du lipide A, se fixent au récepteur et le bloquent, mais n'engendrent pas sa dimérisation (Figure 11). Ces antagonistes ont été étudiés pour leur intérêt d'un point de vue thérapeutique pour le traitement du sepsis.



**Figure 11 : Comparaison structurale d'agonistes et d'antagonistes du récepteur MD-2:TLR4.**

Comparaison entre l'insertion d'un LPS à 6 AG (*E. coli*) et de deux antagonistes a) Eritoran ; b) Lipid Iva. (Park et al. 2009b).

Enfin, **la longueur** des chaînes d'acides gras joue aussi sur l'insertion de la partie lipide A dans MD-2. Les chaînes d'acides gras de longueurs moyennes (12C à 14C) détiennent la plus grande capacité à activer le récepteur alors que les chaînes d'acides gras courtes ( $\leq 10C$ ), ou trop longues ( $\geq 16C$ ), ne permettent pas une bonne intégration et présentation du lipide A dans la poche de MD-2. C'est le cas des LPS de *Bordetella pertussis* 18-323 décrit dans l'équipe comme antagonistes par la présence d'une chaîne à 10C en C3' (Shah et al. 2013). Les LPS de *Rhodobacter sphaeroides* sont aussi des antagonistes inactifs. Ils possèdent 2 chaînes d'acide gras à 10C sur leurs 5 chaînes et la présence d'une insaturation sur une chaîne à 14C (Kutuzova et al. 2001). Des LPS à très longues chaînes comme ceux de *L. pneumophila* (chaînes avec 27C et 28C) ne sont pas non plus reconnus par le MD-2:TLR4 (Girard et al. 2003).

Une autre façon d'étudier la relation structure-activité des LPS passe par la compréhension de leur niveau d'agrégation. La nature amphiphile les fait s'agréger dans les environnements aqueux par des liaisons ioniques et hydrophobes à partir d'une concentration micellaire critique très faible. En plus du pH et de la température, la forme tridimensionnelle de chaque molécule de LPS gouverne la structure des agrégats. Les agrégats lamellaires formés à partir des LPS de forme plutôt cylindrique sont associés à des faibles activités agonistes du TLR4, tandis que les agrégats cubiques ou hexagonaux formés par des molécules coniques sont associés à des activités très intenses du récepteur (Schromm et al. 1998; Brandenburg & Seydel 2009).

Pour conclure, l'étude de la relation structure-activité des LPS doit prendre en compte l'ensemble de ces facteurs et l'analyse structurale est indispensable à la compréhension des résultats immunologiques. Au sein d'une même espèce bactérienne et entre différentes espèces, de nombreuses structures de LPS coexistent et la synergie de tous les facteurs impliquant leur reconnaissance (longueur, position, nombre des acides gras et substitution ou absence de phosphate, et l'état d'agrégation) sont à prendre en compte. Bien que la reconnaissance des LPS

semble suivre certains principes généraux, chaque cas est différent et demande une étude particulière.

### ***Les différentes voies de signalisation***

Une fois le récepteur MD-2:TLR4 dimérisé, le recrutement de molécules adaptatrices s'opère. Elles possèdent des domaines TIR qui vont se lier par des interactions hydrophobes aux domaines cytoplasmiques TIR du dimère MD-2:TLR4. Les différents TLRs possèdent des protéines adaptatrices différentes (Figure 12). Le MD-2:TLR4 active deux voies : la voie MyD88-dépendante (ou MyD88) et la voie MyD88-indépendante (aussi appelée voie TRIF-dépendante ou voie TRIF, (Kawai et al. 1999)).

### ***Les voies MyD88 et TRIF***

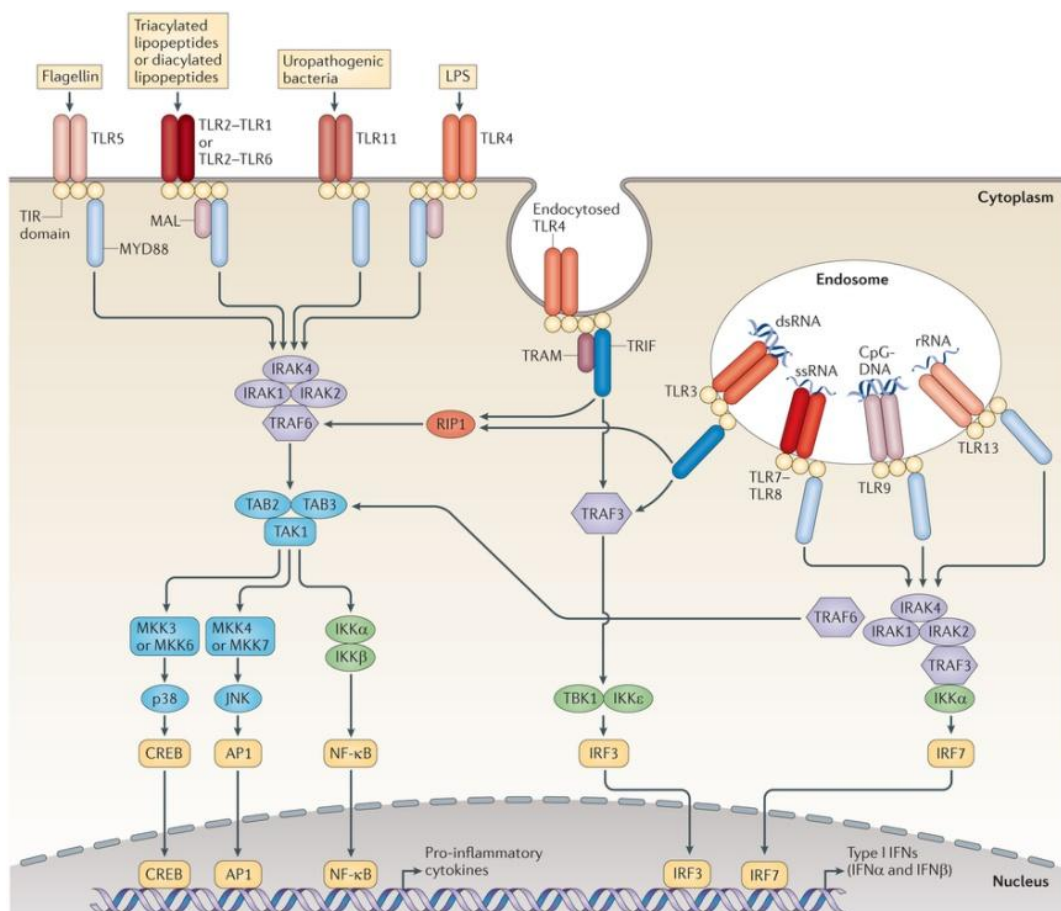
La voie MyD88-dépendante est activée au niveau de la membrane plasmique et mène à l'activation précoce du facteur de transcription NFκB ce qui va induire la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1, IL-6) et de cyclooxygénase 2 (Kawai et al. 1999; Kawai T & Akira 2005). Ces médiateurs ont différents rôles :

- Le TNF-α est un médiateur important de l'inflammation aiguë. Il permet le recrutement des neutrophiles et des macrophages vers les sites infectieux en stimulant la production des molécules d'adhésion et des chémokines par les cellules endothéliales. Le TNF-α agit également sur l'hypothalamus, déclenche la fièvre, et favorise également la production des protéines de la phase aiguë.
- L'IL-1, ses effets sont similaires à ceux du TNF-α et elle contribue aussi à activer les cellules T.
- L'IL-6, joue aussi un rôle dans le déclenchement de la fièvre et la réponse de phase aiguë. Elle stimule aussi la croissance des lymphocytes B.
- La cyclooxygénase 2, est une enzyme exprimée en réponse à la production des médiateurs inflammatoires comme l'IL-1 et le TNF-α. Elle est notamment responsable de la production de prostaglandines. Les prostaglandines sont produites au niveau du rein, de la rate et du cœur.



Elles engendrent la vasodilatation, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, la migration et prolifération lymphocytaire. Elles sont aussi à l'origine de la fièvre.

Plusieurs protéines adaptatrices (IRAK, TAB, TAK) sont impliquées dans la transmission du signal depuis le MD-2:TLR4 jusqu'à la transcription de NFκB et la sécrétion des médiateurs. L'interaction de la première protéine adaptatrice TIRAP (ou Mal) avec MyD88 est indispensable pour la transduction du signal de cette voie (Yamamoto et al. 2002).



**Figure 12 : Récepteurs TLRs avec leurs protéines adaptatrices chez l'Homme.**  
(O'Neill et al. 2013).

La voie TRIF est activée après l'endocytose du TLR4 (Barton & Kagan 2009), et elle active le facteur 3 régulateur de l'interféron (IRF3) et la voie tardive de NFκB, ces deux activations mènent à la production d'interféron-β (IFN- β) et des gènes IFN-inductibles (CXCL-10 ou IP-10, CCL5 ou RANTES, CCL2 ou MCP-1) (Biswas et al. 2007).

- IFN- $\beta$ , possède des activités antivirales et il engendre une sur-régulation de l'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) et des molécules de co-stimulation. Il est impliqué dans la sécrétion des chemokines citées ci-après.
- IP-10, RANTES, MCP-1 sont des chemokines attractantes induisant les recrutements d'effecteurs (macrophages, lymphocytes T, Natural Killer) sur le site de l'inflammation.

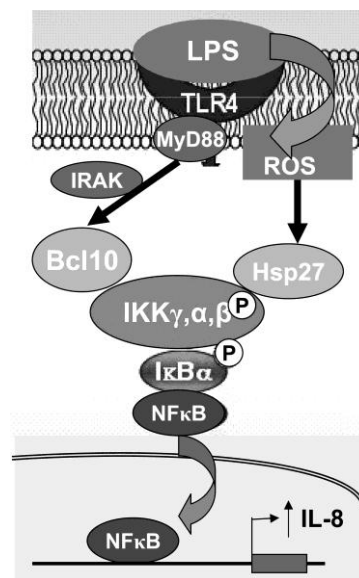
La voie tardive de NF $\kappa$ B induit également la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Comme pour la voie MyD88, plusieurs protéines adaptatrices transmettent le signal, et la liaison de la protéine TRAM à TRIF est indispensable pour l'initiation de cette transduction (Yamamoto, Sato, Hemmi, et al. 2003). La voie TRIF ne peut être activée sans l'intervention de CD14 dans la cascade de reconnaissance et de signalisation des LPS par le MD-2:TLR4 (Jiang et al. 2005). C'est aussi entre autres par la voie TRIF que le phénomène de tolérance aux endotoxines s'opère (Biswas et al. 2007).

Il a été montré, chez les souris TRIF-déficientes une abolition de la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse aux ligands TLR4 ce qui indique que l'activation de la voie TRIF (et de la voie tardive de NF $\kappa$ B) est indispensable pour la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires *via* l'activation de la voie MyD88 (réponse précoce de NF $\kappa$ B, (Hoebe et al. 2003; Biswas et al. 2007)). Cependant, chez les souris MyD88-déficientes la réponse NF $\kappa$ B est toujours active en réponse aux LPS et TRIF est indispensable à cette activation (Yamamoto, Sato & Hemmi 2003). La voie TRIF ne requiert pas l'activation de MyD88 pour la production tardive de cytokines pro-inflammatoires et l'activation de l'IRF3.

### ***La production de ROS***

Les réactifs dérivés de l'oxygène (ROS) comme NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, sont des substances bactéricides, mais qui en grandes quantités peuvent aussi endommager les cellules hôtes. Elles interviennent notamment dans le phénomène de vieillissement. Les ROS sont produits par une oxydase membranaire des endosomes, la NADPH oxydase (Nicotinamide Adénine Dinucléotide

Phosphate) (nox 4), lors de la phagocytose de corps étrangers mais aussi par les mitochondries suite à la fixation du TNF- $\alpha$  sur son récepteur. Lors de la liaison de LPS au MD-2:TLR4, une interaction directe entre ce dernier et le récepteur à la NADPH nox 4 se produit et permet la production de ROS (Park et al. 2004; Kohchi et al. 2009; Wu et al. 2009). Curieusement, le MPLA induit une production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus élevée que le LPS. La forte production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhiberait l'activité de la catalase et l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> serait pris en charge par la glutathionne transférase, qui une fois réduite, inhiberait la voie NF $\kappa$ B. Aussi, la production de NO, stabiliserait l'inhibiteur de NF $\kappa$ B, l'empêchant d'être transloqué dans le noyau et d'activer la transcription des gènes pro-inflammatoires (Saha et al. 2001).



**Figure 13 : Production de ROS par l'activation du TLR4.**  
(Bhattacharyya et al. 2008).

### ***L'activation des caspases***

Les caspases sont des endoprotéases impliquées dans les mécanismes de l'apoptose et de l'inflammation. Elles sont classées en fonction de leur rôle apoptotique (caspases-2-8-9-10 pour les initiatrices et caspases-3-6-7 pour les exécutrices chez l'homme) ou inflammatoires (caspases-1-4-5-12L chez l'homme). Les caspases sont sous forme de pro-caspases dans le cytoplasme. Les initiatrices sont clivées en réponse à un stimulus et vont cliver les exécutrices pour les rendre fonctionnelles. Elles vont activer d'autres enzymes et mener notamment à la fragmentation de l'ADN, à la formation de corps apoptotiques et à la mort cellulaire. Les stimuli peuvent être extrinsèques comme la liaison

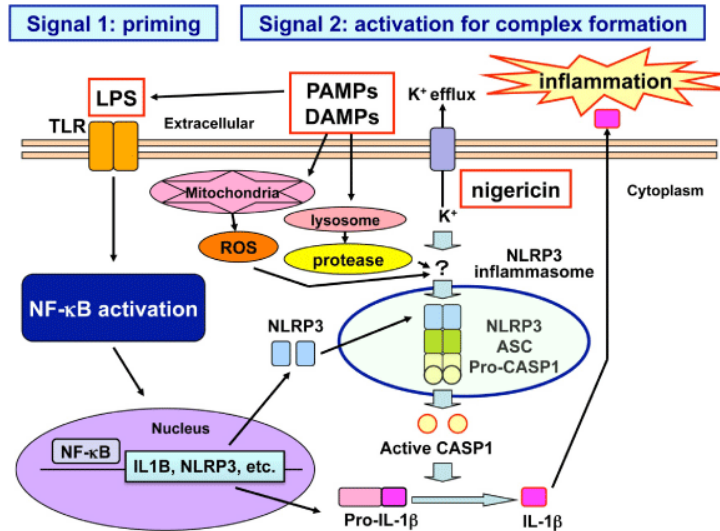
de ligand de la famille des TNF, ou intrinsèques comme des dommages à l'ADN et des signaux de stress cellulaire. Des caspases peuvent avoir d'autres rôles qui ne sont pas apoptiques, c'est le cas des caspases 3/7 qui peuvent être impliquées dans différents processus cellulaires comme la prolifération, la régulation du cycle cellulaire, la différenciation de plusieurs types cellulaires et l'inflammation (Lamkanfi et al. 2007; Erener et al. 2012). Par exemple, les caspases-3 peuvent avoir un rôle dans la maturation et l'expression des complexes Majeurs d'Histocompatibilité de type 2 (CMH II) des DC stimulées par les LPS (Santambrogio et al. 2005).

### ***L'Inflammasome***

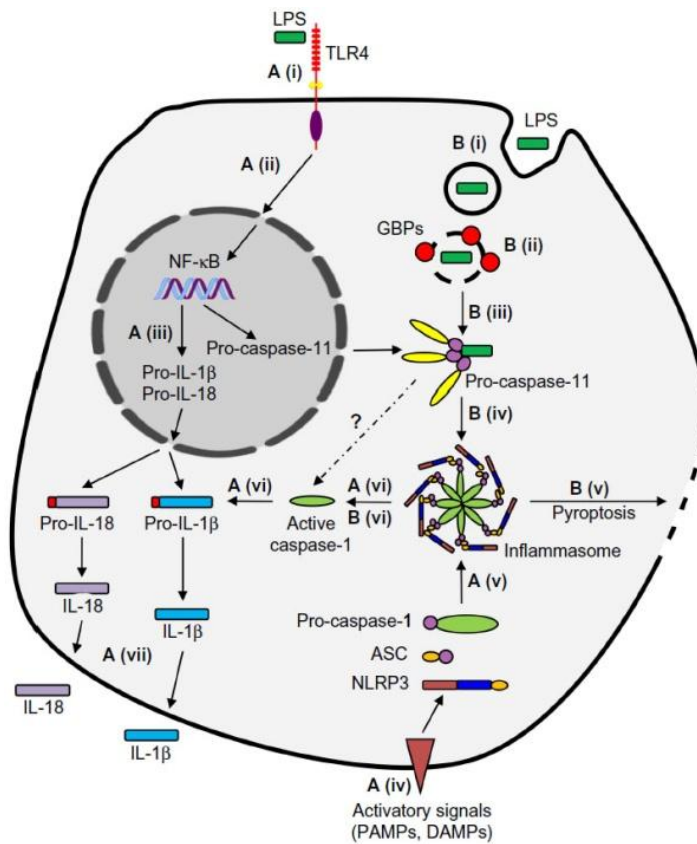
L'inflammasome est un complexe multimoléculaire de signalisation impliqué dans la production des pro-formes d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18, et dans l'activation de la caspase-1 afin de convertir les pro-formes d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 en leur forme mature et biologiquement active (Martinon et al. 2002). La caspase-1 est aussi critique pour l'activation et l'exécution de la mort cellulaire par pyroptose. La pyroptose se manifeste par de violents dommages de la membrane plasmique et le relargage de nombreux composés cytoplasmiques pro-inflammatoires connus sous l'acronyme de DAMPs (motifs moléculaires associés aux dommages). L'activation de la caspase-1 est appelé voie canonique de l'inflammasome. Il existe plusieurs membres de la famille des inflammasomes. Le NLRP3 est le plus étudié. Il est constitué de la protéine NLRP3 (de la famille des NOD-like récepteurs qui sont des PRR cytoplasmiques), de la protéine ASC et de la caspase-1. Pour être activé, il requiert deux signaux (Kawana et al. 2014). Le 1<sup>er</sup>, appelé priming, est l'augmentation de l'expression des gènes de l'inflammasome *via* l'activation de NF $\kappa$ B par la liaison de LPS au MD-2:TLR4 par exemple. Le 2<sup>ème</sup>, le signal d'activation, correspond à l'assemblage de l'inflammasome en réponse à trois acteurs principaux : la sécrétion de ROS, la présence de la protéase lysosomale et d'un flux de potassium (Figure 14).

Les cytokines produites permettent le recrutement d'effecteurs du système immunitaire inné, tandis que la pyroptose mène à la suppression des agents pathogènes intracellulaires. La

signalisation par le TLR4 suite à la liaison du lipide A, mais sans signaux d'activation de l'inflammasome, est suffisante pour engendrer une production substantielle d'IL-1. Le MPLA, quant à lui bloque, l'assemblage de l'inflammasome malgré les signaux d'activation (Embry et al. 2011).



**Figure 14 : Voie canonique « classique » de l'inflammasome médiée par les LPS.** (Kawana et al. 2014).



**Figure 15 : Voies canonique (A) et non-canonique « alternative » (B) de l'inflammasome médiées par les LPS.** (Diamond et al. 2015).

Récemment, Kayagaki et Hagar ont montré que les LPS pouvaient activer la voie non-canonique de l'inflammasome par l'activation de la caspase-11 chez la souris (caspases-4 et -5 chez l'Homme) de façon indépendante à la liaison au TLR4 (Kayagaki et al. 2011; Kayagaki et al. 2013; Hagar et al. 2013; Kayagaki et al. 2015).

Premièrement, la pro-caspase-11 est exprimée suite à la liaison de PAMPs (LPS ou autres) aux PRR et à l'activation de la voie NFκB. Deuxièmement, les LPS de façon intracellulaire et sous la forme agrégée peuvent procéder à l'activation de la pro-caspase-11 (Stowe et al. 2015). Cette activation mène au clivage de la gasdermine puis à la maturation de l'IL-1 et à la pyroptose de la cellule (Kayagaki et al. 2015) (Figure 15).

### ***c) La réponse immunitaire adaptative aux LPS***

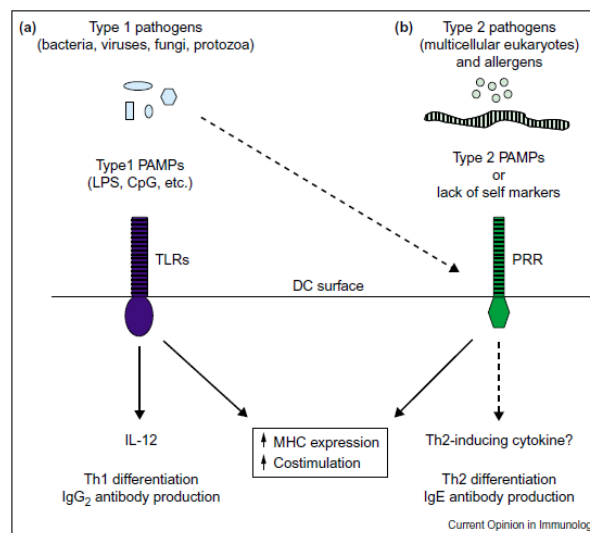
Le système immunitaire adaptatif cible spécifiquement les pathogènes et peut être mis en place une fois le système inné déclenché. Les LPS présents sur les bactéries pathogènes déclenchent le système inné et aboutissent à la production de cytokines. Cet environnement cytokinique a un rôle clé dans la différenciation et la spécialisation des cellules du système immunitaire adaptatif.

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> matures peuvent être différenciés en plusieurs sous-populations en fonction du profil cytokinique, principalement : Th1 (IFN-γ), Th2 (IL-4), Th17 (IL-17), Treg (IL-10), Tfh (IL-21). Ces lymphocytes assistent d'autres cellules du système immunitaire pour détruire les pathogènes.

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et spécifiquement les DC occupent un rôle central dans le priming des lymphocytes T et leur différenciation, impactant ainsi la nature de la réponse adaptative. Les CPA présentent les antigènes sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH I et II), aux récepteurs TCR des lymphocytes T naïfs dans les organes lymphoïdes secondaires.

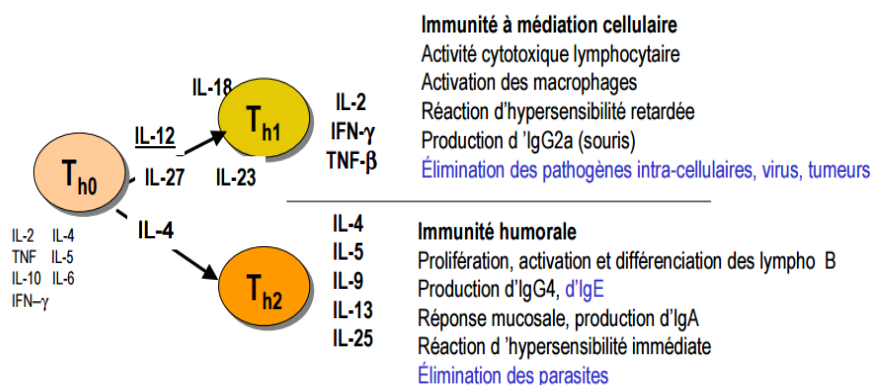
En présence de pathogènes intracellulaires et de bactéries, les lymphocytes T CD4+ se différencient en lymphocyte T helper 1 (Th1) et orientent l'immunité vers une réponse à médiation cellulaire. Cette réponse, dite de type 1, stimule la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes Th1 et d'anticorps IgG2 par les lymphocytes B.

Au contraire, en présence de parasites ou de pathogènes multicellulaires, une réponse de type 2, orientant l'immunité vers une médiation humorale, est mise en place avec la différenciation des lymphocytes T CD4+ en lymphocytes Th2. Cette réponse est caractérisée par la production d'IL-4, IL-5, IL-13 et d'IgE (provoque la libération d'histamine par les mastocytes) et par la stimulation de la prolifération et de la différenciation des lymphocytes B.



**Figure 16 : Discrimination des pathogènes par le système immunitaire inné.**

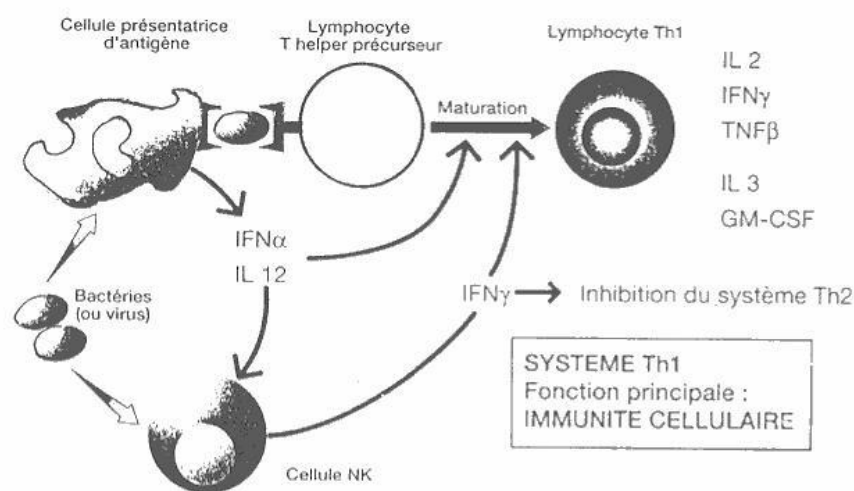
Différentes réponses immunes sont induites par les pathogènes de type 1. Les TLRs reconnaissent les pathogènes de type 1 et provoquent la maturation des DC et la production d'IL-12. Ces réponses mènent à la différenciation Th1 des lymphocytes CD4+ et à la production d'IgG2. Par opposition la différenciation Th2 et la production d'IgE sont le résultat d'une signalisation indépendante des TLRs par les allergènes et les parasites.



**Figure 17 : Orientation Th1 et Th2 de la réponse immunitaire. Par le Pr. Franck Pagès (<http://www.assim.refer.org>)**

## La réponse à médiation cellulaire

Lorsque les DC sont stimulées par la liaison des LPS au MD-2:TLR4, celles-ci vont exprimer davantage de molécules CMH et des molécules de co-stimulation (CD80, CD86) puis subir une maturation. Elles vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires et grâce à ces molécules interagir avec les TCR des lymphocytes T naïfs. Leurs productions de cytokines pro-inflammatoires et d'IL-12, créent un environnement cytokinique responsable de la différenciation des lymphocytes T CD4+ en lymphocytes Th1.



**Figure 18 : Activation de la voie Th1.**

([www.anne.decoaster.free.fr](http://www.anne.decoaster.free.fr)).

Les lymphocytes Th1 se multiplient puis se dirigent vers le site de l'infection. Ces cellules vont sécréter de l'IFN- $\gamma$ , de l'IL-2 et du TGF- $\beta$ . Les fonctions de ces cytokines sont diverses comme la stimulation de la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques, l'activation des macrophages, l'augmentation de leurs capacités phagocytaires et microbicides, l'induction du changement isotypique des IgG en IgG1 et IgG3 (Y. Kawasaki et al. 2004), l'induction d'anticorps opsonisants qui activent efficacement le complément (attention ce sont les IgG2a chez la souris) chez les lymphocytes B, et l'inhibition de la différenciation des lymphocytes T en Th2. Les IgG1 et les IgG3 chez l'homme sont davantage responsables des réponses anticorps contre les antigènes bactériens de nature protéiques, alors que les IgG2 sont plutôt dirigées contre des polysaccharides.



## ***La réponse à médiation humorale***

Les LPS sont des antigènes T-indépendants. Ils ne nécessitent pas de réponse Th pour induire une réponse humorale spécifique. Ils se fixent sur les récepteurs des lymphocytes B matures (BCR) et les activent sans interaction avec un lymphocyte Th2. C'est par leurs chaînes-O et les sucres de leur core qu'ils peuvent interagir avec les BCR. En grande concentration, ils activent les lymphocytes B en se liant au TLR en plus de la liaison au BCR. Une fois l'antigène reconnu, les lymphocytes B se multiplient et se différencient en plasmocytes circulants qui secrètent des anticorps anti-LPS afin de neutraliser les pathogènes et de les cibler pour que les phagocytes les détruisent (opsonisation). Peu de cellules se différencient en cellules B mémoires lors de la reconnaissance d'antigènes T-indépendants. Les lymphocytes B sont aussi des CPA. En internalisant des fragments antigéniques grâce à leur BCR, ils peuvent activer des lymphocytes T CD4+ en les présentant sur leur CMH II.

## ***La mémoire immunitaire***

La mémoire immunitaire permet sur le long terme de déclencher des réponses immunitaires plus rapides et plus efficaces lors de la rencontre d'un agent pathogène déjà connu. Elle est mise en place lors de la multiplication des lymphocytes B et T dès la primo- infection. Lors de l'expansion clonale de chacune des populations, une partie se différencie en cellules mémoires et continuera de proliférer et de circuler dans l'organisme et dans les tissus non-lymphoïdes. La polarisation des cellules T (Th1 pour les LPS) est conservée pour être plus adaptée lors de la nouvelle rencontre avec le pathogène.

### ***d) Les effets des LPS dans l'organisme : activités immuno-modulatrices***

Les LPS, comme mentionnés précédemment, sont des immuno-modulateurs puissants. Ils sont connus principalement pour leurs effets délétères (implication dans les défaillances multiples d'organes lors du choc septique) mais moins pour leurs effets bénéfiques tel que la capacité d'induire une réponse dirigée contre un pathogène. Ces effets, induits par la reconnaissance du MD-2:TLR4,

sont modulés en fonction de leur structure et de leur concentration (Figure 19). Les LPS sont biologiquement actifs à partir de concentrations de l'ordre du picomolaire (Gioannini et al. 2003).

### ***Balance entre la réponse contre les pathogènes et les défaillances multi-organiques***

Les LPS peuvent déclencher une réponse immunitaire soit localement dans les tissus infectés, soit au niveau systémique quand ils sont présents dans la circulation sanguine. Cette réponse de l'hôte complexe, se caractérise par la production de cytokines et de protéines de phase aigüe, l'activation de la coagulation et de l'endothélium, et la modification du métabolisme cellulaire dont la conséquence ultime peut être l'évolution vers un état de choc (Heine et al. 2001).

Lors d'une infection, les bactéries et les LPS qu'elles portent pénètrent principalement les muqueuses intestinales, respiratoires et urogénitales. Les LPS sont les acteurs directs du déclenchement de l'inflammation en produisant un ensemble de cytokines, des ROS, des peptides antimicrobiens, et en induisant l'opsonophagocytose. Ces cytokines et ces ROS sont responsables de l'inflammation dans les tissus et du déclenchement de la fièvre (pyrogénicité). Cette inflammation et ces mécanismes de défense sont nécessaires à la mise en place de la réponse anti-infectieuse immédiate, l'immunité innée, elle-même indispensable au développement d'une immunité adaptative.

Cependant, lors d'infections sévères (péritonite, pneumonie, infection et plaies ouvertes de la peau), une sur-activation des récepteurs MD-2:TLR4 mène à une dérégulation du système immunitaire à cause d'une surproduction de cytokines pro-inflammatoires, de ROS et de facteurs activant les plaquettes. Des lésions tissulaires et cellulaires sont engendrées et elles se manifestent par une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins et de l'hypotension ainsi que la mise en place d'une coagulation intravasculaire disséminée. Ces événements mènent à des défaillances multi-organiques qui peuvent aboutir au sepsis et au choc septique (Heine et al. 2001). Le sepsis est défini comme étant un état inflammatoire accompagnant une infection cliniquement vraisemblable ou bactériologiquement prouvée (50 % des cas) (Drifte et

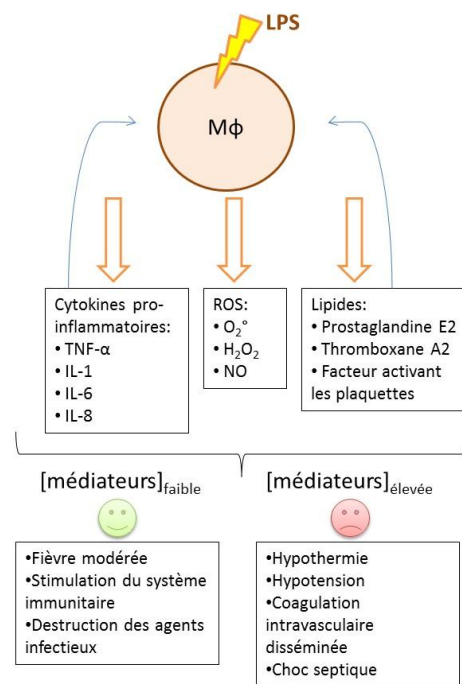
al. 2013). Le foyer septique est le plus souvent d'origine sanguine, neurologiques, respiratoire, ou abdominale. Des stades de gravité croissante sont maintenant universellement adoptés :

1) le sepsis associant une infection, des signes cliniques et des défaillances multi-viscérale (rénale, circulatoire, neurologique, hématologique, respiratoire).

2) le choc septique, la forme la plus sévère l'infection se caractérisant par un sepsis associé à un état dysoxique (lactate sanguin supérieur à 2 mmol/L) avec persistance d'un état de choc malgré des transfusions (Singer et al. 2016).

Le pronostic est d'autant plus sévère que l'état septique progresse : du premier au dernier stade la mortalité augmente de 20% à plus de 50% lors du choc septique (Drifte et al. 2013).

De plus, les LPS disposent d'autres interfaces de passage dans le sang que lors d'infections. En effet, il a été démontré que dans le cadre d'une alimentation riche en graisses, des LPS des bactéries de la flore intestinale passent dans le sang. Ces passages de LPS dans le sang accroissent les phénomènes inflammatoires aboutissant au syndrome métabolique (Cani et al. 2008). Ce passage est aussi possible lors de l'augmentation de la perméabilité intestinale (effort sportif intense, traumatismes) (Sori et al. 1988; Camus et al. 1997; Berg 1999).



**Figure 19 : Balance des activités des LPS entre la réponse contre les pathogènes et le choc septique.**  
MΦ= macrophage.

Les cellules qui répondent le plus aux LPS sont les cellules myélomonocytaires circulantes. Ainsi, plusieurs mécanismes d'élimination des LPS de la circulation sanguine existent pour contrecarrer le passage des LPS dans le sang et protéger l'organisme : des protéines de liaisons aux LPS qui empêchent leurs interactions avec le récepteur MD-2:TLR4 (anticorps, BPI), des enzymes de dégradation (acyloxyacyl hydrolase intra et extra cellulaire des cellules myéloïdes), l'élimination par les cellules du foie qui prélèvent les LPS du sang, ou l'élimination par les chylomicrons (Buttenschoen & Radermacher 2010). Malheureusement, lors d'infection graves ces mécanismes ne sont pas suffisants et des quantités importantes de LPS peuvent passer dans le sang et aboutir au choc septique.

### ***Protection contre l'allergie***

L'asthme allergique et la réponse aux allergènes sont dus à une réponse inflammatoire impliquant les lymphocytes Th2. L'exposition par inhalation aux LPS peut favoriser le phénotype Th1 et la tolérance aux allergènes pendant l'enfance. Cependant, les LPS peuvent aussi avoir des effets néfastes, notamment sur l'aggravation de l'asthme chez les adultes, lorsqu'ils sont inhalés de façon chronique (Reed & Milton 2001). Les relations complexes entre les LPS et l'allergie sont une démonstration supplémentaire de la balance de la réponse aux LPS.

### ***Production de peptides antimicrobiens***

Des LPS peuvent stimuler la production de peptides antimicrobiens par les kératinocytes. C'est le cas des LPS de *Vitreoscilla filiformis* (Cf. chapitre III). Les peptides antimicrobiens vont reconnaître et se lier aux LPS afin d'empêcher l'inflammation due à la sécrétion intense de cytokines pro-inflammatoires ou empêcher la colonisation de la peau par des bactéries pathogènes (Sun et al. 2015). Cette partie sera développée dans « 3) b) La réponse immunitaire cutanée aux endotoxines ».

### ***Opsonophagocytose***

Les LPS solubles ou portés par les bactéries sont reconnus par le MD-2 soluble qui agit alors comme une opsonine. Il se lie ensuite au TLR4 pour déclencher des cascades de signalisation et

mener à la phagocytose des bactéries reconnues. L'opsonophagocytose des bactéries par reconnaissance de leurs LPS est un mécanisme d'élimination et de protection de l'organisme (Tissières & Pugin 2009).

### ***Mitogénicité***

Comme décrit précédemment, les LPS ont la capacité d'induire la multiplication cellulaire des lymphocytes B sans qu'ils interagissent avec les lymphocytes T (Jacobs & Morrison 1975).

### ***Différentiation et maturation cellulaire***

Les LPS induisent la différenciation de plusieurs types cellulaires en cellules matures comme les lymphocytes B et les DC. Ils provoquent une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation ou de présentation des antigènes (CMH).

### ***Effet anti-tumoral***

La sécrétion de TNF- $\alpha$  induite par les LPS est le premier des mécanismes importants découverts dans la mise en œuvre d'un effet anti-tumoral (Carswell et al. 1975). De plus, plusieurs autres mécanismes, comme la capacité qu'ont d'autres cytokines produites après stimulation par des LPS à participer à l'effet anti-tumoral (IFN- $\gamma$ ), ou la capacité des LPS à induire la prolifération des lymphocytes T *in vivo* et différencier les DC immatures, entrent en jeu dans cet effet.

### ***Protection des rayonnements ionisants***

Les LPS ont la propriété d'être radio-protecteurs pour les cellules de la moelle osseuse et les cellules intestinales (Riehl et al. 2004) en favorisant la survie des cellules souches. Cet avantage est obtenu par la sécrétion de plusieurs cytokines (IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) induite par les LPS dans la moelle osseuse et aussi par la production de cyclooxygénase-2 (COX-2) et la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) par les fibroblastes sous-épithéliaux stimulés par les LPS.

### ***Antagonisme de certaines formes de LPS***

L'antagonisme décrit précédemment dans le paragraphe « 2)b)L'influence de la structure des LPS sur l'activation du récepteur MD-2:TLR4 » est une propriété très intéressante de certains LPS pour

bloquer la reconnaissance des LPS agonistes très actifs par le récepteur TLR4 et donc la signalisation cellulaire qui en découle. Par exemple, le lipide A de *Rhodobacter sphaeroides*, le lipide X ou le lipide IV sont des antagonistes naturels. Des antagonistes de synthèse ont été développés comme l'E5531 par Eisai Research Institute of Boston (Andover, MA, USA) qui mime le lipide A de *Rhodobacter capsulatus* et ne présente aucune activité agoniste grâce à ses chaînes d'acides gras courts (10 C). Malheureusement, malgré son efficacité chez les modèles expérimentaux et chez l'homme, le développement de l'E5531 a été stoppé en phase 2 à cause de sa biodisponibilité. L'Eritoran, une autre molécule de synthèse développée par Eisai, mimant le lipide A de *Rhodobacter sphaeroides*, inhibe la dimérisation grâce à la proximité entre une chaîne d'acide gras long (18 C en position C2') et une chaîne d'acide gras court (10 C en C3') (Savva & Roger 2013). L'Eritoran, lors des phases avancées d'essais cliniques, n'a pas montré plus d'efficacité que d'autres traitements luttant contre le sepsis. De plus, il ne s'avère pas pertinent de bloquer la reconnaissance par l'hôte.

### ***Tolérance***

La tolérance peut se définir comme l'acquisition d'une résistance à des injections répétées de LPS *in vivo* ou *in vitro*. Le phénomène de tolérance aux endotoxines s'établit en deux phases. Une phase précoce qui apparaît dans les heures qui suivent et qui s'étale quelques jours après l'injection de LPS, et une phase tardive qui se met en place entre quelques semaines et quelques mois. La phase tardive est spécifique du sérotype des LPS injectés et est due à la production d'anticorps anti-chaînes-O. La phase précoce est aspécifique de la souche bactérienne, elle n'est pas due aux anticorps homologues circulants. Plusieurs paramètres jouent sur l'acquisition de la tolérance par les monocytes et les macrophages *in vivo*, *in vitro*, ou *ex vivo* (cellules prélevées sur des patients injectés avec des LPS ou atteints d'un SIRS) comme le temps entre deux expositions aux LPS et leurs structures. De façon intéressante, un phénomène de tolérance croisée existe. L'injection de LPS peut induire la tolérance à d'autres composés toxiques (lipoprotéines, toxines, acides lipoteichoïques) (Cavaillon et al. 2003).

Nous venons donc de voir que les LPS ont des activités immuno-modulatrices. Ces capacités, peuvent être exploitées et utilisées pour des applications bénéfiques chez l'homme. Pour cela, les LPS doivent être caractérisés et rendus disponibles à grande échelle.

### ***3) La recherche et les applications thérapeutiques des LPS chez l'Homme***

Pour être utilisés à des fins thérapeutiques chez l'homme, les LPS doivent être extraits, purifiés et analysés. Ils sont ensuite exploités pour leurs différentes propriétés. Ci-dessous, nous allons décrire leurs méthodes d'obtention et nous allons développer deux possibilités d'exploitation des activités immuno-modulatrices des LPS.

#### ***a) Les méthodes d'extraction et d'étude structurale des LPS***

Les LPS ont des structures complexes et hétérogènes variant d'une bactérie à l'autre. Les méthodes d'extraction et d'analyses structurales des LPS sont des prérequis indispensables à l'étude de leurs activités biologiques. C'est pourquoi, plusieurs méthodes d'extraction et d'analyses structurales ont été développées pour isoler et étudier les LPS ainsi que les régions osidiques et lipidiques qui les constituent. Ces méthodes sont essentielles pour l'utilisation des LPS et la compréhension de leurs mécanismes d'action visant à être utilisées dans le domaine diagnostique ou thérapeutique. L'analyse structurale des LPS s'opère à différentes étapes de la production des LPS : de l'analyse des LPS directement sur les bactéries à l'étude fine des produits finis.

#### ***Les méthodes d'extraction et de purification des LPS***

Par leur nature amphiphile, les LPS ont tendance à s'agréger. Du fait de la diversité de structure et de ce caractère amphiphile, il existe différentes méthodes d'extraction des LPS. Les LPS représentent 1 à 10% du poids sec d'une bactérie et 75% de la surface de la membrane externe (Neidhardt & Curtiss 1996). Depuis leur découverte, plusieurs scientifiques ont essayé d'extraire et de purifier les LPS en éliminant les 90% des autres constituants. Plusieurs méthodes sont donc

disponibles et elles possèdent chacune des avantages et des inconvénients. Les deux méthodes principalement employées sont la méthode « phénol/eau » (Westphal & Jann 1965) qui est plutôt utilisée pour l'extraction des S-LPS et la méthode « PCP » (phénol/chloroforme/éther de pétrole) (Galanos et al. 1969) qui est quant à elle plus adéquate pour l'extraction des R-LPS.

La méthode au phénol/eau donne de bons rendements de LPS mais extrait également des contaminants car elle casse les bactéries qui libèrent leur contenu cytoplasmique. Elle est adaptée au S-LPS car les R-LPS peuvent fréquemment passer dans la phase phénolique et être perdus (Hickman & Ashwell 1966; Kasai & Nowotny 1967). Par ailleurs, la structure des LPS peut être affectée avec cette méthode, notamment par la perte d'acides gras lors d'étapes de chauffage (Shinichi et al. 1975; Tsang et al. 1974).

La méthode PCP est adaptée pour l'extraction des R-LPS et elle limite la contamination en acides nucléiques et protéines car les bactéries ne sont pas lysées.

En 1973, Chen a mis en place une extraction des Re-LPS à l'aide d'un mélange de chloroforme/méthanol. Ils obtiennent un rendement quatre fois plus important qu'avec l'extraction phénol/eau et des molécules à la pureté et aux activités identiques (Chen et al. 1973).







Plus tard, une méthode d'extraction avec de l'EDTA, comme chélatant, et du SDS a été mise au point pour permettre l'extraction des R- et S-LPS. Cette méthode utilise la presse de French pour casser les bactéries. Cependant pour certaines souches, *Pseudomonas aeruginosa* par exemple, une étape de chauffage à pH alcalin est nécessaire et peut altérer de ce fait la structure des LPS en clivant certains acides gras. Cette méthode lyse les cellules et utilise à plusieurs reprises des quantités d'enzymes importantes afin d'éliminer les contaminants nucléiques et protéiques (R. P. Darveau & Hancock 1983).

Plus récemment, une méthode employant un mélange de phénol/TEA/EDTA a été comparée à la méthode phénol/eau (Ridley et al. 2000). La méthode phénol/TEA/EDTA permet d'extraire davantage



de R- et S-LPS sans lyser les cellules et donc sans libérer d'acides nucléiques et de protéines. Mais, les méthodes utilisant du phénol présentent, en plus de sa toxicité et de ses contraintes de manipulation, la nécessité de longues étapes de dialyse pour l'éliminer.

Dernièrement, la méthode d'extraction brevetée par l'université Paris-Sud (WO Patent 2004/062690 A1) utilisant l'acide isobutyrique et l'ammonium a permis d'éviter l'utilisation de solvants toxiques comme c'est le cas des autres méthodes (phénol, chloroforme, éther de pétrole) et permet l'extraction des S- et R-LPS (Caroff 2004; Marr, Hajjar, et al. 2010). Cette dernière méthode a été utilisée lors de nos manipulations (Figure 20).

	<b>1956</b>	<b>2011</b>
<b>Method</b>	"The Hot Phenol-Water Extraction"	LPS-BioSciences Proprietary Method
 <b>Temperature</b>	⊖ Hot: 65°C	⊕ <b>Room temperature</b>
 <b>Extraction yield</b>	⊖ Partial	⊕ <b>Adaptive yield (+20%)</b>
 <b>Toxicity</b>	⊖ Phenol toxicity	⊕ <b>Non toxic solvents</b>
 <b>Time</b>	⊖ Week time	⊕ 2-3 days
 <b>Quality</b>	⊖ Two phases segregation, molecular <b>alteration</b>	⊕ <b>Single phase extraction molecular integrity</b>
 <b>Environment</b>	⊖ <b>Highly Polluting solvents</b>	⊕ <b>Low Polluting solvents</b>

**Figure 20 : Avantages de la méthode d'extraction à l'acide isobutyrique/ammonium comparée à la méthode au phénol/eau (propriété LPS-BioSciences).**

Quelle que soit la méthode utilisée pour l'extraction et bien que tout soit mis en œuvre pour isoler seulement des LPS, ceux-ci sont donc principalement obtenus dans un état « brut », c'est-à-dire qu'ils sont isolés avec des contaminants (protéiques, lipidiques, phospholipidiques, osidiques et/ou nucléiques). Plusieurs méthodes de purifications sont donc couplées à l'extraction, ou mise en place ultérieurement. Nous pouvons les regrouper en quatre catégories :

- les traitements avec des solvants, qui par différents jeux de solubilité permettent de séparer les LPS d'autres types de molécules (Westphal & Jann 1965; Hirschfeld et al. 2000; Tirsoaga, El Hamidi, et al. 2007);
- les traitements enzymatiques qui visent à digérer les contaminants nucléiques, protéiques et le peptidoglycane (Sambrook et al. 1989; Tirsoaga, Novikov, et al. 2007; 2011; Marr et al. 2008; Grabowicz et al. 2014);
- les purifications chromatographiques d'affinité ou par filtration sur gel qui permettent d'isoler les LPS en jouant sur la différence d'affinité de ceux-ci et des contaminants pour une résine et un éluant, ou sur la différence de taille des LPS par rapport à leurs contaminants (Forsberg & Carlson 1998; Perdomo & Montero 2006).
- les étapes de dialyse qui ont pour but de retenir les LPS dans un boudin de dialyse de seuil adéquat et d'éliminer des sels et des contaminants solubles de plus petites tailles dans le bain de dialyse. Ces derniers passent à travers la membrane du boudin de dialyse pour se retrouver dans le bain de dialyse contrairement aux LPS qui restent piégés dans le boudin car ils sont de trop grandes tailles par rapport aux pores de la membrane de dialyse. Le même résultat peut être obtenu par filtration.

Une purification poussée des LPS utilisés lors de manipulations immunologiques est exigée. Si les LPS utilisés sont contaminés, les analyses des résultats peuvent être faussées par la présence de contaminants actifs. C'est le cas des lipoprotéines, des acides lipoteichoïques ou du peptidoglycane qui sont souvent co-extraits avec les LPS et qui signalent par la voie TLR2 et induisent une production de cytokines (Manthey & Vogel 1994; Tirsoaga, Novikov, et al. 2007; Zähringer et al. 2008).

Pour l'utilisation des LPS comme réactifs de recherche, les sociétés qui commercialisent des LPS, les extraient en grandes quantités par les méthodes phénol/eau ou PCP. Mais tous les LPS ne sont pas disponibles car certains ne s'extraient pas aisément avec ces méthodes du fait de leurs structures

moléculaire et/ou macromoléculaire (agrégation). Il faut savoir que dans tous les cas, lorsque des LPS sont extraits, le produit obtenu est un mélange de différentes espèces moléculaires.

Pour la production, par exemple, du Monophosphoryl Lipid A (MPL®), l'adjuvant de vaccin dérivé de LPS commercialisé par GlaxoSmithKline (GSK), les LPS sont extraits des bactéries par l'usage de solvants organiques (méthanol, chloroforme) en s'inspirant de la méthode de Chen. Les bactéries sont cultivées selon des temps de croissances précis et un exemple de culture en bioréacteur de 2.5 L est donné bien que le brevet stipule que la culture peut être réalisée dans des bioréacteurs de 750 L (Ulrich & Myers 1995; Myers & Snyder 2002). Nous ne savons pas réellement sur quels volumes de culture, les LPS sont extraits en routine. Ils sont détoxifiés par hydrolyse acide après leur extraction. Par la suite, une étape de purification sur colonne échangeuse d'ions est nécessaire. Enfin, les LPS détoxifiés subissent une étape de sonication afin de produire des particules de MPL® de 100 nm de diamètre, plusieurs cycles successifs sont nécessaires. L'appareil traite 50 à 500 mg de MPL® par cycle (Hauser, Voet, Slaoui, et al. 1994). Des recherches sur l'amélioration de la production de MPL® sont en cours afin d'améliorer le rendement. Par exemple 0.210 g de MLPA d'*E. coli* K4 peuvent être produits sans phénol à partir d'une culture de 90 L. C'est, selon les auteurs, la première fois qu'une production de l'ordre du gramme à partir d'un fermenteur est réalisée (Pieretti et al. 2014).

Il est important de maîtriser l'extraction et la purification des LPS à grande échelle pour utiliser ces molécules à des fins thérapeutiques chez l'homme. L'étude de la compatibilité avec l'échelle industrielle du procédé d'extraction breveté (propriété LPS-BioSciences) sera exposée dans le « Chapitre III : Développement d'une macro-méthode d'extraction pour la production de LPS à l'échelle industrielle ». C'est ce procédé breveté qui a été employé pour l'extraction des LPS dans cette thèse.

## ***Les méthodes d'analyses structurales des LPS***

Plusieurs méthodes et techniques sont utilisées pour étudier les structures variables des LPS. Leurs études sont un prérequis indispensable pour comprendre les activités des molécules d'intérêt.

### ***Les technologies couramment utilisées***

La spectrométrie de masse (MS) est un outil puissant pour établir, vérifier et/ou confirmer la structure des LPS, PS ou lipides A. Les structures sont déterminées par la connaissance du rapport masse/charge ( $m/z$ ) des molécules et de leurs fragments. Au début des années 1990, les 1<sup>ers</sup> spectres de LPS ont été obtenus par spectrométrie de masse par désorption par plasma (PDMS) (Caroff et al. 1991). La PDMS était une méthode d'analyse quantitative permettant d'attribuer l'intensité d'un pic à la proportion de molécules présentes dans l'échantillon (Karibian et al. 1993). Elle permettait également de fragmenter les LPS et d'étudier les pics issus de cette fragmentation (PS, lipide A). Actuellement, la spectrométrie de masse par désorption laser (MALDI) est l'une des techniques les plus utilisées. Cette analyse est semi-quantitative et nécessite peu de matériel (de l'ordre du  $\mu\text{g}$ ). Elle permet aussi la fragmentation qui est très utile pour reconstituer la structure d'une molécule entière, mais moins complète que grâce à la PDMS. Le principe de la MS MALDI-TOF est détaillé dans la partie « Matériels et Méthodes ».

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est la seule technique complémentaire à l'analyse chimique et la GC-MS permettant de démontrer la structure des PS composant les LPS (nombre, enchaînement, anomérie, substitution). Une fois la structure des sucres élucidée par RMN pour une espèce bactérienne donnée, nous pouvons utiliser la spectrométrie de masse pour analyser la structure de cette espèce bactérienne. En effet, la RMN est une technique coûteuse et complexe utilisant de grandes quantités de LPS (2-20 mg) (Knirel et al. 2001; Hanuszkiewicz et al. 2008; Wang et al. 2009). L'étude commence fréquemment par une analyse RMN monodimensionnelle du proton du polysaccharide pour déterminer le nombre de protons anomériques et donc le nombre de sucres de chaque sous-unité répétitive. S'ensuivent des analyses homonucléaires en deux dimensions qui

permettent de déterminer la nature des monosaccharides et leurs enchaînements. Des expériences hétéronucléaires en 2D sont utilisées pour déterminer la position de substituants phosphate ou autres.

Il est important de noter que de façon alternative, des expériences de cinétiques de libération du phosphate anomérique de la GlcN I, par des traitements chimiques, ont permis pour déterminer l'anomérisation du phosphate du lipide A de *B. pertussis* (M Caroff et al. 1988). La RMN n'étant pas disponible à cette époque, ce fut la première détermination de l'anomérisation de la GlcN I des lipides A.

La chromatographie en phase gazeuse (GC) permet de connaître le contenu quantitatif et qualitatif en acides gras et en sucres des échantillons. Cette technique sépare des composés volatils et thermiquement stables. Les molécules sont vaporisées dans une colonne contenant une phase stationnaire et sont entraînées par un gaz inerte aussi appelé gaz vecteur. Ce gaz est soit l'azote, l'hélium ou l'hydrogène. Les différentes molécules vont se séparer et être éluées à des temps différents de la colonne en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire. Pour les acides gras, ils sont clivés des LPS entiers par traitement chimique pour être ensuite dérivés (méthylation, acétylation) pour permettre leur vaporisation (Wollenweber & Rietschel 1990). Préalablement, on peut soit libérer la totalité des acides des lipides A afin de connaître la composition totale et leur ratio respectif, soit les libérer séquentiellement et les analyser individuellement (Tirsoaga, El Hamidi, et al. 2007). Pour les sucres, la GC permet de connaître la composition globale d'un échantillon de la même façon que pour les acides gras. Le PS est clivé au niveau des carbones anomériques à l'aide d'HCl/Méthanol puis les sucres sont dérivés avec du triméthylsilyle ou perméthylés ou peracétylés. Ils sont ainsi très volatils et peuvent être vaporisés dans la colonne. Pour connaître la position des liaisons entre les oses, il faut coupler la GC à la MS (Hakomori 1964). Premièrement, tous les hydroxyles des sucres sont méthylés, puis ensuite le PS est clivé à l'acide. Les sucres libérés sont réduits à l'aide de NaBD<sub>4</sub> afin de se retrouver sous forme ouverte, mais ils peuvent aussi être analysés sous forme cyclique, bien que la technique soit moins sensible. Ils sont ensuite peracétylés au niveau des hydroxyles libres, *i.d.* ceux des carbones engagés dans les liaisons et ceux des

extrémités de la forme ouverte. Ils sont rendus volatils, et ils peuvent être injectés dans la colonne. Ils en sont élués alors avec des temps de rétention différents en fonction de leur nature. En sélectionnant un pic, on obtient le spectre de masse des différents fragments du sucre le constituant. En calculant ou en se comparant aux databases (par exemple NIST), on peut identifier la position des liaisons.

### ***Les micro-méthodes d'analyse rapide***

Il est important d'identifier rapidement les structures des lipides A, des PS et des LPS connus. Par exemple pour réaliser les analyses de la structure des LPS de différentes souches, ou pour analyser rapidement l'effet d'un traitement chimique. C'est pourquoi, plusieurs micro-méthodes d'analyse rapides ont été mises en place dans l'équipe à partir de bactéries ou de LPS, elles sont devenues une spécialité reconnue et indispensable à nos recherches. Les descriptions de quatre d'entre-elles sont regroupées sous forme d'un chapitre de livre inséré à la fin du « matériels et méthodes ».

#### ***1. L'analyse rapide du lipide A par MS à partir des bactéries***

Premièrement, l'analyse rapide et directe du lipide A peut s'effectuer à partir d'une petite quantité de bactéries lyophilisées (El Hamidi et al. 2005). Elle se déroule en trois étapes. D'abord, les bactéries sont hydrolysées à chaud avec un mélange d'acide isobutyrique et d'ammonium pour cliver les lipides A des PS. Puis, les lipides A ainsi libérés sont extraits par le mélange de solvants chloroforme/méthanol/eau (CMO), et enfin les extraits CMO sont déposés directement avec de la matrice adéquate sur une plaque compatible avec le spectromètre de masse pour analyser la structure des lipides A. Ainsi, en moins d'une journée, la structure du lipide A d'une bactérie peut être vérifiée par MS si elle a déjà été démontrée et si les acides gras et sucres ont été analysés au préalable.

#### ***2. La détermination de la position des acides gras sur les lipides A***

Une deuxième micro-méthode permet de déterminer la position des acides gras sur les lipides A (Tirsoaga, El Hamidi, et al. 2007). Le principe est de libérer séquentiellement les acides gras des

lipides A à des positions précises avec différents réactifs. Une fois libérés, ils peuvent être identifiés par GC-MS. La structure du disaccharide restant est confirmée en l'analysant en parallèle par MS à chaque étape.

### **3. L'analyse rapide par MS du lipide A et du PS après hydrolyse du LPS**

Enfin, une troisième micro-méthode très utilisée est celle de l'hydrolyse du LPS avec un mélange de triéthylamine-citrate (TEA-CA) (Chafchaoui-Moussaoui et al. 2011). Cette méthode permet d'obtenir rapidement par analyse par MS soit dans le même spectre, soit séparément, la structure des régions lipide A et PS. Le TEA-CA permet la désagrégation et l'hydrolyse douce des LPS. Ce réactif permet aussi d'améliorer la désorption/ionisation et de conserver les résidus labiles. Cette méthode, rapide et sensible, est appropriée pour l'analyse et la comparaison de la structure de plusieurs échantillons. L'analyse de trois lots différents de LPS commerciaux Re595 *Salmonella enterica* Minnesota a été réalisée grâce à cette méthode. Cette application illustre l'importance de vérifier la structure des LPS commerciaux avant de les utiliser pour des manipulations en immunologie. Les résultats de ces manipulations sont intégrés dans la publication insérée à la fin de l'introduction. De plus cette illustration sera complétée par l'usage de la quatrième micro-méthode décrite.

### **4. L'analyse de l'hétérogénéité des LPS Re de *S. Minnesota* par CCM**

Il s'agit d'une analyse par chromatographie sur couche mince (CCM), de l'hétérogénéité de ces différents échantillons, en utilisant un rapport de solvant de migration optimal pour une séparation efficace.

Le développement de nouvelles micro-méthodes s'ajoutant à celles-ci et utilisant les membranes bactériennes sera décrit dans le « Chapitre I ». A l'aide de ces nouvelles micro-méthodes, nous pouvons analyser directement la structure des LPS sur les membranes. Ce développement ouvre les portes à l'analyse directe des LPS au plus proche de leur environnement naturel, c'est à dire au sein des bactéries entières.

## ***b) Deux applications immuno-stimulantes des LPS***

Après avoir extrait et/ou analysé des LPS, leurs activités immuno-modulatrices peuvent être exploitées pour différentes applications. C'est le cas pour certains LPS sélectionnés, notamment pour leur potentiel adjuvant mais aussi pour leurs effets dermatologiques.

### ***La réponse immunitaire cutanée aux endotoxines***

L'épiderme sain dispose d'une microflore cutanée riche et globalement stable dans chacune des régions de la peau. Les bactéries y sont estimées au nombre de  $10^{11}$  (Sender et al. 2016). Ce sont majoritairement des bactéries commensales à Gram positif comme *Staphylococcus epidermidis*. Les bactéries à Gram négatif sont peu présentes naturellement car leur croissance est peu adaptée à la faible humidité et l'importante pression osmotique de la peau. Ces bactéries de la peau nous protègent en sécrétant des peptides antimicrobiens et par compétition en empêchant la colonisation par d'autres bactéries pathogènes (Dunyach-Remy et al. 2015).

La peau est constituée de différentes couches. L'épiderme, qui est la couche superficielle, est un épithélium pavimenteux stratifié et kératinisé. Il est organisé en quatre couches principales en fonction de l'évolution des kératinocytes : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée. Les kératinocytes prolifèrent dans la couche basale puis migrent vers la couche cornée ce qui forme une couche protectrice en contact avec l'extérieur. L'épiderme est composé de mélanocytes, de kératinocytes (90-95%) et de cellules de Langerhans (2-4%). Il ne contient pas de vaisseaux lymphatiques et sanguins, mais de nombreuses terminaisons nerveuses libres. Le derme, couche intermédiaire constituée de fibroblastes, de cellules dendritiques, de lymphocytes T, de macrophages et de mastocytes, est vascularisé. L'hypoderme, couche profonde, est un tissu adipeux traversé par des fibres nerveuses et des vaisseaux sanguins. Les cellules cutanées participent à la défense de l'organisme contre les agressions et infections provenant de l'extérieur. Les cellules les plus importantes sont les kératinocytes et les cellules dendritiques (DC), aussi appelées cellules de Langerhans dans l'épiderme.



Les kératinocytes sont des acteurs majeurs dans la sécrétion de peptides et de protéines antimicrobiens et dans l'initiation de la réponse inflammatoire suite à des agressions physiques ou chimiques en produisant des cytokines et autres messagers solubles (Bardan et al. 2004). Des peptides antimicrobiens sont synthétisés de façon constitutive dans les zones les plus superficielles de l'épiderme (RNASE-7, psoriasine). D'autres sont synthétisés en réponse à l'inflammation ou à l'infection par la partie plus profonde ( $\beta$ -défensines, cathélicidines) et sont plus ou moins spécifiques des bactéries à Gram négatif et/ou à Gram positif (Schröder & Harder 2006). En plus de leurs activités microbicides, certains ont un rôle dans le recrutement des DC et des lymphocytes T sur le site de l'inflammation. Les phénomènes de régulation négative de ces peptides antimicrobiens sont mal connus, il semblerait que certaines cytokines Th2 dépendantes (IL-4, IL-10) inhiberait leur production (McGirt & Beck 2006). Les kératinocytes produisent *in vitro* peu d'IL-1 $\beta$  en réponse aux LPS, mais ils sont capables de synthétiser des peptides antimicrobiens en présence d'IL-1 $\beta$  produite par les cellules de Langerhans (Liu et al. 2003).

Les DC sont présentes sous forme immature dans le derme et l'épiderme. Elles possèdent un rôle clé dans la détection des pathogènes, leur phagocytose, et la présentation de leurs antigènes après maturation et migration dans les ganglions lymphatiques de la peau. Les antigènes induisent la maturation des DC qui vont alors exprimer des molécules de co-stimulation (B7, CD40) nécessaires pour présenter les antigènes aux lymphocytes T naïfs afin de les activer et de déclencher l'immunité adaptative. Les lymphocytes migreront dans la peau en tant qu'effecteur et certains se différencieront en lymphocytes mémoires capables de circuler dans le sang et les différents tissus, dont la peau. Contrairement aux DC du derme qui expriment le TLR4 et répondent efficacement aux LPS, les cellules de Langerhans matures n'exprimeraient pas le TLR4. Ceci pourrait contribuer à la tolérance des bactéries commensales (Van der Aar et al. 2007). Toutefois une autre étude, utilisant un modèle de DC différents, a montré l'expression du TLR4 à la surface des cellules de Langerhans et qu'elles produisaient des cytokines en réponse aux LPS (Rozis et al. 2008).

Les mastocytes du derme, lorsqu'ils sont activés, libèrent des substances vaso-actives mais aussi des médiateurs de l'inflammation (héparine, histamines, facteurs chimiotactiques) qui vont recruter des cellules de l'inflammation.

Ce sont les différentes cytokines et chemokines produites par les différents acteurs qui activent les cellules endothéliales des vaisseaux afin qu'elles expriment des molécules d'adhésion permettant le passage des leucocytes recrutés dans les tissus.

Des études ont montré la capacité de certains LPS, comme ceux présents dans la biomasse de *Vitreoscilla filiformis*, à conduire à une augmentation de la sécrétion de peptides antimicrobiens. Ceci a été exploité dans des traitements de la dermatite atopique (Mahe & Martin 2008). La dermatite atopique est une inflammation cutanée liée à une barrière épithéliale altérée et un trouble des défenses immunitaires de la peau (Hata & Gallo 2008). Les allergènes sont donc capables de pénétrer dans l'épiderme. Cette maladie est dans un premier temps caractérisée dans les phases aiguës par une forte polarisation Th2 induite lors des agressions par des virus, allergènes, ou bactéries sur la peau. Elles engendrent la production de cytokines inflammatoires (IL-4, IL-5, IL-13) entraînant la production d'IgE et une augmentation du nombre d'éosinophiles, qui sont deux composantes de la réponse allergique. Lors de ce déséquilibre Th1/Th2, les kératinocytes sont moins aptes à produire des peptides antimicrobiens conduisant ainsi à une colonisation bactérienne de la peau. S'ensuit une phase chronique, davantage caractérisée par une réponse Th0, c'est-à-dire des lymphocytes qui secrètent un mélange de cytokines (IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ ) et qui seront différenciés après activation, et une réponse Th1. Les activités et la structure des lipides A des LPS de *V. filiformis* seront précisés dans le « Chapitre II : Etude de la structure du lipide A et des activités inflammatoires des LPS d'une bactérie non-pathogène ».

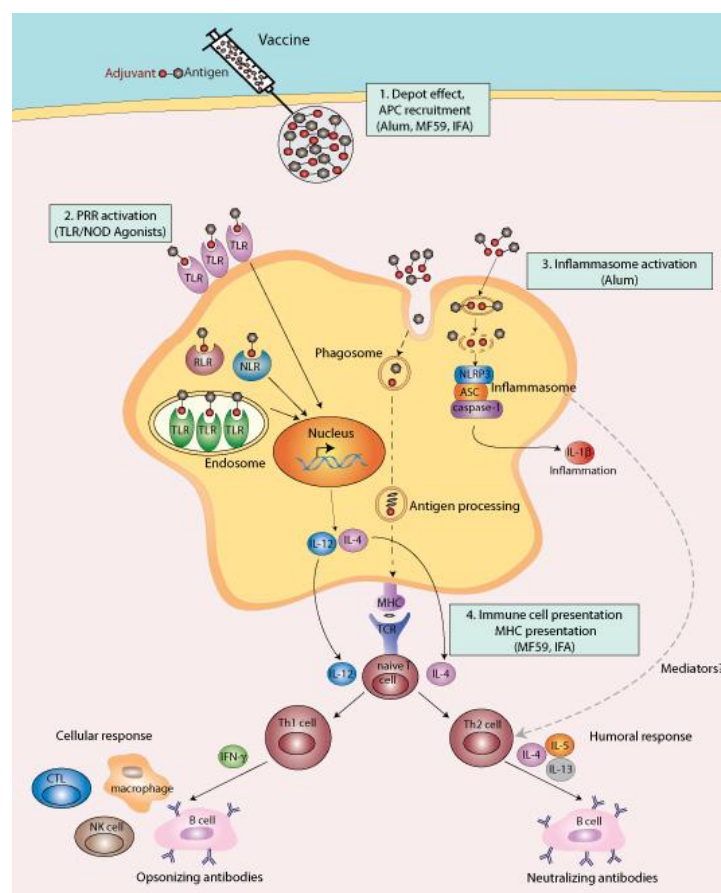
### ***L'utilisation d'adjuvants dans les vaccins humains***

Une deuxième application immuno-modulatrice des LPS est l'exploitation de leur pouvoir adjuvant. Des dérivés de LPS, comme le MPL<sup>®</sup>, sont actuellement utilisés comme adjuvants de

vaccins. Un adjuvant est une substance qui stimule, renforce, module ou prolonge la réponse immunitaire à un antigène.

La vaccination a pour but de mimer une infection afin de mettre en place une première réponse immunitaire qui permettra de déclencher une seconde réponse plus réactive et plus efficace lors de la rencontre avec l'agent pathogène, et ceci grâce à la mémoire du système immunitaire. Du fait de leurs effets secondaires, les vaccins à germes entiers inactivés ou atténués sont délaissés au profit du développement de vaccins à sous-unités, peu immunogènes mais nécessitant de puissants adjuvants.

Les adjuvants de vaccins sont définis comme des composants ajoutés aux antigènes pour les rendre plus immunogènes. Ils sont essentiels pour augmenter la réponse immunitaire adaptative. Les adjuvants ont différents modes d'action en fonction de leur nature (Awate et al. 2013)(Figure 21).



**Figure 21 : Les différents modes d'action des adjuvants de vaccins.**  
(www.InvivoGen.com).

Ils peuvent agir par immuno-modulation, c'est-à-dire en sur-régulant le réseau de cytokines, ce qui va permettre d'activer soit la réponse Th1, soit la réponse Th2. Pour cela, ils se fixent sur des PRR

à la surface des CPA. Ils peuvent aussi jouer sur la présentation de l'immunogène dans le but de le présenter de façon appropriée (conformation native) aux effecteurs du système immunitaire. Ils peuvent permettre l'induction des lymphocytes T cytotoxiques en facilitant l'incorporation ou la persistance des peptides immunogènes dans les CMH. Enfin, ils peuvent être responsables d'un effet dépôt qui va moduler la durée de présence de l'immunogène suite à son administration et donc son efficacité.

Il existe actuellement 5 types d'adjuvants sur le marché (O'Hagan & De Gregorio 2009; Mohan et al. 2013; Lee & Nguyen 2015):

- **les sels d'aluminium**, aussi appelés Alum, sont principalement des sels d'hydroxyde ou de phosphate d'aluminium. Ils ont été découverts en 1926, en constatant que la toxine diphtérique était plus immunogène dans des précipités de sels d'aluminium que seule (Glenny et al. 1926). Ils sont liés à l'immunogène par liaisons électrostatiques et permettent principalement une réponse Th2 forte, ce qui cible efficacement les pathogènes extracellulaires. C'était d'ailleurs le seul adjuvant approuvé aux USA jusqu'en 2009. Son avantage clé est d'avoir été utilisé pendant plus de 70 ans et d'avoir ainsi un dossier de sécurité prouvé (WHO 2008). Son mode de fonctionnement le plus connu est qu'il crée un effet dépôt au site de l'injection, permettant ainsi un maintien et une libération plus longue de l'antigène (effet de rappel). D'autres fonctions lui sont désormais attribuées : l'activation de l'inflammasome NLRP3 permettant la sécrétion d'IL-1 $\beta$  ce qui active le recrutement cellulaire (Franchi & Núñez 2008), et l'interaction avec les lipides membranaires des DC pour activer des voies de signalisation inhibant la sécrétion d'IL12p70 (cytokines influençant la différenciation des LT naïfs vers un phénotype Th1).
- **le MF59** (Novartis®) est le deuxième adjuvant mis sur le marché après l'Alum. Il a été accepté en premier par l'Italie en 1997 avec un vaccin contre la grippe. Depuis, plus d'une vingtaine de pays l'utilise. Cette émulsion huile-dans-eau contient du squalène et ne fonctionne pas par effet dépôt. Le MF59 augmente le recrutement des cellules immunitaires sur le site de l'injection afin que l'antigène

soit internalisé et acheminé dans les organes lymphoïdes secondaires. Il permet aussi, entre autres, l'augmentation de l'expression des CMH II à la surface des DC.

- **l'AS03** (GSK®) est aussi une émulsion huile-dans-eau contenant du squalène et à laquelle de l'α-tocophérol a été ajouté. Il a été mis sur le marché en 2009 en Europe dans des vaccins grippaux. Il a un grand pouvoir immunostimulant, ce qui a permis d'économiser de grandes quantités d'antigène dans les vaccins Pandermix™. Il n'a été approuvé qu'en 2013 par les États-Unis.
- **l'AS04** (GSK®) mis sur le marché en 2005 en Europe est une combinaison de Monophosphoryl Lipide A (MPL®) et de sels d'aluminium. Il a ensuite été approuvé aux États-Unis en 2009. Le MPL® est la partie lipide A détoxifiée des LPS de *Salmonella enterica* Minnesota Re595. Cet adjuvant stimule le TLR4, la production de cytokines au site de l'injection, le recrutement des CPA qui vont présenter l'antigène dans les organes lymphoïdes secondaires et produire une réponse Th1 (Didierlaurent et al. 2009). L'AS04 est incorporé dans deux vaccins : le Cervarix® contre le papillomavirus humain (HPV) et le Fendrix® contre l'hépatite B pour des patients hémodialysés. Le MPL® est aussi présent, sans aluminium, dans le vaccin Pollinex quatre® (Allergy Therapeutic Ltd.) approuvé en Europe, et en étude pour être approuvé aux États-Unis. Quatre injections sous-cutanées préviennent efficacement la rhinite allergique grâce à l'induction d'une réponse Th1 qui tempère l'excès de la réponse Th2 dans ces cas allergiques (Rosewich et al. 2013).
- **les virosomes** sont des enveloppes qui miment celles des virus mais ne contiennent pas leur ADN. Ils ne peuvent donc pas se répliquer. Ces structures qui ont à la fois le rôle d'antigène et celui d'adjuvant ont été mises sur le marché en 2000. Les virosomes permettent une présentation de l'antigène de façon conforme et identique à celle du virus natif et ils induisent des réponses cellulaires B et T. Ils agissent aussi en effet dépôt et induisent la sécrétion de cytokines. Leur fabrication est complexe et coûteuse. Actuellement, les virosomes sont utilisés dans des vaccins grippaux (Inflexal V™- Crucell® en Europe ; Invivac™-Solvay®) et contre l'hépatite A (Epaxal™-Crucell® en Europe, Asie, Amérique du Sud). Ils présentent l'avantage de ne pas contenir de sels d'aluminium

et ils sont compatibles avec des populations spécifiques (enfants, immunodéprimés, personnes âgées).

D'autres adjuvants sont en développement et d'essais cliniques (Rappuoli et al. 2011; Lee & Nguyen 2015). Voici les plus étudiés :

- **de nombreux agonistes** de TLR (Flagellin -TLR5 ; CpG -TLR9 ; Poly I:C - TLR3 ; Pam3cys -TLR2 ; imidazoquinolines – TLR7 et TLR8) qui fonctionnent sur le même principe que le MPL<sup>®</sup> par l'activation de l'immunité innée *via* les PPR.
- **des ISCOM** (Immune Stimulating COMplexes), qui sont des structures lipidiques de transport sous forme d'anneau complexant des saponines, du cholestérol, des phospholipides et des antigènes. L'adjuvant prometteur QS-21 composé de saponine est pour le moment encore en développement et présente quelques problèmes de toxicité. Une deuxième génération aussi en phase d'étude clinique appelée ISCOMATRIX ne contient pas, quant à elle, d'antigènes complexés. Ceux-ci sont ajoutés séparément dans le vaccin. Leurs avantages sont l'induction de fortes réponses Th1 et Th2, la promotion d'une bonne présentation de l'antigène et l'activation d'une excellente réponse en lymphocytes T cytotoxiques.
- **des liposomes**, sont des vésicules formées de plusieurs bicouches lipidiques concentriques. Elles contiennent un cœur aqueux et peuvent avoir des charges et des tailles variées. Ce sont des vecteurs qui vont délivrer les antigènes, si l'antigène est au cœur du liposome (effet dépôt), ou les présenter aux CPA, si l'antigène est inséré dans la bicouche lipidique. En fonction de leurs tailles et charges, ils vont plutôt stimuler une réponse Th1 ou Th2 (Brewer et al. 1998).
- Enfin, des **combinaisons d'adjuvants** (GSK<sup>®</sup>) mélangent différents adjuvants de natures différentes (sels d'aluminium, saponine, émulsions, immunostimulateurs) pour ajuster la réponse adaptative contre les pathogènes. Le système AS01 combine MPL<sup>®</sup>, QS-21 et liposome, tandis que le système AS02 correspond à l'AS03 supplémenté de MPL<sup>®</sup> et QS-21. L'AS02 est caractérisé par de forts taux d'anticorps et déclenche une réponse Th1 forte grâce au MPL<sup>®</sup> et malgré quelques problèmes de réactogénicité, des essais cliniques de vaccins contre la malaria, la tuberculose, le HIV, le HBV et le

HPV sont menés. L'AS01, induit une forte réponse Th1, de forts taux d'anticorps et améliore la présentation des antigènes aux CPA. Le développement d'adjuvant contenant du squalène est délicat, cette molécule est suspectée d'induire des réactions auto-immunes chez la souris et le rat bien qu'aucun cas ne soit avéré chez l'Homme (Carlson et al. 2000; Satoh et al. 2003; Pellegrini et al. 2009).

### ***La nécessité de développer de nouveaux adjuvants***

Depuis son introduction, la vaccination a permis d'éradiquer ou de diminuer diverses infections à travers le monde. Son succès est démontré par l'éradication de la variole et à compter des années 1960 par la diminution impressionnante des cas de poliomyélite après la mise en place de la vaccination. Cette maladie est éradiquée de plusieurs régions du globe, principalement dans les pays industrialisés. Aussi, il ne faut pas oublier que la vaccination est un acte collectif, elle permet en effet de protéger par effet de groupe les personnes non-vaccinées (comme les nourrissons ou les personnes immunodéprimées). Paradoxalement, de plus en plus de méfiance et de refus de la vaccination apparaissent au sein de la population. Ceci est probablement dû au fait que la prévalence de nombreuses maladies a chuté (Tableau II), que les risques d'épidémies ou de maladies sont mal connus, et également par le fait que de rares complications peuvent se produire (Jacobson 2003).

**Tableau II: Maladies prévenues par les vaccins viraux avant et après vaccination aux Etats-Unis (S. Plotkin).**

<b>Maladie</b>	<b>Nombre avant vaccin (année)</b>	<b>Nombre en 1997</b>	<b>% réduction</b>
Poliomyélite	21 269 (1952)	0	-100 %
Rougeole	894 134 (1941)	135	-99,98 %
Rubéole	57 686 (1969)	161	-99,72 %
Rubéole congénitale	20 000 (1964-1965)	4	-99,98 %
Oreillons	152 209 (1968)	612	-99,60 %

Ce sont d'ailleurs principalement les polémiques liées aux adjuvants de vaccins qui alimentent les groupes d'opposants à la vaccination. L'Alum est la principale cible de ces opposants. Pour comprendre le bien-fondé de cette méfiance, l'académie de pharmacie a publié un rapport en Mars

2016 sur les adjuvants contenant de l'aluminium (Conseil de l'Académie nationale 2016) en reprenant des études depuis l'année 2000. Les conclusions sont les suivantes :

- l'utilisation des dérivés de l'aluminium comme adjuvants de vaccins est sûre et efficace, mais elle soulève quelques interrogations sur la pharmacologie et les effets indésirables.
- aucune preuve de toxicité neurologique n'est imputable à l'aluminium de l'alimentation ou des vaccins. La dose minimale de risque fixée est de 1 mg/kg/jour et la limite est de 0.6 mg d'aluminium dans un vaccin (voie intramusculaire).
- pour la myofasciite à macrophage, une maladie correspondant à des lésions musculaires infiltrées de macrophages qui est suspectée d'être une conséquence de l'aluminium dans les vaccins, elle « n'est qu'exceptionnellement rapportée chez les enfants et les nourrissons, populations les plus exposées à l'aluminium par la vaccination, en particulier dans les pays (États-Unis par exemple) qui ont, ou ont eu, des schémas vaccinaux comportant un plus grand nombre d'injections ». De plus ces symptômes sont rencontrés dans d'autres cas pathologiques.

Malgré le succès de la vaccination et ses controverses, le développement de nouveaux vaccins est nécessaire afin de lutter contre des pathogènes nouveaux ou réémergents et pour améliorer les vaccins existants. Récemment, des émergences ou réémergences de plusieurs maladies ont eu lieu: le SARS (syndrome respiratoire aigu sévère) en 2003, la coqueluche depuis les années 2000 (Schwartz et al. 2016), la grippe H1N1 en 2009 ou encore l'épidémie Ebola en 2014.

Actuellement, les objectifs à atteindre pour les futurs adjuvants sont les suivants : diminuer le nombre de rappels vaccinaux, diminuer la quantité d'antigène utilisée (pour diminuer les coûts mais aussi les effets indésirables) et orienter la réponse immunitaire vers la voie la plus adaptée au pathogène (Th1 ou Th2). Egalement, il faut rendre possible la confection de nouveaux vaccins (SIDA, Malaria, Tuberculose).



### ***Les LPS, de bons candidats adjuvants ?***

Dans les années 50, la capacité des LPS à induire des anticorps en réponses primaires et secondaires à des différents antigènes a été découverte. L'injection de LPS devant s'effectuer sous 24h par rapport à l'antigène. Cette protection fait intervenir les lymphocytes T helper et c'est une marque de l'activité adjuvante des LPS (McAleer & Vella 2008). Cependant, les LPS actifs natifs sont toxiques et doivent subir des étapes de détoxification pour être utilisés chez l'homme, comme pour le MPL®. Ces modifications structurales peuvent être effectuées par génie génétique, par modification chimique ou par synthèse de nouvelles molécules. Des molécules dérivées de LPS sont en développement. Ce sont majoritairement des lipides A modifiés. Elles peuvent être détoxifiées par suppression d'acides gras, par déphosphorylation, par modification du disaccharide de GlcN, ou par inclusion dans des liposomes (Fox et al. 2010; Dunn-Siegrist et al. 2012). Entre autres, plusieurs essais d'adjuvants produits par mutations sont en cours (Zariri & van der Ley 2015).

Comme discuté dans la partie « La réponse immunitaire innée aux LPS » les LPS sont plus actifs que leurs lipides A associés. Les LPS agissent de la même façon que le MPL® sur l'expansion clonale, la division et la survie cellulaire des lymphocytes T CD4+ aux stades précoces. Ils stimulent l'activation de cellules Th1 sécrétant de l'IFN- $\gamma$ . Sur un plus long terme, les LPS permettent un meilleur maintien du nombre de cellules dans cette population Th1 (Thompson et al. 2005).

On peut s'attendre à obtenir des LPS détoxifiés plus actifs que le MPL®. Ainsi, la confection de vaccins dont les antigènes sont difficiles à adjuver ou qui nécessitent de diminuer les quantités d'adjuvants à incorporer serait possible. Il ne faut pas oublier que les LPS entiers contiennent un core et parfois une chaîne-O, et que ces éléments apportent aussi des avantages aux LPS : une meilleure solubilité, la possibilité de greffer des antigènes sur leurs sucres et/ou la possibilité d'utiliser ces sucres directement comme des antigènes couplés naturellement à l'adjuvant dans le cas de vaccins contre des infections bactériennes à Gram négatif.

Enfin, à terme, un des objectifs serait de remplacer l'Alum car il est responsable d'une orientation Th2 de la réponse immunitaire qui n'est actuellement pas recherchée pour les vaccins futurs. De plus, il est source de réticences et de controverses qui affectent le processus de vaccination de la population. Dans le « Chapitre IV : Etude des activités pyrogènes et immuno-stimulantes *in vitro* et *in vivo* de LPS modifiés chimiquement » nous verrons la mise en place des premiers tests à effectuer pour évaluer le potentiel de LPS détoxifiés en tant qu'adjuvants de vaccins.

## ***II- Présentation des travaux de thèse et objectifs***

L'évolution a permis la sélection des bactéries les plus avantageées pour la survie. Les bactéries pathogènes spécifiques pour l'homme, les plus résistantes et les plus virulentes sont celles qui se développent le mieux et échappent aux mécanismes de reconnaissance du système immunitaire humain. Les LPS ont des structures variables qui confèrent des avantages aux bactéries pathogènes en leur permettant de s'adapter aux changements environnementaux et à échapper par modifications structurales à la reconnaissance par le système immunitaire. L'étude des relations structure-activité des LPS permet de comprendre l'évolution bactérienne et des risques pour la santé.

Dans cette thèse nous verrons que certains LPS, aux structures naturelles ou modifiées, confèrent des bénéfices et aident à l'activation du système immunitaire humain. L'intérêt est porté sur l'utilisation, chez l'homme, des activités immuno-modulatrices des LPS. C'est grâce à celles-ci que les LPS peuvent avoir diverses applications au sein de produits pour leurs capacités à déclencher des mécanismes de réponse immunitaire contre les pathogènes. Ils peuvent donc, une fois détoxifiés, être inclus dans des préparations dermatologiques/cosmétiques ou encore dans des vaccins en tant que compléments antigéniques ou adjuvants. Ils peuvent aussi être exploités dans des tests de diagnostic afin d'identifier rapidement des espèces bactériennes.

Pour employer des LPS dans diverses applications, la connaissance de leur structure moléculaire est indispensable. Une micro-méthode d'étude rapide de la structure des LPS sur des membranes bactériennes isolées est en cours de développement dans le but d'identifier rapidement une espèce bactérienne. Ces manipulations prennent part au projet « Andromède » réalisé en collaboration avec les Physiciens de l'Institut de Physique Nucléaire d'Orsay. Ultérieurement, ces travaux pourront aboutir à des applications de tests de détection. Une deuxième micro-méthode a été développée à partir des membranes bactériennes isolées pour l'étude des parties lipides A et PS des LPS. Ces deux micro-méthodes sont décrites dans le chapitre I.

Les relations entre les structures et les activités de LPS contenus dans un lysat de bactéries non-pathogènes utilisé en dermatologie/cosmétologie seront aussi détaillées. Les LPS, issus de ces bactéries, sont des principes actifs du lysat et aident à traiter la dermatite atopique. Les relations structures-activités de ceux-ci seront comparées à d'autres LPS standards dans le chapitre II, soulignant l'importance de vérifier les structures des LPS utilisés lors des manipulations immunologiques.

Pour utiliser les LPS dans des applications pharmaceutiques, il faut être capable de les produire en quantité suffisante. Ce volet sera décrit dans le chapitre III avec l'exemple de la production difficile et à grande échelle des LPS d'*E. coli* O157:H7 au sein de la société LPS-BioSciences. Des possibilités d'amélioration, de la méthode d'extraction actuellement utilisée par la société, seront étudiées pour rendre possible la production à grande échelle. Les contraintes réglementaires de ce processus appliqué à la production de composés vaccinaux seront aussi étudiées dans ce chapitre.

Enfin, pour des applications adjuvantes, l'élaboration d'un plan de validation des activités non-pyrogènes et adjuvantes de dérivés de LPS sera exposée dans le chapitre IV. Ce chapitre fait partie du projet « Adjuvant » de la société LPS-Biosciences commencé antérieurement à ce travail. Pour des raisons de confidentialité, les méthodes de production de ces molécules, leurs structures et les résultats de leurs activités ne seront pas communiqués. Cependant, un exemple avec deux LPS non-modifiés viendra illustrer les tests réalisés et le type de résultats obtenus.

Au travers de ces quatre chapitres, nous verrons comment l'analyse structurale des LPS est indispensable à l'étude de leurs analyses biologiques et à la compréhension de leurs activités pour des applications thérapeutiques.

## ***Les objectifs de la thèse***

Dans le cadre de la convention CIFRE entre l'équipe « Endotoxines, Structures et Activités» de l'I2BC et la société LPS-BioSciences, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- 1) Développer une méthode d'analyse structurale rapide des LPS, et de leur région polysaccharide et lipidique afin de confirmer rapidement leur structure déjà décrites dans la littérature (chapitre I).
- 2) Etudier les relations structures-activités des LPS décrits comme « non-toxiques » d'une bactérie non-pathogène utilisés en dermatologie et les comparer à d'autres LPS d'intérêt (chapitre II).
- 3) Améliorer la méthode d'extraction des LPS (propriété LPS-BioSciences) afin de produire des lots de LPS de 500 mg à 1 g dans les locaux actuels de la société. La faisabilité de l'extraction à grand échelle étant un prérequis nécessaire au développement de dérivés de LPS en tant qu'adjuvants de vaccins. Accompagner cette amélioration par l'étude de la compatibilité de cette méthode d'extraction avec la réglementation, notamment dans le domaine des vaccins (chapitre III).
- 4) Mettre en place des tests d'étude des activités pyrogènes et adjuvantes de LPS-modifiés. Ces modifications chimiques, réalisées suivant le protocole établi préalablement à la thèse par le Dr Alexey Novikov de la société LPS-BioSciences, ont pour but de les détoxifier pour éliminer leur activité pyrogène et de ne garder que leur pouvoir adjuvant. Ces tests sont réalisés dans l'objectif d'aboutir à la preuve de concept préclinique que ces LPS-modifiés sont aptes à être utilisés dans des préparations comme adjuvants de vaccins (chapitre IV).

Cette thèse est à l'interface de la biochimie, de l'immunologie, et du domaine industriel en s'appuyant sur l'expertise et le savoir-faire de la société LPS-BioSciences (industrie) et de la recherche académique (biochimie, spectrométrie de masse, immunologie).

### ***III - Matériels et Méthodes***

#### ***1) Appareils***

- Centrifugeuses : les centrifugations ont été effectuées avec les centrifugeuses réfrigérées Beckman Coulter Avanti JE, DJB Labcare Hettich Universal 32 R, CR.4.22 de Jouan et les centrifugeuses de paillasse non-réfrigérées Eppendorf®.
- Ultracentrifugeuses : les ultracentrifugeuses réfrigérées Beckman Coulter Optima TLX-80 (rotors Ti70 et Ti45) et Beckman Coulter Optima TL (rotor TLA.110) ont été utilisées.
- Spectrophotomètres : les mesures de D.O. ont été réalisées grâce au spectrophotomètre Nanovue™ GE Healthcare, version 4282 V1.7.3 puis avec le Denovix DS-11 à partir de novembre 2015.
- Bain à ultrasons : les solutions ont été homogénéisées dans un bain à ultrasons Fisherbrand FB 11022.
- Sonde à ultrasons : les sondes de diamètre 1/8'' 3 mm (stepped microtip) et 1/2'' 13 mm (standard probes) reliées au processeur à ultrasons VC250 vibra-cell 220V 3A 250W de sonics & Materials ont été employées pour lyser les bactéries.
- Désintégrateur de cellules « one shot » : le broyeur cellulaire de Constant Systems possède une pression de travail allant de 300 à 2700 bars et peut traiter de 0.5 à 8 ml d'échantillon par cycle. Il a été utilisé pour lyser des bactéries lyophilisées reprises dans de l'eau.
- Vibro-broyeur : l'appareil Retsch-MM 2000 de Roucaire Instruments scientifiques a été utilisé pour agiter des tubes Eppendorf® contenant des bactéries reprises dans de l'eau et mélangées à des billes en verre.
- Dispositifs de filtration : les filtrations ont été réalisées avec des filtres Whatman GF/D posés sur un verre fritté de porosité de type 1.
- Thermomixeurs : des blocs Eppendorf® Thermomixer Compact ont été utilisés pour chauffer jusqu'à 100°C et/ou agiter jusqu'à 1000 rpm des tubes Eppendorf®.

- Dessiccateur : le dispositif PC Nalgene® relié à une trompe à eau a servi pour engendrer un vide partiel et sécher des petits volumes. Un pot contenant de la potasse est présent dans l'enceinte Nalgene® pour améliorer la dessiccation.
- Lyophilisateur : la lyophilisation des échantillons a été effectuée dans le lyophilisateur Cosmos-80 de chez Cryotec après leur congélation.
- Plaque chauffante : la plaque TLC Plate Heater III de chez Camag® a été employée pour révéler les CCM.
- Dispositifs de migration des gels SDS-PAGE : les dispositifs BioRad Mini-Protean Tetra Cells® ont été utilisés pour les migrations des gels SDS-PAGE.
- Microscopes : les cellules humaines en culture ont été observées à l'aide des microscopes Olympus BH-2 10x/20L avec les objectifs x10 x40 x100 et x160 (immersion), et Olympus Tokyo CK10x avec objectif x10.
- Lecteur de plaques : le multiskan EX Labsystems® et le logiciel associé Ascent software for multiskan ont été utilisés pour mesurer les densités optiques des plaques de 96 puits. Les logiciels OriginPro et Excel ont été utilisés pour réaliser les graphiques.
- Spectromètres de Masse : les expériences de MALDI-TOF ont été réalisées sur deux appareils. Il s'agit de l'appareil Voyager STR PerSeptive Biosystem associé au logiciel Voyager et du spectromètre de masse Shimadzu Axima Performance System. Le traitement des spectres de masse a été effectué avec les logiciels : Data Explorer TM, Shimadzu Biotech MALDI-MS, et OriginPro. Les expériences TOF-SIMS V (ION-TOF) ont été accomplies par les Physiciens dans le cadre du projet Andromède avec l'Institut de Physique Nucléaire d'Orsay, et au Liban (LAEC, Beyrouth). Les spectres ont été traités avec le logiciel mmass.
- Cytomètre en flux : le cytomètre Attune Acoustic focusing Cytometer® (Thermofisher scientific), situé à l'hôpital Bicêtre, a été utilisé pour réaliser les mesures de cytométrie. Les données ont été analysées avec les logiciels : Attune cytometer software et Excel.

- Microscopie électronique à transmission (MET) : les images de MET proviennent de la plateforme de l'I2BC Image-Gif située à Gif-sur-Yvette. Ces images ont été prises par le microscope station JEOL 1400 120kV.
- Logiciel Chemdraw : il a permis les dessins des structures.
- Purificateur d'eau : sauf mention contraire, le système de filtration/déionisation Milli-Q (Merck Millipore®) avec une résistivité de 18.2MΩ.cm à 25°C et un COT<5 ppb a fourni l'eau utilisée dans toutes les expériences sauf mention contraire d'utilisation d'eau apyrogène (Lonza).

## 2) Matériel biologique

**Tableau III: Caractéristiques des bactéries dont les LPS ont été utilisés dans ces travaux.**

<i>Espèce</i>	<i>Pathogénicité</i>	<i>Origine</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Agent de la coqueluche chez l'Homme</i>	<i>Voies respiratoires de l'homme</i>
<i>Bordetella holmesii</i>	<i>Agent d'infections respiratoires chez l'Homme</i>	<i>Voies respiratoires de l'homme</i>
<i>E. coli J5</i>	<i>Non</i>	<i>Intestins des mammifères</i>
<i>E. coli O157 :H7</i>	<i>Colite hémorragique, syndrome hémolytique et urémique (ou syndrome du hamburger) chez l'Homme</i>	<i>Intestins des mammifères, principalement les bovins</i>
<i>Salmonella enterica</i>	<i>Salmonellose chez l'Homme, le chat, le hamster</i>	<i>Bétail, volailles</i>
<i>Haemophilus influenza</i>	<i>Otite, sinusite, conjonctivite, pharyngite chez l'homme</i>	<i>Voies respiratoires de l'homme</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Opportuniste pour l'homme</i>	<i>Sols et milieux humides (robinets, bouchons)</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Agent de la rhinopharyngite et de la méningite</i>	<i>Rhinopharynx de l'homme</i>
<i>Rhodopseudomonas gelatinosa</i>	<i>Non</i>	<i>Sols, boue</i>
<i>Vitreoscilla filiformis</i>	<i>Non</i>	<i>Lac Erie (Amérique du Nord), sources d'eau chaudes</i>

### a) Bactéries

- *Bordetella holmesii* et *Bordetella pertussis* 1414 : ces bactéries ont été données à Martine Caroff pour ses études au sein de l'équipe académique puis au sein de la société LPS-BioSciences par Nicole Guiso de l'Institut Pasteur (Paris, France). Elles ont été utilisées dans le cadre de l'analyse structurale des LPS sur les membranes bactériennes (chapitre I).



- *Escherichia coli* J5 :
  - Cultivées au laboratoire : les bactéries de la souche ATCC® 43745™ ont été cultivées dans du milieu LB (Lysogeny Broth) à 37°C sous agitation toute la nuit dans des erlenmeyers de 1 à 2 L. Elles ont ensuite été centrifugées 10 minutes à température ambiante (T.A.) à 2000 g puis le culot a été lyophilisé.
  - Cultivées à grande échelle: les bactéries de la souche ATCC® 43745™ ont été cultivées soit en milieu LB soit en milieu TSB (Tryptic Soya Broth) à 37°C, 20% oxygène, pH 7, sous agitation en bioréacteur de 10 L par un prestataire externe pour la société LPS-BioSciences. Elles ont été tuées, puis centrifugées, avant d'être expédiées congelées. Dès réception, elles ont été lyophilisées.
- *Escherichia coli* O157:H7 : les bactéries de la souche NRCC® 4125™ ont été achetées par la société LPS-BioSciences. Elles ont été cultivées par un prestataire externe, désactivées, puis lyophilisées avant d'être réceptionnées par la société.

## ***b) LPS***

- *Bordetella pertussis* 18-323 : les bactéries ont été fournies par le département de microbiologie & immunologie de l'université de Vancouver, British Columbia (Canada). Pour mes manipulations, le docteur Alexey Novikov (LPS-BioSciences) m'a donné les LPS qu'il a préalablement purifiés.
- *Bordetella pertussis* 1414 : des LPS bruts provenant de bactéries cultivées à l'Institut Mérieux (Lyon) et extraits dans l'équipe « Endotoxines, Structures et Activités » ont été purifiés par mes soins selon les techniques de purification décrites dans la partie méthodes - extraction et purification des LPS.
- *Rhodopseudomonas gelatinosa* : les LPS ont été donnés par la Société LPS-BioSciences puis purifiés par moi-même.

- *Vitreoscilla filiformis* : les bactéries proviennent de la société L'Oréal (Tours, France). Les LPS utilisés font partie de lots qui ont été extraits mais non purifiés antérieurement à ma thèse. Je les ai purifiés pour effectuer des tests d'activités biologiques.
- *Pseudomonas aeruginosa* : les LPS ont été purifiés par mes soins à partir de bactéries appartenant à la Société LPS-BioSciences.
- *Neisseria meningitidis* : les bactéries provenaient de l'institut Mérieux de Lyon (France). Les LPS ont été extraits mais non purifiés antérieurement à ma thèse. Ils ont été purifiés par mes soins.
- *Haemophilus Influenzae EAGAN* : les bactéries ont été données à Martine Caroff par le National Research Council (Ottawa, Canada). J'ai re-purifié des LPS bruts.
- LPS commerciaux : les LPS Re595 de *Salmonella Minnesota* et *Shigella flexnerii* ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Les MPLA-SM TLR4 ligand (InVivoGen) et Lipid A *Salmonella Minnesota* Re595 (sigma) ont servi comme contrôles dans le chapitre IV.

### ***c) Cellules***

- Les cellules THP-1 ATCC®TIB-202™ ont été cultivées et stimulées par différents LPS pour doser des cytokines dans les surnageants de culture et pour mesurer la production de ROS et l'activation des caspases 3/7. Elles proviennent de l'équipe du Pr. Jean-Marc Cavaillon de l'institut Pasteur.

## ***3) Solvants et tampons***

### ***a) Coloration de Gram***

- Composition de la solution de cristal violet : 1 g dans 100 ml d'eau distillée.
- Préparation du Lugol : 0,5 g d'iode + 1 g d'iodure de potassium dans 100 ml d'eau distillée.
- Composition de la solution de safranine : 0,5 g dans 100 ml d'eau distillée.

### ***b) Solvants d'extraction ou de purification des LPS et lipides A***

- Composition de solvants d'extraction (Caroff & Karibian 1990; Caroff 2004): ils sont constitués d'un mélange d'acide isobutyrique (>99% Sigma-Aldrich) et d'ammonium 1M préparé à partir d'hydroxyde d'ammonium 28-30% (Sigma-Aldrich). Ils sont nommés par les proportions constituant le mélange. Par exemple, le solvant 5 :3 est constitué de 5 volumes d'acide isobutyrique et de 3 volumes d'ammonium 1 M.
- Définition du solvant dit « CMO » : mélange de chloroforme ( $\geq 99.8\%$  Sigma-Aldrich), méthanol (AnalR Normapur VWR) et eau MilliQ. Par exemple dans le cadre de l'extraction des lipides A, c'est le solvant CMO (3, 1.5, 0.25 ; v,v,v) qui est utilisé (Martine Caroff et al. 1988).

### ***c) Chromatographie sur couche mince***

- Préparation des solvants de migration : selon la méthode de M. Caroff et D. Karibian (Caroff & Karibian 1990), ils sont constitués d'un rapport variable d'acide isobutyrique et d'ammonium 1M et nommés par les proportions constituant le mélange. Par exemple, le solvant 1 :1, approprié pour la migration de la plupart des LPS Longs, est constitué du même volume d'acide isobutyrique et d'ammonium 1 M. Le solvant 4 :5, approprié pour la migration de certains LPS longs, est constitué de 4 volumes d'acide isobutyrique et de 5 volumes d'ammonium 1 M. Le solvant 5 :3, approprié pour la migration des LPS courts, est constitué de 5 volumes d'acide isobutyrique et de 3 volumes d'ammonium 1 M. Le solvant 5 :2, approprié pour la migration des lipides A, est constitué de 5 volumes d'acide isobutyrique et de 2 volumes d'ammonium 1 M.

### ***d) Electrophorèse SDS-PAGE***

- Préparation de la solution du gel de concentration : 3,75 ml de solution d'acrylamide 40% sont ajoutés à 2,6 ml de Tris-HCl 1,5M à pH 8,8 et mélangés avec 100  $\mu$ l de SDS 10%, 100  $\mu$ l de persulfate d'ammonium 10%, 3,45 ml d'eau et 5  $\mu$ l de TEMED.

- Préparation de la solution du gel de séparation : 500 µl de solution d'acrylamide 40% sont ajoutés à 312,5 µl de Tris-HCl 2M à pH 6,8 et mélangés avec 50 µl de SDS 10%, 50 µl de APS 10%, 4,082 ml d'eau et 5 µl de TEMED.
- Composition du tampon d'échantillons : Tris-HCl 0.1 M pH 6,8, SDS 2% (g /100 ml), Sucrose 20% (g /100 ml), β-mercaptoéthanol 1% (ml /100 ml).
- Composition du tampon de migration : Tris 0,025 M (3,03 g/L), Glycine 0,192 M (14,4 g/L) et SDS 0,1% (g/100 ml).
- Composition de la solution de fixation : 40% d'éthanol et 5% d'acide acétique.
- Composition de la solution d'oxydation : 0,7% d'acide périodique dans la solution de fixation.
- Préparation de la solution de coloration au nitrate d'argent : 1 g de nitrate d'argent est dissout dans 5 ml d'eau, puis sont ajoutés 28 ml de NaOH 0,1M mélangés à 2 ml de NH<sub>4</sub>OH concentré. Ce mélange doit devenir transparent. Le cas échant, il convient d'ajouter quelques gouttes de NH<sub>4</sub>OH concentré jusqu'à l'obtention de la transparence. Cette préparation est complétée avec 115 ml d'eau MilliQ.
- Préparation du développeur : 50 mg d'acide citrique sont dissouts dans 0,5 ml de formaldéhyde 37% puis la solution est complétée à 1 L d'eau.

## **4) Méthodes**

### **a) Coloration de Gram (Gram 1884)**

Un frottis est réalisé en étalant sur la lame de verre les bactéries avec une pointe de cône (suspension à 1 mg/ml). Puis la lame est séchée et fixée en la passant 2-3 fois au-dessus d'une flamme pendant quelques secondes. La lame est recouverte d'une solution de cristal violet pendant 1 minute. Toutes les bactéries se colorent alors en violet. La lame est rincée à l'eau distillée puis recouverte de Lugol pendant 30 secondes. Elle est lavée une nouvelle fois à l'eau distillée puis elle est recouverte d'éthanol à 96% pendant 10 secondes. L'éthanol dissout le cristal violet et les bactéries dites à Gram négatif se décolorent. La lame est lavée rapidement et recouverte de safranine pendant

10 secondes à 1 minute. Les bactéries précédemment décolorées se colorent maintenant en rose. La lame est lavée à l'eau, séchée et observée grâce au microscope à immersion Olympus BH-2 10x/20 L au grossissement x160.

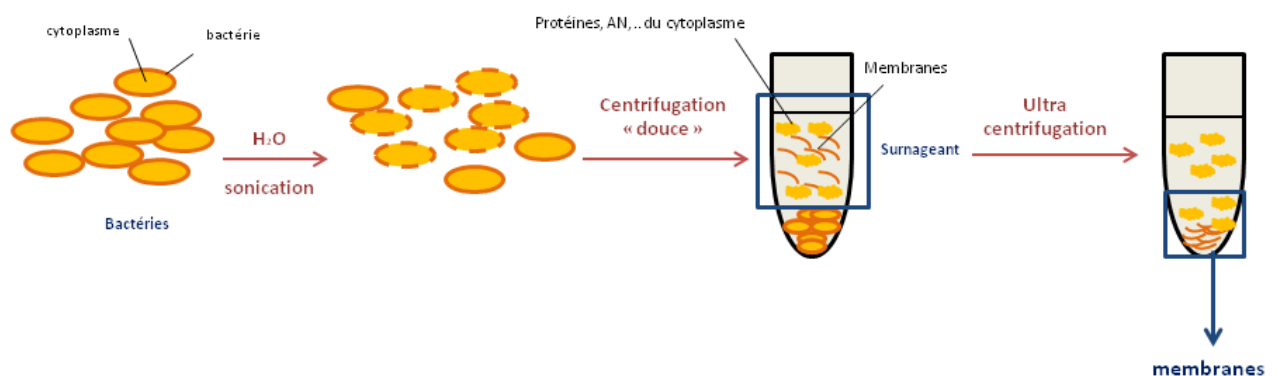
### ***b) Lyse bactérienne pour l'obtention d'échantillons de micro-analyses***

Plusieurs procédés de lyse ont été testés. Les méthodes sélectionnées sont décrites dans le chapitre I.

#### ***Choc osmotique complété de l'usage d'un bain à ultrasons***

Le principe d'obtention des membranes est simple (Figure 22) et a été mis au point par Martine Caroff dans le cadre du projet Andromède (2010) pour obtenir les premiers spectres des LPS sur membranes bactériennes. C'est la méthode de lyse par choc osmotique complété par la sonication des bactéries en suspension dans l'eau (bain à ultrasons) qui a été sélectionnée après comparaison avec la lyse par la presse de French. Lors de mes manipulations, les bactéries lyophilisées sont mises en suspension dans de l'eau MilliQ à une concentration de 2 à 10 mg/ml et elles sont placées sous agitation magnétique pendant 2h avec des cycles de 2 minutes de sonication (bain à ultrasons) toutes les 30 minutes.

D'un point de vue général pour produire des membranes à petite échelle pour l'analyse structurale, il faut, une étape de lyse des bactéries afin d'obtenir des « fragments enrichis en membranes » (Figure 22).



**Figure 22 : Obtention des lysats et des fragments membranaires bactériennes contenant les LPS.**

S'ensuit une étape de centrifugation « douce » permettant la séparation des fragments de membranes, qui restent dans le surnageant, des bactéries non-lysées et du peptidoglycane, qui sont dans le culot. Enfin, une ultracentrifugation du surnageant de la centrifugation douce permet d'éliminer une partie des contaminants solubles (protéines, acides nucléiques) afin de culoter les membranes.

### ***Désintégrateur de cellules « one shot »***

Les manipulations sont réalisées selon les protocoles standards d'utilisation de l'appareil. Cet appareil va permettre le passage très rapide (600 m/s) de l'échantillon (cellules, bactéries, levures) d'un cylindre à un réceptacle grâce à une variation de pression quasiment instantanée jusqu'à 2700 bars.

De l'éthanol à 10% est présent dans la cuve et est éliminé en l'aspirant avec une pipette grâce à une pompe à vide. Puis la cuve est rincée plusieurs fois à l'eau de la même manière. Le couvercle du réceptacle contenant le barreau anti-mousse est placé sur de la glace pour être refroidi. L'appareil est mis sous tension, la pression est ensuite réglée sur la valeur désirée (2.7 Kbar max) et l'échantillon (jusqu'à 100 mg/ml) est chargé dans le cylindre. Le réceptacle et son couvercle sont insérés dans le cylindre en appuyant fortement. L'ensemble de confinement est mis en place par-dessus ainsi que la pigne de sécurité. La pigne de sécurité est maintenue en place avec une légère pression d'un doigt tout en prenant appui avec les deux autres doigts jusqu'à ce que le cycle de désintégration d'une durée de 20 secondes soit fini. Ensuite la pigne est retirée, et le réceptacle est soulevé à l'aide du levier. Il est ensuite ouvert sous la hotte et l'échantillon broyé est récupéré. Le cylindre est nettoyé à l'eau, puis à la soude 0.05 M en la laissant agir 2 à 3 minutes, et enfin à l'eau avec aspiration à la pipette entre chaque étape. De l'éthanol à 10% est placé dans le cylindre.

*N.B.* : un passage de rinçage à 0.5 Kbar avec de l'eau peut être réalisé avant celui de l'échantillon. Plusieurs passages peuvent être nécessaires pour broyer un échantillon.

### ***Billes en verre***

Les Eppendorf® et les godets d'agitation sont conservés à -20°C. Le diamètre idéal des billes en verre pour de la lyse bactérienne est de 0.1 mm d'après les données du fournisseur (Sigma-Aldrich). Des billes sont placées dans des tubes Eppendorf® de façon à remplir 1/6 du volume du tube employé. L'échantillon, qui peut être visqueux voire pâteux, jusqu'à 100 mg/ml, est ajouté et occupe 1/3 du tube. La moitié du tube doit rester vide. Les godets sont placés dans le vibro-broyeur et trois cycles d'agitation/refroidissement (1 min/1 min) sont effectués. Le refroidissement s'opère en plaçant les godets dans la glace.

### ***Congélation/Décongélation***

Les solutions sont placées à -70°C jusqu'à congélation complète puis réchauffées à 25°C dans un bain-marie. Les cycles peuvent être répétés plusieurs fois.

### ***Centrifugations d'isolement des lysats membranaires***

Dans tous les cas, les lysats bactériens sont soumis à des centrifugations différentielles. Le lysat est centrifugé à 2000 g pendant 10 à 15 minutes entre 4 et 18 °C afin de faire culoter les bactéries non-lysées. Le surnageant est ultra-centrifugé entre 142 000 et 350 000 g pendant 1h à 4°C. Il est prélevé et conservé pour être analysé. Les fragments de membranes sont récupérés dans le culot de l'ultracentrifugation et lyophilisés. Les fragments produits sont utilisés pour l'analyse par MALDI-TOF tels quels ou après hydrolyse.

*N.B* : Le culot de la centrifugation à 2000 g peut être utilisé pour une nouvelle lyse. La vitesse et le temps de la première centrifugation peuvent être adaptés en fonction de la densité du lysat.

### ***c) Lyse bactérienne pour l'obtention d'un lysat concentré en LPS : sonication par l'utilisation d'une sonde à ultrasons***

Les bactéries lyophilisées sont reprises à 200 mg/ml dans un pot en PPCO à large ouverture placé dans un bac de glace. Cette haute concentration est choisie car cette suspension forme une pâte ni trop liquide, ni trop épaisse, ce qui nous permet de lyser les bactéries à de fortes concentrations. La

sonde est insérée dans la suspension de bactéries. Les cycles sont effectués comme suit : 5 minutes de sonication (pulse/s = 70% de sonication et 30% de repos), puis 3 minutes de repos dans la glace. L'intensité est réglée sur le maximum autorisé en fonction de la sonde (output = 4 pour la « microtip » et output = 10 pour la sonde standard) pour lyser au maximum les bactéries. Plusieurs cycles consécutifs peuvent être réalisés.

Les lysats bactériens obtenus seront utilisés dans le chapitre III pour l'amélioration de l'extraction des LPS.

#### ***d) Extraction et purification des LPS***

Les protocoles suivants s'appliquent à l'extraction des LPS à partir des bactéries, ou directement à partir d'échantillons de LPS bruts à purifier ou re-purifier.

##### ***Lavages des bactéries lyophilisées***

A partir des bactéries lyophilisées, des lavages avec un solvant permettant d'éliminer les protéines ont été effectués (nature du solvant confidentielle, propriété LPS-BioSciences). Ils sont testés par SDS-PAGE pour vérifier que des LPS ne sont pas perdus dans ces phases à chaque étape.

##### ***Extraction acide isobutyrique / ammonium (Caroff 2004, WO2004/062690A1)***

Les bactéries lavées comme décrit dans le brevet sont reprises dans un mélange de solvants composé d'acide isobutyrique et d'ammonium 1M. Cette suspension est placée sous agitation magnétique puis centrifugée. Le surnageant est récupéré et filtré sur papier Whatman GF/D posé sur verre fritté de porosité type 1 (90-150 µm). A l'issue, le filtrat est précipité à l'aide d'éthanol absolu froid (-20°C) et laissé une nuit minimum au congélateur à -20°C ou récupéré par dialyse. Le culot obtenu après la centrifugation subit une deuxième puis une troisième extraction. Les surnageants de chaque extraction sont précipités de la même façon à l'éthanol absolu froid. Les LPS précipités sont ensuite récupérés par centrifugation. Les surnageants sont conservés au congélateur alors que les culots sont séchés puis lyophilisés.

*N.B* : les volumes de solvant peuvent varier en fonction de la nature des LPS à extraire.



### ***Traitements enzymatiques (Tirsoaga, El Hamidi, et al. 2007; Marr, Hajjar, et al. 2010)***

Cette méthode a été mise au point dans le laboratoire. Afin d'éliminer des contaminants protéiques et nucléiques, les lyophilisats provenant des culots des extractions sont suspendus par sonication dans de l'eau MilliQ à raison de 2 mg/ml pour les LPS courts ou 4 mg/ml pour les LPS longs et subissent un traitement enzymatique à la DNase (2 µg/mg) et à la RNase (2 µg/mg) à 37°C pendant 2 heures et sous agitation douce. Puis de la protéinase K est ajoutée (4 µg/mg) pendant 1 heure à 54°C, puis ré-ajoutée pour 1 heure à 37°C, sous agitation. La solution est lyophilisée.

*N.B :* On peut parfois faire un traitement à la mutanolysine, pour cliver le peptidoglycane à raison de 2 µg/mg, en même temps que les traitements à la RNase et DNase. Dans ce cas la protéinase K est ajoutée à raison de 8 µg/mg de LPS.

Le lyophilisat est repris dans de l'eau MilliQ (5-20 µg/µl) puis ultra-centrifugé à 4°C entre 300 000 et 490 000 g (en fonction du rotor et des tubes utilisés) pendant 50 minutes à 2 heures selon leur solubilité. Le surnageant contenant des débris enzymatiques et contaminants, et le culot contenant les LPS sont lyophilisés séparément. Ces deux éléments seront analysés.

### ***Extraction des contaminants de nature lipidique (Tirsoaga et al. 2007)***

Cette méthode de purification a été mise au point au laboratoire pour retirer les lipopeptides. Les lipopeptides sont des composants qui se lient et activent le TLR2. Plusieurs études ont identifié les LPS comme des molécules TLR2 actives, alors qu'ils étaient en réalité contaminés par ces lipopeptides (Manthey & Vogel 1994). Cette technique a pour but d'éliminer ces composés TLR2 actifs qui interfèrent avec les réponses immunologiques induites par les LPS et leur liaison au TLR4.

Deux lavages successifs identiques au chloroforme/méthanol/eau (CMO) acide sont opérés : Les LPS à purifier sont repris entre 40 et 50 µg/µl dans du HCl 1M et homogénéisés (sonication, vortex). Du chloroforme/méthanol (C/M) (1 : 2 ; v : v) est ajouté pour atteindre une concentration finale de 2 mg/ml. Les LPS sont homogénéisés rapidement (vortex, sonication) puis centrifugés à 6000 g, 4°C, pendant 10 minutes.

S'ensuivent deux extractions à l'aide de solvant CMO : Les LPS à purifier sont repris entre 40 et 50 µg/µl dans de l'eau et homogénéisés (sonication, vortex). Du C/M (1 : 2 ; v : v) est ajouté pour atteindre une concentration finale de 2 mg/ml. Les LPS sont homogénéisés rapidement (vortex, sonication) puis centrifugés à 6000 g, 4°C, pendant 10 minutes. Le culot obtenu est séché, repris dans l'eau et lyophilisé. Ces lavages permettent d'éliminer les composés de type lipoprotéines ou phospholipides.

Le contrôle d'une perte éventuelle de LPS dans le surnageant est nécessaire.

### ***e) Analyse structurale des LPS***

#### ***Chromatographie sur couche mince de silice (CCM ou TLC) (Caroff & Karibian 1990)***

Des plaques d'aluminium recouvertes d'une couche mince de silice (Merck 60 F254) et des plaques de verre recouvertes de silice (Merck HPTLC 60F) ont été utilisées. Les dépôts des LPS en solution sont effectués en ligne à 1 cm du bas de la plaque (1-2 µl par dépôt). Les dépôts doivent être espacés d'au moins 1.5 cm entre eux et à 2 cm des bords pour éviter les effets de bord. La plaque est déposée dans une cuve à migration en verre préalablement remplie et saturée avec l'un des solvants de migration. Les molécules migrent en fonction de leur affinité pour l'éluant et la phase stationnaire, ici la silice. Après la migration, la révélation s'effectue comme suit : la plaque est séchée, trempée rapidement dans un bain d'acide sulfurique à 10% dans l'éthanol, puis séchée de nouveau et enfin elle est déposée, pour révélation par carbonisation, sur une plaque chauffante à 150°C jusqu'à apparition des spots (environ 5 minutes). La carbonisation à l'acide sulfurique permet la révélation aspécifique de différents composés carbonés, en particulier les sucres qui contiennent des fonctions -OH. D'autres révélations sont possibles (amines, phosphate, acides gras).

## ***Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)***

Les gels sont mis en œuvre d'après la méthode de Tsai (Laemmli 1970; Tsai & Frasch 1982).

### ***Préparation des gels et des échantillons***

Le gel de séparation est coulé entre les plaques jusqu'à deux centimètres du bord et recouvert de propanol pour éviter le dessèchement. Il est laissé à polymériser entre 20 et 45 minutes environ. Le propanol est éliminé par retournement et le gel de concentration est déposé sur le précédent, le peigne est inséré et il est laissé à polymériser pendant 20 à 45 minutes environ. Les gels polymérisés peuvent être conservés au réfrigérateur une semaine dans un papier humidifié.

### ***Préparation des échantillons***

Les échantillons sont dilués dans du tampon d'échantillon contenant 2% bleu de bromophénol.

### ***Migration des échantillons***

Le gel est placé dans une cuve remplie de tampon de migration. Les échantillons à analyser et les témoins sont déposés dans les puits du gel et l'ampérage est fixé à 15 mA pour permettre l'entrée des produits dans le gel de concentration. Puis l'ampérage est augmenté au fur et à mesure jusqu'à 25 mA. La migration est arrêtée avant que le bleu de bromophénol ne sorte du gel.

### ***Révélation du gel***

Le gel est décollé délicatement des plaques puis il est recouvert d'une solution de fixation et placé sous agitation pendant 1h à 1h30, afin de fixer les LPS dans le gel. Le gel est lavé 3 fois 15 minutes avec de l'eau sous agitation. Après la fixation, une étape d'oxydation des LPS de 5 minutes est réalisée avec une solution préparée extemporanément. Cette réaction permet d'oxyder deux fonctions CH –OH libres vicinales sur un sucre, et de les transformer en aldéhydes afin de rendre l'action du nitrate d'argent possible. Le gel est lavé 3 fois 15 minutes avec de l'eau sous agitation. Une solution de coloration de nitrate d'argent est ensuite préparée extemporanément et utilisée pour révéler les LPS. Cette solution recouvre le gel pendant exactement 10 minutes. Le gel est lavé 3 fois 15 minutes avec de l'eau sous agitation. Cette réaction, aussi appelée réaction de Tollens, correspond à la formation d'un dépôt d'argent par oxydation des fonctions aldéhyde du complexe

d'argent en présence d'ammoniaque. Enfin, le gel est développé à l'aide du développeur. Le gel contenu dans le développeur est lavé à l'eau puis scanné dès que les bandes apparaissent. Le formaldéhyde réduit le nitrate d'argent, le rendant visible.

### ***Hydrolyse directe des bactéries permettant d'isoler et de caractériser les lipides A (El Hamidi et al. 2005)***

Cette méthode a été mise au point dans l'équipe « Endotoxines, Structures et Activités ». Les bactéries lyophilisées sont lavées deux fois avec un mélange chloroforme/méthanol (C/M) (1 : 2 ; v : v) puis une fois avec un mélange CMO (3 : 2 : 0.25 ; v : v : v) à 25 µg/µl. Le culot de bactéries lavées est séché sous N<sub>2</sub>. Le culot est repris dans le mélange acide isobutyrique / ammonium 1M 5 :3 à 25 µg/µl et chauffé 1h30 à 100°C sous agitation. Le tube est centrifugé à 12 000 g pendant 5 minutes, et l'extrait 5 :3 est prélevé, dilué avec de l'eau et lyophilisé. Le lyophilisat est lavé deux fois avec du méthanol (25 µg/µl en considérant la masse de départ) puis les lipides A sont extraits deux fois du culot avec du CMO (3 : 1.5 : 0.25 ; v : v : v) à une concentration de 100 µg/µl en considérant la masse de départ. Les deux extraits CMO sont rassemblés et 1 µl est déposé directement sur plaque pour l'analyse par MS.

### ***Clivage entre le lipide A et Kdo : Hydrolyse Triéthylamine-citrate (TEA-CA) (Chafchaoui-Moussaoui et al. 2011)***

Cette méthode a été mise au point dans l'équipe « Endotoxines, Structures et Activités ». Les LPS sont repris en solution à 2.5 µg/µl TEA-CA 0.01M pH 3,5 dans des tubes Eppendorf (Triéthylamine de chez CalBiochem-Merck Millipore et Acide citrique de chez Sigma Aldrich). Avant toute hydrolyse les LPS doivent être analysés, entiers par MS dans le tampon TEA-citrate, car une fragmentation douce résulte de l'impact du laser et elle permet de distinguer les LPS non clivés, les lipides A et les PS. Ensuite, ces solutions sont traitées de 45 minutes à 2 heures à 100°C sous agitation. Ces hydrolysats peuvent directement être analysés par MS pour un gain de temps. Les lipides A et PS clivés peuvent aussi être séparés pour être analysés indépendamment. Pour cela, les solutions sont mises à sec et subissent deux extractions CMO (3 : 1.5 : 0.25 ; v : v : v) à 2 µg/µl par rapport à la masse de départ. Le

CMO est ajouté sur les culots secs, ils sont homogénéisés et centrifugés à 7150 g, à 14°C pendant 10 minutes. Les surnageants des deux extractions sont rassemblés et contiennent les lipides A. Les culots sont repris avec de l'eau, à 5 µg/µl par rapport à la masse de départ, centrifugés à 7150 g, à 4°C pendant 20 minutes. Dans les surnageants aqueux de cette dernière centrifugation se trouvent les polysaccharides et les éventuelles molécules de LPS non-clivées. Ces solutions sont analysées par MS.

La méthode utilisant le TEA-CA est applicable aux LPS commerciaux. Un exemple est décrit dans **l'article n°1** inséré à la fin du « matériels et méthodes ».

Cette méthode a permis de comparer trois lots de LPS provenant de la même bactérie et de mettre en évidence les différences structurales des LPS inter-lots.

Pour l'hydrolyse sur les membranes, les membranes obtenues par choc osmotique sont reprises à 25 µg/µl dans du TEA-CA 0.05 M puis hydrolysées à 100 °C pendant une heure. Les hydrolysats sont refroidis, centrifugés 5 minutes à 6800 g et le surnageant est directement analysé par MALDI-MS avec de la matrice DHB-acide citrique dans l'eau, il contient les PS. Le culot est rincé trois fois avec du méthanol, à 50 µg/µl par rapport au poids des membranes de départ, puis le lipide A est extrait avec du CMO (3 ,1.5 ,0.25 : v,v,v) à 100 µg/µl par rapport au poids des membranes de départ. Cet extrait CMO est directement déposé sur la plaque MALDI-MS pour analyse avec matrice DHB-acide citrique dans le CMO.

### ***Dé-O-acylation des LPS par traitement NH<sub>4</sub>OH (Tirsoaga et al. 2007)***

Cette méthode a été mise au point dans l'équipe « Endotoxines, Structures et Activités ». Pour libérer les acides gras en positions ester 3 et 3' des glucosamines du lipide A, une solution de 0.5 µg/µl de LPS dans du NH<sub>4</sub>OH 28% est chauffée 5h à 50°C sous agitation dans un tube Eppendorf®. L'hydrolysate est mis à sec au dessiccateur puis repris à une concentration de 1 µg/µl dans l'eau. Cette solution est analysée par MS. Par exemple, en appliquant cette méthode au lipide A de *E. coli* décrit dans la Figure 4 de l'introduction, ce traitement permet de libérer deux 14 :0(3-OH) et un 14 :0.

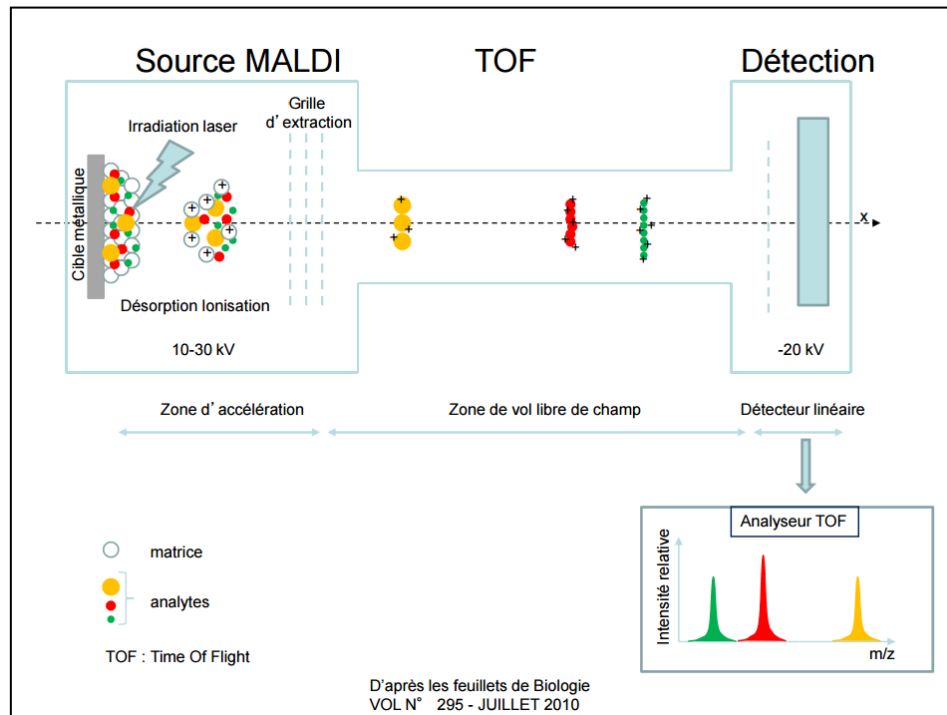
## ***Spectrométrie de Masse MALDI-TOF ( Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice- Temps De Vol)***

La spectrométrie de masse est un outil de séparation des molécules étudiées en fonction de leur masse  $m$  et de leur charge  $z$  ( $m/z$ ), dans le but de les identifier. La méthode d'analyse comprend plusieurs étapes :

- 1) la préparation et l'introduction de l'échantillon,
- 2) l'ionisation des molécules d'intérêt,
- 3) la séparation des ions en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ),
- 4) la détection et l'amplification du signal,
- 5) l'analyse des données et l'identification de l'échantillon.

C'est au début du 20<sup>ème</sup> siècle que les spectromètres de masse apparaissent. Ils ont été mis au point pour rechercher différents isotopes en physique. C'est Francis William Aston, chimiste et physicien anglais, qui construit le premier en 1922. Cette nouvelle technique s'est développée ainsi que de nouvelles méthodes d'ionisation et de séparation des ions jusqu'à la mise au point de la méthode MALDI-TOF dans en 1988 pour l'analyse de protéines de hautes masses moléculaires (Karas & Hillenkamp 1988). Le spectromètre de masse MALDI-TOF utilise une source d'ionisation laser assistée par matrice et sépare les ions formés en fonction de leur temps de vol. Les échantillons sont déposés sur la cible (ou plaque MALDI) et mélangés à la matrice, ce qui permet leur cristallisation, puis ils sont séchés et la cible est introduite dans le spectromètre. Lorsque le faisceau laser d'azote  $N_2$  est pulsé sur la cible, la matrice absorbe l'énergie ultraviolette et protège ainsi les échantillons de la dégradation. Cette énergie permet de désorber le mélange matrice/échantillon de la cible, et d'ioniser l'échantillon par perte ou gain d'adduits. Les molécules ionisées sont ensuite séparées en fonction de leur rapport masse/charge entre une anode située au niveau de la cible et une cathode placée au niveau de ce qui est appelé la grille d'extraction. Les échantillons ionisés sont propulsés vers l'électrode de la grille, qui est de charge opposée à la leur masse, et passent au travers d'un champ électrique afin de les accélérer. A la sortie de la grille, ils vont parcourir sous vide une distance

connue jusqu'au détecteur, c'est le temps de vol (time-of-flight, TOF). En fonction du temps que mettent les ions à atteindre le détecteur, on peut déterminer leur rapport masse /charge. L'analyseur restitue les données sous forme de spectre. Les spectres sont réalisés en mode linéaire positif ou négatif à une énergie de 20 KeV.



**Figure 23 : Principe du MALDI-TOF en mode linéaire.**

Avant dépôt sur la cible en inox, les échantillons sont dessalés à l'aide d'une résine échangeuse de cations Dowex 50W X8 (Karibian et al. 1991) afin de neutraliser les cations qui induisent la formation d'agrégats de LPS. Les solutions dessalées sont ensuite déposées. La matrice est ajoutée par-dessus et mélangée avec l'échantillon par aspiration-refoulement. Plusieurs rapports échantillon/matrice sont testés : 2/1 ; 1/1 ; 1/2.

- Préparation de la matrice utilisée : 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  d'acide-2,5-dihydroxybenzoïque (DHB – Sigma Aldrich) dans 0.1 M d'acide citrique dans le même solvant que celui de l'échantillon (soit  $\text{H}_2\text{O}$ , soit CMO 3 : 1.5 : 0.25 ; v : v : v) (Caroff & Novikov 2011).

## ***Spectrométrie de Masse TOF-SIMS***

Ces expériences, incluses dans l'article n°2 du chapitre I, ont été réalisées dans le cadre du projet Andromède par les Physiciens de l'Institut de Physique Nucléaire d'Orsay, Serge Della-Negra et son équipe. L'appareil de cette équipe a été financé dans le cadre du projet Andromède. Andromède est un projet qui développe principalement un nouvel instrument pour l'analyse par MS de nano-objets et nano-domaines présents sur une surface. Ce projet correspond à la version la plus efficace actuellement de la MS SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry). L'information moléculaire (masse et structure) sera obtenue à partir de l'impact de nanoparticules, par exemple Au<sub>4004</sub><sup>+</sup> jusqu'à Au<sub>10000n</sub><sup>+</sup>, accélérées dans le domaine du MeV par une structure Van de Graaff de 1 à 4 MV. Ces projectiles permettent l'analyse des échantillons hydratés (ou non), soit sous vide soit à la pression atmosphérique. Le domaine de recherche regroupe plusieurs équipes au sein du projet Andromède, il concerne la nanotechnologie avec la préparation et l'analyse de surfaces nano-structurées ; la biologie et les études « *in vitro* » de cellules et de bactéries portées par l'équipe de Martine Caroff, puis par la Start-up ; l'astrophysique et la simulation des interactions extraterrestres, avec des surfaces glacées et des argiles hydratées dans différents environnements gazeux; et enfin le suivi de la catalyse induite autour de surfaces nano-structurées. Le développement de ce nouvel outil est effectué en collaboration avec plusieurs laboratoires de l'Université Paris Sud, partenaires du projet : l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay, l'Institut de Génétique Moléculaire d'Orsay (I2BC), l'Institut d'Astrophysique Spatiale d'Orsay et le Centre de Spectrométrie Nucléaire et de Spectrométrie de Masse et un partenaire industriel : OrsayPhysics. Une collaboration internationale existe autour de ce projet avec le Centre for Chemical Characterization and Analysis du Texas A&M University.

La MS TOF-SIMS est apparue dans les années 50 après la découverte des chercheurs Herzog et Viehboek à Vienne en 1949. Le spectromètre de masse à ionisation secondaire (SIMS) consiste à bombarder l'échantillon à analyser avec un faisceau d'ions et non un laser comme c'est le cas pour la technique MALDI. C'est une méthode douce qui permet l'analyse en surface des échantillons



(quelques nanomètres). Ils sont bombardés avec des ions possédant une énergie de quelques KeV afin de produire des ions secondaires à partir de la surface de l'échantillon. Ils sont ensuite focalisés et accélérés pour être analysés en fonction de leur temps de parcours dans l'analyseur (TOF). On obtient une intensité de nombre d'ions secondaires détectés en fonction de leur rapport  $m/z$ . On peut également obtenir les images ioniques des espèces élémentaires et moléculaires des surfaces analysées. En effet, le faisceau d'ions primaires peut balayer une surface à imager (carré de 500 nm x 500 nm) et l'image est reconstruite avec le faisceau d'ions secondaires provenant de la surface balayée.

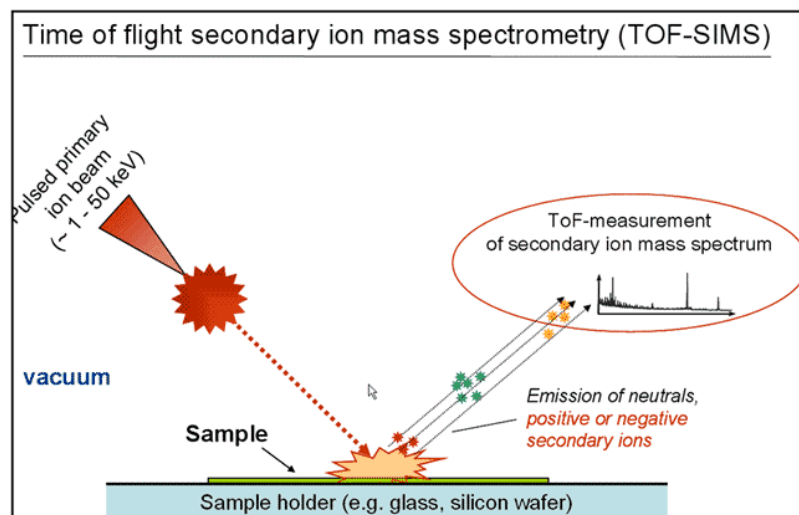


Figure 24 : Principe du TOF-SIMS. Détermination de l'état d'agrégation des LPS

### **Mesure de la taille des agrégats de LPS en solution**

Ces tests ont été réalisés par la société DrugAbilis (Châtenay-Malabry, France) pour la société LPS-BioSciences. Ils seront décrits dans le chapitre IV. Les distributions granulométriques submicroniques des LPS en suspensions ont été réalisées avec le « High performance particle sizer » de Malvern. Des suspensions de LPS de 10 mg/ml et les dilutions successives ont été analysées.

### **f) Analyse de la pureté des LPS**

#### **Suivi des quantités d'acides nucléiques et de protéines**

Des spectres d'absorbance allant de 220 à 320 nm sont réalisés après l'extraction des LPS (LPS bruts), puis après les traitements enzymatiques et les purifications à l'aide de solvants utilisés pour

extraire les lipoprotéines. Des mesures de DO sont effectuées à 230 nm, 260 nm et 280 nm au cours de différentes étapes pour suivre la croissance bactérienne et les quantités d'ADN, d'ARN et de protéines. La concentration des solutions mesurées est de 2 à 15 µg/µl d'échantillon. Lorsque les échantillons sont opaques, une étape de désagrégation chimique peut être appliquée.

### ***Dosage de Bradford***

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique dont le réactif principal est le bleu de Coomassie (Bradford 1976). Sous sa forme cationique libre, ce réactif absorbe la lumière à une longueur d'onde de 465 nm. Lorsqu'il est mis en contact avec une solution protéique à doser, il se lie aux protéines présentes et aux groupements aromatiques ce qui a pour effet de déplacer son spectre d'absorption à 595 nm. L'absorbance mesurée permet de doser indirectement la teneur en protéine de la solution à l'aide d'une courbe d'étalonnage en BSA (Bovin Serum Albumin). Des solutions de 10 µg/µl de LPS sont préparées ainsi qu'une gamme étalon de BSA allant de 0 à 0.5 mg/ml. Dans une microplaque, 10 µl de solution à doser est déposée dans un puits. 200 µl de réactif de Bradford est ajouté. La plaque est agitée 10 minutes et l'absorbance due aux contaminations protéiques est mesurée à 620 nm.

### ***Gels SDS-PAGE et CCM***

Ces méthodes d'analyse de la structure des échantillons sont aussi des indicateurs de pureté par détections concomitantes des contaminants, elles ont été décrites précédemment. Sur les gels SDS-PAGE, les protéines contenant certains acides aminés sont visibles (Clamp & Hough 1965). Sur les CCM, les composés saccharidiques, lipidiques et phospholipidiques sont visibles.

### ***Dosage par auto-analyse de la composition en acides aminés (Caroff, 2001, non-publié) (Marr et al. 2008)***

J'ai réalisé ces expériences avec l'aide de Delphine Patin dans l'équipe de Dominique Mengin-Lecreux (I2BC, Orsay). Le contenu en acides aminés et en glucosamines des échantillons après hydrolyse est analysé par l'appareil L-8800 amino acid analyzer équipé d'une colonne 2620MSC-PS

(Hitachi, ScienceTec, Les Ulis, France). Le protocole d'éluion recommandé par le fournisseur pour la séparation des acides aminés et des hexosamines a été utilisé. Un standard constitué d'un mélange d'acides aminés et de glucosamine est injecté pour pouvoir quantifier les résultats.

### ***Activation du TLR2***

Ce test a été réalisé par RD Biotech (Besançon, France) pour la société LPS-BioSciences. Il sera utilisé dans le chapitre IV. La lignée cellulaire HEK-Blue™ hTLR2 et le système de détection de SEAP par le système Quanti Blue™ ou HEK Blue™ ont servi à réaliser ce test. Les tests sont effectués en triplicate avec un contrôle positif (Lipopeptide FSL-1 100 µg – Invivogen). Sept doses, de 0 à 3 µg/ml, de chacun des LPS testés ont permis d'évaluer leur EC<sub>50</sub> lorsque cela était possible (la moitié de la concentration effective maximale de la molécule). Les ligands du TLR2 sont les lipoprotéines. En se fixant au TLR2, les ligands déclenchent la cascade de signalisation aboutissant à l'activation d'un gène rapporteur SEAP lié à NFκB. Ce gène rapporteur exprime une protéine détectable quantitativement par spectrophotométrie après l'utilisation d'une enzyme. Ces contaminants peuvent être présents dans nos échantillons. En étudiant la réponse TLR2 sous forme de dose-réponse, nous analysons la présence ou non de ces contaminants dans nos échantillons et leur seuil de détection.

## ***g) Analyse des activités biologiques des LPS***

### ***Activation du TLR4***

Ces tests ont été réalisés par la société RD Biotech (Besançon, France) pour la société LPS-BioSciences. Ils seront appliqués dans le chapitre IV. La lignée cellulaire HEK-Blue™ hTLR4 et le système de détection de SEAP par le système Quanti Blue™ ou HEK Blue™ ont été utilisés. Les tests ont été réalisés en triplicate avec un contrôle positif (Endotoxin Standard - Invivogen, rep-hbes-10, lot 05E-36-02). Sept doses, de 0 à 10 µg/ml, de chacun des LPS testés ont permis d'évaluer leur EC<sub>50</sub>. Les LPS sont des ligands du TLR4. L'analyse dose-réponse, nous permet d'étudier l'interaction directe des molécules avec leur récepteur et de les discriminer entre-elles en fonction de leur affinité pour ce dernier.

### ***Dosage de cytokines pro- et anti-inflammatoire sur le sang humain***

Ces tests ont été réalisés par la société Blood Assay Solution (Toulouse, France) pour la société LPS-BioSciences. Ils seront décrits dans le chapitre IV. Lors de ces tests, des LPS sont mis en culture 24h avec différents isolats de sang humain (3 donneurs). Les surnageants de culture sont récoltés et l'IL-4, l'IL-5, l'IL-12p70, l'IL-6 et l'IFN- $\gamma$  sont dosés par test ELISA.

### ***Test de pyrogénicité chez le lapin (RPT)***

Ces tests ont été réalisés à l'école nationale vétérinaire de Maison-Alfort (France) pour la société LPS-BioSciences. Nous les avons mis en place pour les manipulations du chapitre IV. Ce test correspond au protocole décrit dans la pharmacopée américaine <USP 151>. Trois lapins sont nécessaires pour l'évaluation de la pyrogénicité d'une molécule. Les lapins, sont injectés dans la veine marginale de l'oreille avec du matériel apyrogène. Leur température rectale est mesurée, de 40 minutes avant l'injection, jusqu'à 3h après, et ceci toutes les 30 minutes. Si l'élévation de la température est inférieure à 0,6°C par lapin et la somme des 3 est inférieure à 1,4°C, la molécule est classée non – pyrogène. Si l'élévation de la température est supérieure à 0,6°C pour 1 ou 2 lapins et la somme des 3 est supérieure à 1,4°C, il faut continuer le test avec 5 lapins supplémentaires (soit 8 au total). S'il n'y a pas plus de 3 des 8 lapins qui montrent une élévation de température supérieure à 0,6°C et si la somme des 8 températures est inférieure à 3,7°C, la molécule est classée non – pyrogène. Dans les cas contraires, la molécule est pyrogène.

### ***Test LAL***

Ces essais LAL ont été réalisés par la société Lonza pour la société LPS-BioSciences. Les amoebocytes de la *Limule* coagulent en présence d'infimes quantités d'endotoxines. Cette coagulation peut être mesurée par méthode de gélification, turbimétrique, chromogénique ou cinétique. Les résultats sont donnés en unité d'endotoxine (EU) par ng. L'EU est fixée par un standard de LPS d'*Escherichia coli*. Il a un potentiel déterminé à dix unités d'endotoxines par échantillon ce qui est équivalent à 10 EU/ng.

### **Test d'immunisation de souris**

Ces immunisations ont été réalisées par la société B Cell Design (Limoges, France) dans le cadre du chapitre IV. Des groupes de 5 souris Balb/c sont constitués. Les souris sont immunisées par voie sous-cutanée au niveau de l'omoplate avec différentes formulations à J0 et J14. L'antigène est l'ovalbumine (OVA Endofit, endotoxin free - Invivogen). Les anticorps IgG1 et IgG2a des souris sont dosés par test ELISA à J0, J14, J28, et J39 à partir de prélèvements effectués avant les immunisations. Des gammes de références « mouse » - IgG1 anti-OVA et « mouse » -IgG2a anti-OVA sont utilisées.



**Figure 25 : Protocole d'immunisations et de prélèvements des sera de souris.**

### **Cultures cellulaires : Lignée THP-1**

Les cellules THP-1 (ATCC® TIB-202®) sont des monocytes humains initialement isolés d'un enfant atteint d'une leucémie monocyttaire aigüe. Ce sont des cellules rondes, non-adhérentes et cultivées en suspension.

#### **Culture**

Elles sont maintenues en culture dans du milieu complet, c'est-à-dire du milieu RPMI 1640 (Gibco) supplémenté de 10% de Sérum de Veau Foetal (SVF PAA laboratory, GE lifesciences), préalablement décomplémenté 30 minutes à 56°C, et de 1% d'antibiotiques (100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine - InvivoGen).

#### **Décongélation**

L'ampoule de stockage des cellules est conservée dans de l'azote liquide à -180°C. Elle est sortie, réchauffée rapidement entre les mains, et son contenu (1 ml équivalent à 5 000 000 cellules) est rapidement transvasé dans 50 ml de milieu RPMI 1640. Deux lavages sont opérés pour éliminer les résidus toxiques de DMSO : les cellules sont centrifugées pendant 10 minutes à 100 g à 10°C et le

surnageant est éliminé. 50 ml de RPMI 1640 sont ajoutés pour remettre les cellules en suspension et elles sont re-centrifugées de la même façon. Le surnageant est enlevé. Les cellules sont reprises dans 10 ml de milieu complet et transvasées dans une flasque de culture de 75 cm<sup>3</sup> contenant déjà 15 ml de milieu complet. La flasque est mise à l'étuve à 37 °C et 5% de CO<sub>2</sub>. Après 12h, 25 ml de milieu complet sont ajoutés. Le nombre de cellules met deux-trois jours à doubler.

#### ***Lavages, comptage, amplification***

Les lavages sont effectués avec du milieu RPMI 1640. Le milieu de culture est intégralement récupéré de la flasque et mis à centrifuger pendant 10 minutes à 100 g à 10°C (1<sup>er</sup> lavage). Le surnageant est éliminé par aspiration et le culot cellulaire est re-suspendu dans 50 ml de milieu RPMI 1640 puis centrifugé de la même façon (2<sup>ème</sup> lavage). Le surnageant est éliminé par aspiration et les cellules sont reprises dans 10 ml de milieu complet. Un aliquot de 20 µl est prélevé et mélangé à 20 µl de bleu de Trypan. Après 5 minutes, les cellules sont comptées sur cellule de Malassez. Les cellules sont ensuite réparties dans des flasques (TPP®-Sigma Aldrich) de 75 cm<sup>3</sup> à raison de 5 000 000 cellules par flasque remplie de 50 ml de milieu complet. Le milieu de culture doit être changé tous les 2-3 jours.

#### ***Congélation***

Les cellules sont congelées dans 1 ml de solution de congélation (du SVF contenant 10% de DMSO) à une concentration de 5 000 000 cellules par ml dans des ampoules de congélation. Elles sont placées au congélateur à -80°C pendant 2 jours puis transférées dans l'azote liquide à -180°C.

#### ***Stimulation des cellules THP-1***

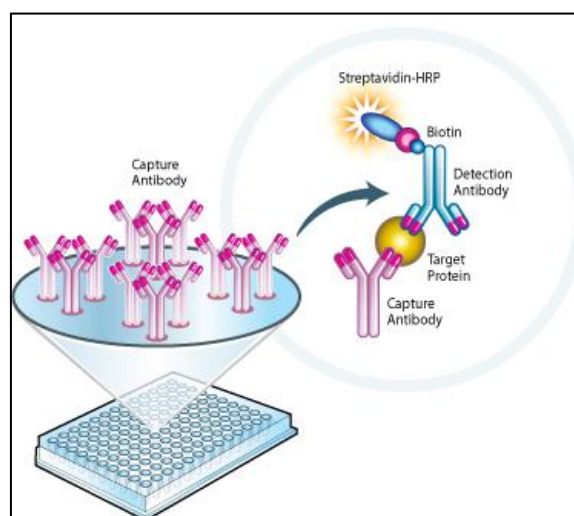
Les solutions de LPS hautement purifiés utilisées sont préparées stérilement dans du RPMI 1640. Pour ce, les poudres sont pesées dans des tubes stériles en verre et les tubes ouverts sont soumis à un rayonnement U.V pendant 5 minutes pour les stériliser. Puis du RPMI 1640 est ajouté et des dilutions en cascade des solutions de LPS sont effectuées. Les tubes sont stockés à -20°C. Les cellules THP-1 sont mises dans des plaques 6 ou 12 ou 24 puits (CELLSTAR®, Greinerbio-one, GmbH Allemagne) (entre 500 000 à 1 000 000 de cellules par ml comme précisé en fonction de l'expérience)

avec du milieu complet et de la solution de LPS stérile. Le volume final est respectivement de 2 ou 1 ou 0.5 ml en fonction du type de plaque. Les plaques sont laissées à incuber dans l'étuve pendant un temps donné en fonction des manipulations (de 1 à 48 heures) à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Pour les tests ELISA, le contenu de chaque puits est prélevé et centrifugé puis le surnageant est stocké à -20 °C. Pour les tests en cytométrie en flux, l'ensemble du puits est récolté (homogénéisation des cellules en pipetant-refoulant) et est directement marqué et analysé en cytométrie en flux. Des stimulations contrôles avec du Phorbol Miristate Acétate (PMA de Sigma-Aldrich) ont permis d'obtenir des productions de ROS et l'activation des caspases 3/7.

### ***Dosage des cytokines IL-6 et TNF- $\alpha$ par ELISA***

Les surnageants de culture sont testés par dosage ELISA avec l'utilisation des kits Ready-Set-Go de chez eBiosciences-Affymetrix. Ils peuvent être dilués ou non avec du milieu de culture RPMI.

Le protocole est basé sur la technique du sandwich. L'IL-6 ou le TNF- $\alpha$  sont d'abord fixés, par des anticorps de capture spécifiques, au fond d'une plaque 96 puits. L'absorption des anticorps de capture sur le fond de la plaque est appelée « coating ». Après incubation avec les échantillons, un deuxième anticorps dirigé spécifiquement contre l'IL-6 ou le TNF- $\alpha$  vient se fixer et former le sandwich. Ce deuxième anticorps est couplé à la biotine. L'enzyme avidine-HRP va se fixer sur la biotine et elle oxyde son substrat incolore, le TMB<sub>red</sub>, en substrat coloré, le TMB<sub>ox</sub>, qui pourra être dosé au spectrophotomètre à 450 nm.



**Figure 26 : Principe du test ELISA en double-sandwich.**

Voici le protocole utilisé :

- Composition du tampon salin phosphate (PBS) : 137 mM NaCl (8.0 g/L), 2.7 mM KCl (0.2 g/L), 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.44 g/L), 1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.24 g/L).
- Les plaques 96 puits utilisées sont des NUNC-Maxisorp®.
- Le « coating » des plaques avec l'anticorps de capture est réalisé la veille au soir de la réalisation de l'ELISA. Les anticorps de capture sont déposés au fond des puits avec du tampon approprié fourni dans le kit. La plaque est incubée à 4°C toute la nuit.
- Les puits sont lavés cinq fois avec du PBS 1X 0,05% tween-20.
- La saturation de la plaque est réalisée pendant une heure avec de l'assay diluent 1X fourni dans le kit.
- Les puits sont lavés 3 fois avec du PBS 1X 0,05% tween-20.
- Les gammes et les standards sont préparés dans du RPMI 1640 et les surnageants de culture (éventuellement dilués dans du RPMI 1640) sont déposés et laissés incuber à T.A. pendant deux heures.
- Les puits sont lavés 5 fois avec du PBS 1X 0,05% tween-20.
- Les anticorps de détection sont ajoutés et laissés à incuber pendant une heure à T.A.
- Les puits sont lavés 5 fois avec du PBS 1X 0,05% tween-20.
- La solution AVIDIN-HRP est ajoutée et elle est laissée à incuber pendant 30 minutes dans l'obscurité.
- Les puits sont lavés 5 fois avec du PBS 1X 0,05% tween-20.
- La solution de substrat TMB est ajoutée puis elle est laissée à incuber pendant 15 minutes
- La solution de stoppage de la réaction est ajoutée et la plaque est lue à 450 nm.

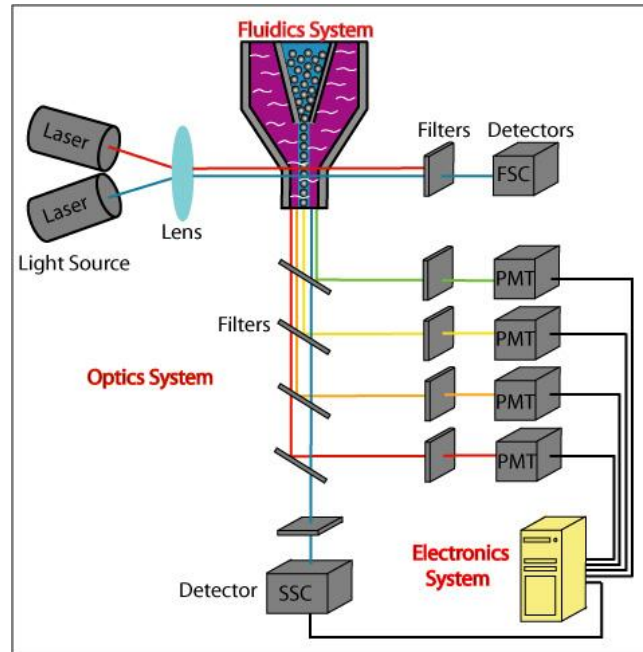
### ***Cytométrie en Flux pour l'analyse de la viabilité cellulaire, la production de ROS et l'activation des caspases 3/7***

La cytométrie en flux a vu le jour à partir de l'année 1934 avec Moldovan, qui, pour répondre au besoin du comptage des constituants cellulaires du sang, a mis en place un dispositif de comptage des cellules dans un tube capillaire devant un détecteur photoélectrique. Cette technique a évolué au fil des années en incluant la possibilité de marquer les cellules, de séparer différentes populations cellulaires, et d'analyser à grande vitesse des milliers d'événements par seconde.

La cytométrie en flux permet l'analyse individuelle de cellules. Les cellules sont entraînées dans un flux liquide (système fluidique) et alignées les unes derrière les autres afin d'être propulsées à



grande vitesse devant une source lumineuse (laser). Les signaux émis sont séparés par des filtres (système optique) et collectés par des photomultiplicateurs pour être traités par un ordinateur (système électronique) (Figure 27).



**Figure 27 : Principe d'un cytomètre en flux.**

La diffusion de la lumière est captée par des filtres placés à certains angles et permet de connaître la taille (petit angle : FSC) et la granularité (angle à 90° : SSC) des cellules étudiées. En traçant le diagramme FSC en fonction de SSC nous obtenons la morphologie des cellules.

Les cellules peuvent aussi être préalablement marquées avec des molécules couplées à des fluorochromes (anticorps membranaires, ligands peptidiques spécifiques), ou avec des colorants fluorescents (intercalant de l'ADN, ligand de groupement amine). Ces fluorochromes qui sont excités par les lasers, absorbent l'énergie, et la réémettent sous forme de photons à une certaine longueur d'onde. Elle est ensuite transformée par les photomultiplicateurs (PMT) en signaux électriques plus ou moins intenses qui sont traités par ordinateur et restitués sous forme de graphiques.

Dans mes travaux, voici les caractéristiques des marqueurs utilisés (Tableau IV)

Tous les marqueurs ont été achetés chez Thermofisher Scientific et sont préparés selon les données du fournisseur.

**Tableau IV: Caractéristiques des marqueurs utilisés en cytométrie en flux.**

Marqueur	Mode d'action	Longueur d'onde d'excitation	Longueur d'onde d'émission	Canal	Objectif
CD14 Antibody (TuK4), PE-Cy5.5® conjugate	Anticorps reconnaissant le CD14 membranaire	488 nm	695 nm	BL3	Sélectionner les cellules THP-1 CD14+ (contrôle positif)
Live/Dead® Fixable Aqua Dead cell	Colorant se fixant aux amines libres	405 nm	512 nm	VL2	Différencier et quantifier les cellules vivantes, sélectionner les cellules vivantes
Cell Event™ Caspases-3/7 Green	Peptide perméant conjugué à un colorant clivable par les protéines des caspases 3/7 et se liant à l'ADN pour marquer les cellules d'un signal fluorogénique	502 nm	530 nm	BL1	Identifier les cellules dont le signal d'activation des caspases 3/7 est positif
CellROX® Green Reagent	Sonde fluorogénique qui s'oxyde par les dérivés réactifs d'oxygène et se lie à l'ADN	485 nm	520 nm	BL1	Identifier les cellules qui induisent de la production de dérivés réactifs de l'oxygène

Le protocole de marquage est le suivant : les cellules sont centrifugées pendant 10 minutes à 25°C et 100 g. Le surnageant est éliminé par retournement, puis dans chaque tube :

- Le marqueur Anticorps-CD14 (1 µl) est incubé pendant 15 minutes à T.A. dans l'obscurité.
- 1.5 ml de focusing fluid (Thermofisher scientific) est ajouté par tube et ils sont rapidement passés au vortex pour être homogénéisés.
- 0.5 ml est prélevé du tube et transféré dans un deuxième tube.
- Dans le premier tube on ajoute des marqueurs Live/Dead (1 µl) et CellROX (1 µl).
- Dans le deuxième tube on ajoute des marqueurs Live/Dead (1 µl) et CellEvent Caspases 3/7 (1 µl).
- Les tubes sont laissés à incuber à T.A. pendant 30 minutes puis passés un par un au cytomètre en flux après ajout d'1 ml de focusing fluid et un petit vortex.

Pour les analyses, la population sélectionnée est THP-1 CD14+ et seulement les cellules vivantes sont prises en compte. Des tests statistiques de Student sont réalisés pour comparer les moyennes géométriques entre deux conditions différentes.

### ***h) Analyse en microscopie électronique à transmission (MET)***

Ces manipulations ont été effectuées au sein de la plateforme Imagerie-Gif. Les échantillons (5 mg) sont repris dans 4 ml de PBS 1X dans tubes Falcon 15 ml, mélangés succinctement par vortex

puis par agitation horizontale douce pendant 2h. Ils sont ensuite centrifugés pendant 2 minutes à 1010 g, le surnageant est retiré et 5 ml de fixateur sont ajoutés sur le culot (Composition du fixateur : glutaraldéhyde 2.5%, PFA 1%, tampon Cacodylate de sodium 0,1 M pH 7,4). Le culot est remis en suspension à l'aide d'une pipette pasteur. Les tubes sont emballés dans du papier aluminium et incubés 1h à T.A sur un agitateur horizontal 3D. Les culots sont rincés deux fois avec 5 ml de tampon Caco 0,1M (centrifugation de 1010 g pendant 2 minutes entre chaque rinçage). Un 3<sup>ème</sup> rinçage est effectué dans un volume de 1 ml en transférant les échantillons dans des tubes Eppendorf® de 1,5ml.

L'étape de post-fixation a lieu pendant 1h avec 1 ml d'osmium 1%. Puis 2 rinçages avec 1 ml d'eau sont effectués. Après le retrait d'un maximum de surnageant, 500 µl d'agarose low melting point 2% préchauffé à 50°C sont mélangés au culot à l'aide d'un cure-dent.

Les tubes sont laissés sur la glace pendant 20 minutes puis le culot pris dans l'agarose est récupéré en coupant le tube Eppendorf® au scalpel. Des petits cubes sont alors découpés et incubés dans de l'éthanol 10% pendant 2h. Les cubes sont déshydratés dans des bains successifs : Ethanol 30% - 15 min ; Ethanol 50% - 15 min ; Ethanol 70% - 15 min ; Ethanol 90% - 15 min ; Ethanol 100% - 15 min ; Ethanol absolu - 5min ; Ethanol absolu - 15 min ; Acétone - 5 min ; Acétone 15 min. Ils sont ensuite inclus dans de la résine par bains mixtes (résine Epon "Agar low viscosity premix kit medium" ref. R1165, fournisseur Agar Scientific, Oxford Instruments) :  $\frac{3}{4}$  Acétone  $\frac{1}{4}$  Epon - 2h ;  $\frac{1}{2}$  Acétone  $\frac{1}{2}$  Epon - nuit ;  $\frac{3}{4}$  Acétone  $\frac{1}{4}$  Epon - 2h ; puis par deux bains de résine purs pendant 2h et 5h. Enfin ils sont laissés à polymériser pendant 24h à 60°C. Les blocs polymérisés sont ensuite découpés au microtome en coupes de 90 nm d'épaisseur. Elles sont déposées sur une grille recouverte de Kevlar pour l'observation au MET.

## ***Article n°1: Micromethods for isolation and structural characterization of lipid A, and polysaccharide regions of bacterial lipopolysaccharides***

Alexey Novikov<sup>1</sup>, Aude Breton<sup>1,2</sup>, and Martine Caroff<sup>1</sup>

<sup>1</sup> LPS-BioSciences, Bâtiment 409, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France

<sup>2</sup> Institute for integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France

Springer protocols, Methods in Molecular biology: Microbial Toxins, Methods and Protocols,

Editors: **Holst**, Otto (Ed.). 2017

### ***In press***

Cet article regroupe quatre micro-méthodes d'analyse structurale des LPS par spectrométrie de masse MALDI-TOF et chromatographie sur couche mince. Elles sont illustrées avec des exemples d'intérêts. Ces méthodes sont indispensables pour étudier les activités biologiques des LPS extraits à partir de bactéries ou acheter dans le commerce.

L'analyse de la structure de trois lots de LPS commerciaux de *S. minnesota* Re 595 a été réalisée dans le cadre de la thèse. Nous constatons, après analyse par MALDI-MS et CCM, que ces trois échantillons sont composés de nombreuses espèces moléculaires et qu'ils sont de composition différente. Nous démontrons ici une non-reproductibilité entre ces trois lots.

# **Micromethods for isolation and structural characterization of lipid A, and polysaccharide regions of bacterial lipopolysaccharides**

**Alexey Novikov<sup>1</sup>, Aude Breton<sup>1,2</sup>, and Martine Caroff<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> LPS-BioSciences, Bâtiment 409, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France

<sup>2</sup> Institute for integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France

Corresponding author: martine.caroff@lpsbiosciences.com

Running Head: Micromethods for LPS structural analyses

## **Abstract**

Lipopolysaccharides (LPS) are major components of the external membrane of Gram-negative bacteria, providing them with an effective permeability barrier. They are essentially composed of a hydrophilic polysaccharide region (PS) linked to a hydrophobic one, termed lipid A. The LPS polysaccharide moiety is divided into the core oligosaccharide (OS) and O-chain repetitive elements. Depending on their individual variable fine structures, LPS may be potent immunomodulators. The lipid A structure is a key determinant for LPS activity. However, the presence of the core region, or at least of the highly charged Kdo molecules, is also important for preserving the native lipid A conformation within individual LPS molecules. We describe herein four rapid and practical micromethods for LPS, lipid A and core OS structural analyses. The first method allows the direct isolation of lipid A from whole bacteria cell mass; the second describes conditions for the sequential release of fatty acids enabling the characterization of their substitution position in the lipid A backbone, to be determined by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS). The third one is a microscale procedure for the mass spectra screening of LPS, lipid A and PS

using triethylamine and citric acid. The fourth method is a chromatography procedure for Rough-type LPS on Thin-Layer-Chromatography (TLC). These methods were developed to be coupled to mass-spectrometry (e.g. MALDI-MS) but can also be used with other analytical techniques (e.g. chromatography). Examples are given with reference to two major human pathogens: *Bordetella pertussis* and *Pseudomonas aeruginosa*; to one porcine pathogen: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; and to commercial samples of *Salmonella minnesota* Re595 LPS.

**Key Words:** GC: gas chromatography; Kdo: 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid. LOS: lipooligosaccharide; LPS: lipopolysaccharide; MALDI-MS: matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry; PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis; SDS: sodium dodecyl sulfate; TEA: Triethylamine; TLC: Thin-Layer-Chromatography

## 1. Introduction

Endotoxins are major components of the Gram-negative bacterial outer membrane and occur either as lipooligosaccharides (LOS) composed of a lipid A region covalently linked to a core oligosaccharide, or as lipopolysaccharide (LPS) composed of lipid A linked through a core oligosaccharide to a polysaccharide (O-chain), made of repetitive oligosaccharide subunits. Lipid A is anchored in the outer layer of the external membrane. In some bacteria, it is a powerful immunomodulator, responsible for most of the biological activities of the LPS. Small LPS amounts from such bacteria can have beneficial effects, but larger amounts may cause endotoxic shock.

Lipopolysaccharide and lipid A preparations are variably heterogeneous. This is seen in their ladder-like profile on SDS-PAGE or on thin-layer chromatograms (TLC) (1) and in LPS, lipid A and PS mass spectra (2, 3). This heterogeneity is due to different levels of biosynthesis

related to different numbers of O-chain repetitive units, as well as to variability in other structural elements like fatty acids, phosphate groups and other specific structural modifications (e.g. methylation, acetylation, substitution with different amino derivatives etc.). LPS molecular masses range from about 2 to 20 kDa.

Analysis and comparison of the separated structural regions of LPS are usually performed on samples from preparative-scale extractions (2). However, most commonly used methods for extracting both Smooth- and/or Rough-type LPS are time consuming and require an appreciable amount of bacteria.

We present here a method for the direct selective separation and extraction of lipid A from bacterial cells, and for their analysis by MS (4). The method, which is fast and easy, can be applied to  $\mu\text{g}$ -mg quantities of lyophilized bacteria, and is extremely efficient for analysis of bacterial isolates or samples recovered *in vivo*, as well as for checking modifications as a function of culture conditions for example. Use of the direct lipid A isolation method will be illustrated by MS analysis of *Pseudomonas aeruginosa* lipid A structural modifications induced by transitions between planktonic and biofilm growth styles of these bacteria (3).

Alkaline treatments of lipid A selectively remove ester-linked fatty-acids (5, 6). Following the kinetics of fatty-acids release, specific to each type (primary or secondary-linked), by MS we obtained more detailed structural information with respect to lipid A acylation patterns. This second method is perfectly compatible with the first one, and can be applied to micro amounts of lipid A directly isolated from bacteria, as illustrated using lipid A and LPS of *Bordetella pertussis*, the agent of whooping cough (7, 8).

A third one, amongst our methods, consists in the rapid cleavage of LPS and isolation of the lipid A together with the PS moieties for MS screening (9). The combination of triethylamine (TEA) a well-known lipid A solubilizing agent, and of citric acid, that we described for disaggregation of LPS aggregates (9) was used at a pH value of about 3.4 to 4.4, suitable for

LPS mild hydrolysis at 100°C. The potency of the two components was shown to increase the solubility, to improve desorption/ionisation, as well as to preserve LPS labile residues during hydrolysis (amino acids, phosphates). The screening of lipid A and PS mildly liberated from the crude LPS of different *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates, a porcine pathogen, together with the comparison of different commercial LPS from *Salmonella minnesota* Re595 mutant are illustrating here the potency of this method. The *Salmonella minnesota* deep-Rough mutant LPS were selected for being repeatedly described in the literature as the simplest and shortest LPS. This quick description led many biologists to using these LPS as the more common standards for testing biological activities. We show herein by MALDI-MS that the structure of these LPS are not as simple and reproducible as thought, and recommend their characterization by MS before use. TLC analysis also demonstrates the level of heterogeneity and non-reproductibility.

## **2. Materials and Techniques**

### ***2.1 Bacterial Strains and Cultures***

1. Grow Gram-negative bacterial cells in required experimental conditions.
2. Before harvesting, kill bacteria by a method appropriate for the species under study, e.g. in cold 2% phenol or by incubation for 40 min at 56°C and then examine the growth for the absence of viable bacteria.

### ***2.2 Chemicals***

**LPS:** The three different commercial batches of LPS from Re595 *Salmonella minnesota*, SmRe595-1: L-9764 55F-4023, SmRe595-2: L-9764 121H4026, and SmRe595-3: L9764 075M4033V, were all from Sigma-Aldrich and had been extracted by the phenol-chloroform-petroleum ether method.



**Solvents:** Ultra-pure water was obtained with a MILLIPORE Milli-Q® system (resistivity > 18 MΩ·cm). Chloroform and methanol of NORMAPUR grade were from PROLABO. **Acids:** Isobutyric acid (for synthesis grade) was from MERCK and citric acid NORMAPUR grade was from PROLABO. **Bases:** Ammonia 28% solution of NORMAPUR grade was from PROLABO; Methylamine 41% solution of purum grade was from Fluka; and Triethylamine was from CALBIOCHEM - MERCK. **MALDI-MS matrix:** 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) of purum grade was from Fluka.

### **2.3 Mass Spectrometry**

Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (**MALDI-MS**) instructions can be followed using appropriate MALDI-MS system.

The presented MS experiments were performed in the linear mode, with delayed extraction, using a Perceptive Voyager STR (PE Biosystem, France) and/or a Shimadzu Axima Performance time-of-flight mass spectrometer. The reflectron mode can be used to obtain a better resolution, but it could also lead to underestimation, or even loss, of some fragile molecular species (e.g. lipids A with substituted phosphate groups) due to their fragmentation between the ion-source and the reflector. Lipid A, cores, and LPS mass-spectra are recorded in the negative-ion mode at 20 kV with the adjustment of the extraction delay time to optimized resolution and signal-to-noise ratio. Spectra obtained in the positive-ion mode give important additional fragmentation data but they will not be presented here (**10**). (Note 8)

Analyte ions are desorbed from the DHB matrix by pulses from a 337 nm nitrogen laser. Addition of citric acid at a 0.1 M concentration to the matrix solution was found to greatly improve the resolution and signal-to-noise ratio of LPS, cores, and lipid A mass spectra (**11**). Citric acid chelates cations, and by insertion between the molecules causes disaggregation of LPS and lipid A micelles, thus improving solubility and co-crystallization of the analyte with the matrix resulting in a better desorption/ionization process (Note 9).

### 3. Methods

Isolation of lipid A is effected by mild hydrolysis of the acid-labile link between the proximal Kdo residue of the oligo- or poly-saccharide and the lipid moiety of LPS. The most widely used acetic-acid hydrolysis method to liberate free lipid A can also cleave other acid-labile lipid A bonds such as those linking glycosidic phosphate, ethanolamine pyro-phosphate, amino sugars (e.g. aminoarabinose (5) or glucosamine (8) esterifying lipid A phosphate groups). A later developed mild hydrolytic method using sodium-acetate at pH 4.4 (12), was modified by addition of 1% SDS, in order to disrupt micelles formed by amphiphilic LPS molecules (13). The modified method is presented here and used for comparison with the new micromethod (also presented below) (4). The latter procedure was found to be as mild as the former SDS-promoted hydrolysis and did not modify, or eliminate, any lipid A native element substitutions.

With the biological activities of LPS being intimately related to their structures (14, 15), it was a priority to find methods giving quick information on their structures, their stability and reproducibility with various batches, and their variability with their production under different growth conditions. As lipid A is responsible for most of the biological properties of the LPS molecule, it was necessary to find a new lipid A isolation method that was fast, mild and applicable to microscale bacterial samples. These conditions were achieved by hydrolyzing lipid A directly from the bacterial surface and using MALDI-MS for its characterization i.e. establishing its molecular heterogeneity, degree of acylation, presence of some fatty acids and other substituents (4). Our aim was to develop methods for the production of sufficient material for several purposes in addition to direct MS analysis, e.g. analyses by chromatography and application of selective mild-alkaline treatments for the sequential liberation of fatty acids in order to establish lipid A acylation patterns. The latter is illustrated

here with micro quantities of *Bordetella pertussis* lipids A directly isolated from bacterial cells. The lipids A, which were isolated by micro-hydrolysis of the bacteria, can thus be further characterized in a few hours as schematized in Fig. 1 with *B. pertussis* lipid A structure.

The triethylamine-citrate method gives quick data for the structural analysis of lipid A and PS moieties after mild hydrolysis of the native LPS molecules. The method is illustrated with three *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) field isolates and underlines the variability of core structures for LPS in a single species and even serotype. This method allows, at the same time, the screening of lipids A. In LPS commercial batches, it is indispensable to check the LPS structures present in a given sample as they could vary from one batch to another. The method, illustrated here with *Salmonella minnesota* Re595 Rough-type LPS confirms its important role and reliability.

### **3.1. Isolation of Lipid A from LPS on a Normal Analytical Scale (13)(Note 1)**

1. Suspend 5 mg of LPS in 500  $\mu$ L of a 10 mM sodium-acetate buffer (pH 4.4) containing 1% SDS in a screw-cap tube. Place in an ultrasonic bath to obtain a clear solution (Notes 2 and 5).
2. Heat the sample at 100°C for 1 h in an Eppendorf®-Thermomixer system or similar, under stirring at 1000 rpm. The duration can be adjusted depending on the solubility of the samples.
3. Cool in an ice-water bath and lyophilize the sample with an excess of water to avoid foam formation.
4. Remove SDS by washing with a mixture of 100  $\mu$ L of water and 500  $\mu$ L of acidified ethanol (prepared by adding 10  $\mu$ L of 4 M HCl to 2 mL of 95% ethanol). Centrifuge at 2000 x g for 10 min (Note 3).
5. Wash the sample twice again with 500  $\mu$ L of non-acidified ethanol and centrifuge.

6. Extract the lipid A from the dried sample by 500  $\mu\text{L}$  of a mixture of chloroform: methanol: water (3:1.5:0.25; by vol.).
7. Dry the lipid A extract, disperse it in 500  $\mu\text{L}$  of water by sonication and lyophilize to yield the lipid A as a powder.

### ***3.2. Isolation of Lipid A and PS from LPS: A Rapid MicroScale Method, using Triethylamine-Citrate, and Preserving Labile Constituents (9)***

This micromethod was aimed at using the TEA-citrate reagent for facilitating MS analysis thanks to its ability to disaggregate LPS molecules as well as to retaining bivalent cations.

The method is thus used first for LPS analysis without heating, then for obtaining spectra of the separated lipid A and core constituents. MALDI-TOF is a semi-quantitative MS method and it can be used to determine the composition and the predominant LPS species present in each sample (Notes 1, and 6).

1. Suspend LPS samples in an Eppendorf® tube (Note 10) at a concentration of 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  for Rough-type and 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  for Smooth-type in 0.01 M TEA-citrate (1:1 molar ratio, pH 3.6). Disperse the LPS suspension by agitation (vortex) and use of ultrasonic bath if available.
2. Dilute the 5-10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  stock solution to 1-2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  concentration with 0.01 M TEA-citrate. Sonicate it again. The sample is ready for MALDI-MS analysis as described in 3.4.
3. Split the lipid A and PS regions by heating the initial sample (5-10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) at 100°C for 1 h in an Eppendorf®-Thermomixer system or similar, under stirring at 1000 rpm (Note 4). The minimal final volume should be kept around 40  $\mu\text{L}$  to avoid evaporation. Cool the samples for 5 min at 4°C or in an ice-water bath and then perform a short 20 s spin to recover the drops from the top and vortex.

4. Analyze directly the hydrolyzed micro-samples by MS: Dilute the hydrolysate to 1-2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  concentration with 0.01 *M* TEA-citrate and sonicate. The sample is ready for MS analysis. Use DHB in 0.1 *M* aqueous citric acid as the matrix solution. Both lipid A and PS related molecular ions are expected to be observed, (Notes 6, 7, 8).
5. Lyophilize or desiccate the hydrolyzed samples.
6. Extract the excess of salt with methanol: add methanol at a concentration of 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  and suspend the sample by sonication using an ultrasonic bath. Centrifuge the tube at 4°C, 7000 x *g* for 10 min. Discard the methanol supernatant. Good practice would be to test the methanol supernatant by MALDI-MS to be sure that no specific molecular species are lost (Note 3).
7. Extract the lipid A from the pellet with a mixture of chloroform: methanol: water (3: 1.5: 0.25; by vol.) at a concentration of 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Suspend the pellet by sonication. Centrifuge the tube at 4°C, 7000 x *g* for 10 min. Recover the supernatant.
8. Repeat Stage 7 with half a volume of the chloroform: water mixture. Pool both chloroform: methanol: water supernatants. The sample is ready for lipid A analysis as described in 3.4.
9. Suspend the pellet in water at 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  and homogenize by using vortex and sonication. Centrifuge the tube at 4°C, 7000 x *g*, during 20 min. Dilute the supernatant containing the PS moiety if necessary, then deposit it on the MALDI sample plate, cover with the matrix solution (10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  DHB in 0.1 *M* aqueous citric acid) and let dry as described in 3.4.

A quick version of the method also gives good results by testing native LPS samples suspended in TEA-Citrate as described. Then compare it to a sample of the same mixture directly after treatment at 100°C. In this case, there is no need to remove salts, they were selected for direct use. The longer version of the method presented above is

only necessary when samples have never been studied, when masses are not already known, and when superposed lipid A and core peaks cannot be sorted out. The quick method is very convenient for rapid comparison between different batches, growth conditions, species, or kinetics of hydrolysis (Note 1, 2, 4, 5).

### ***3.3. Isolation of Lipid A from Whole Cells: A Micro Method (4)(Note 1)***

1. After collecting a culture pellet, wash the cells with a buffer or water, only if necessary as it could fragilize LPS molecules, and lyophilized it.
2. Suspend 10 mg of lyophilized bacteria in 400  $\mu\text{L}$  of a mixture of isobutyric acid:1 *M* ammonium hydroxide (5:3; by vol.) under the hood, in a screw-cap tube and heat 2 h at 100°C with stirring (Notes 2, and 10)
3. Cool the sample to 4°C, and centrifuge at 2000 x *g* for 15 min.
4. Dilute the supernatant with water (1:1; by vol.) and lyophilize it.
5. Wash the material obtained twice with 400  $\mu\text{L}$  of methanol and centrifuge (2000 x *g* for 15 min).
6. Extract the insoluble lipid A twice with 100  $\mu\text{L}$  of chloroform:methanol:water (3:1.5:0.25; by vol.). This extract can be used directly for MALDI-MS (Notes 6, and 8).

### ***3.4. MALDI-Mass Spectrometry of Isolated LPS, Lipid A and Core moieties (11)***

1. Take up LPS at 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  in water, drop 1  $\mu\text{L}$  on the plate. Desalt the solution with a few grains of Dowex 50W-X8 ( $\text{H}^+$ )(Note 8).
2. Take up lipid A in a mixture of chloroform:methanol:water (3:1.5:0.25; by vol.) at 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  or use directly the lipid A extract obtained in 3.2. Desalt the solution with a few grains of Dowex 50W-X8 ( $\text{H}^+$ ) (Note 7, and 8).

3. Take up core and/or PS moieties at 1 µg/µL in water. Desalt the solution with a few grains of Dowex 50W-X8 (H<sup>+</sup>) (Note 7, and 8).
4. Drop 0.5 to 1 µL of the different solutions on the target.
5. Add 0.5 to 1 µL of the matrix solution, (DHB dissolved at 10 µg/µL in the same solvent for lipid A, or in 0.1 M citric acid in water for LPS and PS) and dry.  
Different ratio between sample and matrix have to be tested for defining the best concentrations (0.5:1/1:1/1:0.5).
6. Submit the sample on the target to MALDI-MS analysis as described in section 2.3 (Notes 6, and 8).

### ***3.5. Sequential Liberation of Ester-Linked Fatty Acids of LPS, or Lipid A, by Mild Alkali Treatment for Analysis by Mass Spectrometry***

Sequential fatty-acid release by mild-alkali treatment was found to be useful in establishing lipid A acylation patterns (5, 6). Fatty acids being ester-linked in direct acylation of the di-glucosamine backbone (primary acylation) were released more readily than those bound to the hydroxyl groups of other fatty acids (secondary acylation). We set up experimental conditions for breaking: 1) only primary ester fatty acid bonds and 2) all fatty acid ester bonds. The conditions were established from our experience with numerous samples and proved that the technique can be scaled down if LPS or lipid A supply, is limiting (Note 1).

1. Dry under a stream of nitrogen, lipid A solutions (50 µL), obtained in 3.2 and 3.3., or the equivalent amount of LPS in an Eppendorf® tube (Note 10).
2. In order to only liberate primary ester-linked fatty acids, add 50 µL of 28% ammonium hydroxide, sonicate, then close the tube and stir for 5 h at 50°C in a Thermomixer-system or in a simple thermostated bath using magnetic stirring (Notes 4, and 5).
3. Dry the sample under a stream of nitrogen.

4. Take up the modified lipid A into 50  $\mu\text{L}$  of a mixture of chloroform: methanol: water (3:1.5:0.25; by vol.) or into 50  $\mu\text{L}$  of water when a LPS sample is treated. This sample is ready to be analysed by MS, as described in 3.4 (Notes 6, 7, 8).
5. In order to liberate both the primary and secondary ester-linked fatty acids, repeat the above steps 1 to 4 replacing ammonium hydroxide by 41% methylamine and keeping the mixture for 5 h at 37°C under stirring.
6. If necessary, the liberated fatty acids can be recovered by extraction and tested by GC/MS.

## 4. Examples of Analysis

### *4.1. Illustration of Pseudomonas aeruginosa Lipid A Structural Modifications Induced by the Switch Between Planktonic and Biofilm Lifestyles (3)*

The micro-method for lipid A isolation, directly from bacterial cells, is particularly useful for comparing the lipid A structures of different species and strains of a genus, as well as for the same bacteria grown under different culture conditions (e.g. media, temperature, oxygen tension, salt stress, bivalent ions concentration etc.), or colonising different niches (e.g. environmental isolates versus clinical isolates) (Note 1).

Here, we give the example of lipids A isolated from *P. aeruginosa* strain PAO1 grown in planktonic culture, in biofilm, then in planktonic culture inoculated by biofilm isolated bacteria (hereafter assigned as “B->P” culture). Mass spectra of the lipids A, extracted by the micro-method from ~4 mg samples of dried bacteria cultured in these three ways are presented in Figs. 2A, B and C, the corresponding structures are presented in Fig. 2D. The observed modifications contribute to higher inflammatory response in human monocytes (2).



## 4.2. Fatty Acids Positioning on the Di-Glucosamine Backbone, by Sequential Alkaline

### Treatment (6): Example of *Bordetella pertussis* Lipid A

The kinetics of esterified fatty acid liberation from lipid A samples, was shown to be dependant on the substitution pattern, and could be used to determine the fatty-acid linkage. We first showed that liberation of primary ester-linked fatty acid (at C3 and C3') was much faster than that of the fatty acids in secondary ester linkages (at C2 and C2' acyloxyacyls) thus allowing a distinction between them by the application of the two-steps protocol described in 3.5 (6). Furthermore, we observed that following kinetics of primary fatty-acid liberation, we could discriminate between the fatty acids located at the C3 and C3' positions. The kinetics presented in Fig. 3A was obtained from *B. pertussis* Tohama I LPS sample (8) selected for its basically single lipid A molecular-species composition. In the initial mass spectrum (T=0), only one lipid A major peak is observed at  $m/z$  1559, corresponding to the structure displayed in Fig. 1. We followed the evolution of the mass spectra as a function of time, during the alkaline treatment (28% ammonium hydroxide at 50°C). Mass spectra were recorded after treatment times of 8 min, 15 min, 30 min, 1 h and 2 h. Drastic differences in the fatty-acid releasing times were observed that related to their linkage position. Thus, at C3, the 10:0(3-OH) is completely liberated only after 8-15 min, transforming the initial penta-acyl lipid A into a tetra-acyl one ( $m/z$  1389), while at C3', the 14:0(3-OH) is only released after 1-2 h, leading to disappearance of the peak at  $m/z$  1389, and to the consecutive appearance of the one at  $m/z$  1163. The time of release of the acyloxyacyl 14:0 at C2' is again much longer. In fact, to completely cleave this bond requires the use of stronger hydrolysis conditions, as described in 3.5. Only after this second treatment, the peak at  $m/z$  953 remains in the spectrum, corresponding to a di-acyl lipid A with amide-linked 14:0(3-OH) fatty acids at C2 and C2' (data not shown). Similar kinetics was obtained from a lipid A sample (Fig. 3B). In this case, we used lipid A from *B. pertussis* 1414 strain that was obtained by direct hydrolysis of dried

bacterial cells. Two major molecular species were present in the initial spectrum at  $m/z$  1559 (penta-acyl lipid A) and at  $m/z$  1333 (tetra-acyl lipid A with a free position at C3'). In conclusion, twice as long treatments were necessary to liberate the same fatty acids from the lipid A sample compared to LPS, probably owing to solubility differences between the two samples.

#### **4.3. Illustration of the TEA-Citrate method with *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Core and lipid A screening among three field isolates**

Cultures of three field isolates studied in this work were obtained from Professor Gottschalk laboratory, Montreal University, Faculty of Veterinary Medicine. The isolates were denoted as FMV94-9216, 00-7025 and 13-007 by the furnisher. All the three samples were of serotype 1 according to the structure of their capsular polysaccharides, (Note 1). Preliminary analyses of LPS by SDS-PAGE confirmed Smooth-type phenotypes to be similar to that of a reference serotype 1 strain (*16, 17*).

Crude LPS were extracted from lyophilized bacteria (*18*). TEA-citrate hydrolysis was applied to these samples as described in Section 3.2. MALDI-MS was performed as described in 3.4 (Notes 6, 7, 8, 10).

The lipid A profiles of the three isolates are very similar (Fig. 4 A, B, C), with a major hexa-acyl molecular species appearing at  $m/z$  1825 (Fig. 4G). Minor penta- and tetra-acyl molecular species are observed at  $m/z$  1615 and at  $m/z$  1389 respectively

First of all, it should be noted that all core-OS peaks correspond to their anhydrous form. This is consistent to the fact reported earlier (*17*) that the only Kdo residue present is phosphorylated at the C4 position. As shown earlier (*19*) this substitution is lost during acid hydrolysis, by beta-elimination. Absence of satellite peaks at +18 mass units corroborate the fact that the Kdo molecule is 100% phosphorylated, (Note 5).

The core-oligosaccharide structure described for serotype 1 App (*17*) represents a deca-saccharide (Kdo + 4 Hep + 2 Glc + 2 Gal + GalNAc). The anhydrous form of this classical structure is observed at  $m/z$  1840 (see Figs. 4E, F). It is observed for the field isolates 13-007 and 00-7025 (Fig.4F and E respectively). Isolate 00-7025 reveals the presence of nona-saccharides in which the terminal GalNAc residue is missing ( $m/z$  1636, Fig. 4E), and isolate FMV94-9216 reveal major octa-saccharide missing the terminal GalNAc-Gal disaccharide ( $m/z$  1474, Fig. 4D).

For all the tree isolates core-OS molecular species are observed substituted with one or two Gly residues at +57 or +114 mass units (*9*). For isolate 13-007 (Fig 4F) major molecular species correspond to non-substituted deca-saccharide with a smaller peak corresponding to one Gly substitution. For 00-7025 and FMV94-9216 isolates, the major peaks correspond to species substituted with one Gly residue ( $m/z$  1897, 1693 and 1531) as well as with two Gly residues ( $m/z$  1954, 1750 and 1588).

The LPS core moieties of this porcine pathogen was shown to be responsible for adhesion to respiratory tract cells and mucus (*20*). The presence of Gly was reported to influence the vaccine capacities of the corresponding structures (*21*) .

#### **4.4. Lipid A screening of three commercial LPS batches from Re595 *Salmonella minnesota***

##### **4.4.1 Thin-Layer-Chromatography**

It has been described in the early 90s (*1*) that different proportions of isobutyric acid-1M ammonium hydroxide could be used as mobile phase for TLC analysis of LPS, lipid A and core oligosaccharides. Here, a new ratio between the two components was shown to be efficient for comparing the three Re595 deep-Rough mutants by HPTLC.

1. Deposit the solutions (2  $\mu\text{L}$ ) of the three Re595 mutant LPS batches (25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  in water) in lanes of 0.5 cm on the baseline of HPTLC Silica-gel coated glass-plates (Merck).
2. Develop for 1.5 h for separating the different molecular species in the solvent mixture made of isobutyric acid:1M ammonium hydroxide, (5:2; by vol.), (Note 2).
3. Reveal the spots by charring (10% Sulphuric acid in Ethanol).

As shown in Fig. 5, the three LPS HPTLC profiles are fairly different and too much complicated for representing the well-known simplest LPS structure with lipid A and two Kdo molecules, they are often referred to. Sample A contains at least 8-10 molecular species, sample B at least about the same number but with different types, and with differences in the relative intensity of each type. Sample C revealed to be the less heterogeneous, with 4 to 6 molecular species. To better characterize the structural heterogeneity of each sample, we performed a comparative MALDI-MS analysis of the three samples, as presented below.

#### **4.4.2 TEA-citrate hydrolysis of the three TLC tested (4.4.1) commercial *S. minnesota* Re595 LPS followed by MALDI-MS analysis of their lipids A**

The TEA-Citrate treatment was used to quickly compare the structures present in the three commercial LPS samples, (Note 1).

The lipid A is generally composed of 6 fatty acids: 14:0(3-OH) linked at C-2 and C-3, 14:0(3-(12:0)) linked at C-2', and 14:0(3-C14:0) at C-3'. Post-translational modifications often appear with, for example, esterification of the 14:0 (3-OH) at C2 by a 16:0. The phosphate groups on GlcN I or II could be substituted by phospho-ethanolamine (PEA) or Arap4N residues (22). As shown on Fig. 6, and expected after the TLC results, the three lipid A spectra showed differences and behaved differently upon hydrolysis, (Note 6,7,8, 10):

- For the three samples, the major peak appears at  $m/z$  1797 and corresponds to a hexa-acylated molecule. The dephosphorylated associated molecule ( $m/z$  1917) is present in different amounts depending on the batch. Batch 2, which was submitted to a shorter time of hydrolysis (20min. vs 45 min. for the two other samples) already presents the highest level of dephosphorylation, followed by batch 3 at 45 min. Batch 1 only displays a negligible peak of monophosphoryl lipid A. These results demonstrate that some important dephosphorylation can take place, even under very mild hydrolysis conditions. From the huge dephosphorylation level observed just after 20 min of treatment in sample 2, we have to consider that the preparation of this very sample lead to important physico-chemical differences, and this impacts the experiments, at the structural, and therefore biological level, (Note 4).
- The peak at  $m/z$  1920 corresponds to a hexa-acylated molecular species substituted with a PEA group. It is hardly detected in batch 1.
- The peak at  $m/z$  1928 corresponds to the 1797 molecular species substituted with an Arap4N residue. This substitution is present in the three batches.
- Lipid A molecular species containing 16:0 (corresponding to peaks at  $m/z$  2035) vary in intensity from one to another batch, and batches 2 and 3 display this palmytoylated form, also substituted with PEA ( $m/z$  2158).
- The penta-acylated lipid A molecular species are observed in the three batches at  $m/z$  1587 (with their dephosphorylated equivalent molecular species at  $m/z$  1507 for batch 2). Proportions vary greatly depending on each batch.
- The tetra-acylated lipid A molecular species appears as a major peak in the batch 1 spectrum, and such structures are known for their antagonist activity. It is present at a much smaller proportion in Batch 2 and absent from batch 3.

The corresponding described lipid A structures are given in Fig. 7. The influence of the number and nature of fatty acids in biological studies has already been stressed (23).

Different commercial batches from a single supplier, or from different ones cannot be considered as identical, just by referring to their name.

## 5. Notes

1. The methods presented here are rapid, facile and effective procedures for the analysis of microscale samples and for following the evolution and biosynthesis of lipid A structures under different growth conditions, as illustrated. The method can also be readily adapted to the verification of quality and reproducibility of the bacterial production.
2. Each method can be experimentally adapted to the starting material and to the amount of bacterial sample.
3. In the large scale LPS hydrolysis method (3.1), the ethanol supernatant should remain clear during the SDS extraction step, otherwise some lipid A might be lost in this fraction. If this is the case, ethanol should be concentrated and added back to the sample before re-extraction, and the centrifugation step should be performed at a higher speed and lower temperature. The same applies to any “washing steps”.
4. Each hydrolysis time is given as the optimum for the large amount of different LPS samples tested, however if some dephosphorylation is observed in the spectra, the acid hydrolysis time should be reduced and adjusted for a given LPS.
5. A phosphorylated terminal Kdo unit can render the glycosidic bond less labile (24). Depending on the mass ratio between the glycosidic and lipid moieties, the degree of acylation of the lipid A, as well as the presence of polar groups, the solubility of the samples can be highly variable. As with all methods, adjustments in the experimental conditions are sometimes required.

6. During MS analysis, different ratios between sample and matrix volumes should be tested in order to obtain the best-quality spectra with respect to signal-to-noise ratio and to the resolution of the peaks.
7. The desalting process performed with the Dowex resin before MS analysis is a crucial step. It can be easily effected by the deposition of a drop of water on a piece of Parafilm® on which a few grains of resin are added and mixed. Mixtures with chloroform are desalted in an Eppendorf® tube.
8. MALDI-MS is a very convenient MS process; however, depending on the temperature, humidity or other variables the crystallisation can be a critical step and has to be repeated if a spectrum is weak or absent.
9. Other MS methods can be successfully performed, but they are often more dependant on the presence of salt and other contaminants, and thus requiring further purification steps.
10. Polypropylene screw cap Eppendorf ® tubes can be used for all stages of microscale sample preparation. Preliminary tested and certified by the manufacturer tubes should be used. Use of tubes of unknown origin and poor plastic quality can lead to appearance in mass-spectra of plastic related artefact peaks (a polymer with 44 mass units repeating pattern is putatively attributed to polyethylene glycol). It is therefore recommended to test all new batches.

## **Acknowledgements**

Aude Breton is a recipient of a CIFRE grant in collaboration with the LPS-BioSciences company. We thank Pr. Gottschalk for his kind exchanges and expertise with App strains and isolates.

## References

1. Caroff MGL, Karibian D (1990) Several uses for isobutyric acid-ammonium hydroxide solvent in endotoxin analysis. *Appl Environ Microbiol* 56:1957–1959.
2. Caroff M, Brisson JR, Martin A, Karibian D (2000) Structure of the *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. *FEBS Lett* 477:8–14. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01720-8
3. Ciornei CD, Novikov A, Beloin C, Fitting C, Caroff M, Ghigo JM, Cavaillon JM, Adib-Conquy M (2010) Biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* bacteria undergo lipopolysaccharide structural modifications and induce enhanced inflammatory cytokine response in human monocytes. *Innate Immun* 16:288–301. doi: 10.1177/1753425909341807
4. El Hamidi A, Tirsoaga A, Novikov A, Hussein A, Caroff M (2005) Microextraction of bacterial lipid A: easy and rapid method for mass spectrometric characterization. *J Lipid Res* 46:1773–1778. doi: 10.1194/jlr.D500014-JLR200
5. Aussel L, Therisod H, Karibian D, Perry MB, Bruneteau M, Caroff M (2000) Novel variation of lipid A structures in strains of different *Yersinia* species. *FEBS Lett* 465:87–92.
6. Tirsoaga A, El Hamidi A, Perry MB, Caroff M, Novikov A (2007) A rapid, small-scale procedure for the structural characterization of lipid A applied to *Citrobacter* and *Bordetella* strains: discovery of a new structural element. *J Lipid Res* 48:2419–27. doi: 10.1194/jlr.M700193-JLR200
7. Caroff M, Deprun C, Richards JC, Karibian D (1994) Structural characterization of the lipid A of *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. *J Bacteriol* 176:5156–5159.
8. Marr N, Tirsoaga A, Blanot D, Fernandez R, Caroff M (2008) Glucosamine found as a substituent of both phosphate groups in *Bordetella* lipid A backbones: role of a BvgAS-activated ArnT ortholog. *J Bacteriol* 190:4281–4290. doi: 10.1128/JB.01875-07
9. Chafchaoui-Moussaoui I, Novikov A, Bhrada F, Perry MB, Filali-Maltouf A, Caroff



- M (2011) A new rapid and micro-scale hydrolysis, using triethylamine citrate, for lipopolysaccharide characterization by mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 25:2043–2048. doi: 10.1002/rcm.5084
10. Karibian D, Brunelle A, Aussel L, Caroff M (1999) 252Cf-plasma desorption mass spectrometry of unmodified lipid A: fragmentation patterns and localization of fatty acids. *Rapid Commun Mass Spectrom* 13:2252–2259. doi: 10.1002/(SICI)1097-0231(19991130)13:22<2252::AID-RCM783>3.0.CO;2-G
  11. Therisod H, Labas V, Caroff M (2001) Direct microextraction and analysis of rough-type lipopolysaccharides by combined thin-layer chromatography and MALDI mass spectrometry. *Anal Chem* 73:3804–3807. doi: 10.1021/ac010313s
  12. Rosner MR, Tang J, Barzilay I, Khorana HG (1979) Structure of the lipopolysaccharide from an *Escherichia coli* heptose-less mutant. I. Chemical degradations and identification of products. *J Biol Chem* 254:5906–5917.
  13. Caroff M, Tacken A, Szabo L (1988) Detergent-accelerated hydrolysis of bacterial endotoxins and determination of the anomeric configuration of the glycosyl phosphate present in the “isolated lipid A” fragment of the *Bordetella pertussis* endotoxin. *Carbohydr Res* 175:273–282.
  14. Caroff M, Karibian D (2003) Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res* 338:2431–2447. doi: 10.1016/j.carres.2003.07.010
  15. Caroff M, Karibian D, Cavaillon JM, Haeffner-Cavaillon N (2002) Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect* 4:915–926.
  16. Altman E, Brisson JR, Perry MB (1986) Structure of the O-chain of the lipopolysaccharide of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 1. *Biochem Cell Biol* 64:1317–25.
  17. Caroff M (2004) Novel method for isolating endotoxins. PCT WO04062690, 2005

18. Michael FS, Brisson JR, Larocque S, Monteiro M, Li J, Jacques M, Perry MB, Cox AD (2004) Structural analysis of the lipopolysaccharide derived core oligosaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, 5a and the genome strain 5b. *Carbohydr Res* 339:1973–1984. doi: 10.1016/j.carres.2004.04.019
19. Lebbar S, Haeffner-Cavaillon N, Karibian D, Le Beyec Y, Caroff M (1995) 252Cf-plasma desorption mass spectrometry analysis of lipids A obtained by an elimination reaction under mild conditions. *Rapid Commun Mass Spectrom* 9:693–696. doi: 10.1002/rcm.1290090812
20. Ramjeet M, Deslandes V, St Michael F, Cox AD, Kobisch M, Gottschalk M, Jacques M (2005) Truncation of the lipopolysaccharide outer core affects susceptibility to antimicrobial peptides and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *J Biol Chem* 280:39104–39114. doi: 10.1074/jbc.M502852200
21. Gamian A, Mieszala M, Lipiński T, Zielińska-Kuźniarz K, Gawlik-Jędrzyśiak M, Dzierżba K, Pietkiewicz J, Szeja W (2011) O-aminoacylation of bacterial glycoconjugates: from native structure to vaccine design. *Curr Pharm Biotechnol* 12:1781–91.
22. Karibian D, Deprun C, Caroff M (1993) Comparison of lipids A of several *Salmonella* and *Escherichia* strains by 252Cf plasma desorption mass spectrometry. *J Bacteriol* 175:2988–2993.
23. Heine H, Rietschel ET, Ulmer AJ (2001) The biology of endotoxin. *Mol Biotechnol* 19:279–296. doi: 10.1385/mb:19:3:279
24. Caroff M, Lebbar S, Szabó L (1987) Do endotoxins devoid of 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid exist? *Biochem Biophys Res Commun* 143:845–847. doi: 10.1016/0006-291X(87)90326-3

## Figures

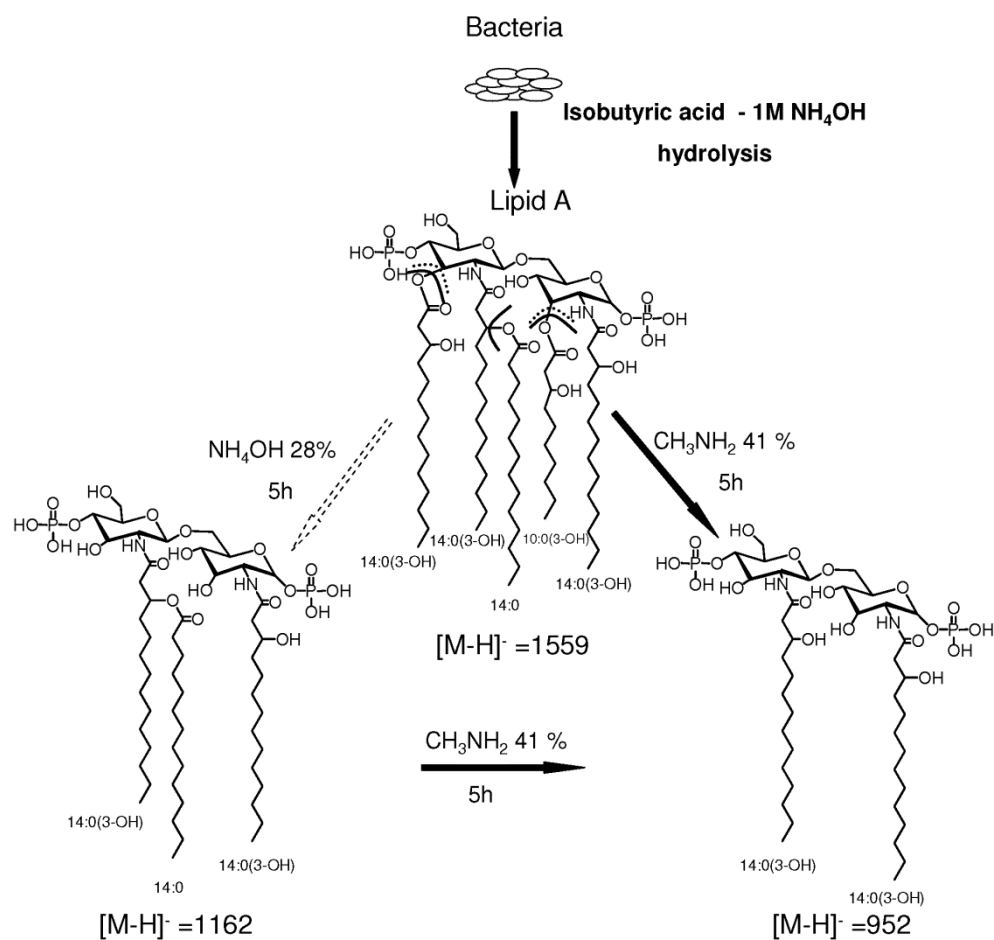


Fig.1: Schematic representation of the analytical steps used for the analysis of lipid A isolated after hydrolysis of freeze-dried bacteria. The latter were hydrolysed in a mixture of isobutyric acid-1 M ammonium hydroxide (5:3; by vol.) for 2 h at 100°C. The dotted arrow indicates alkaline treatment for 5 h at 50°C with 28% ammonium hydroxide leading to partial *O*-deacylation, and the black arrows indicate alkaline treatment for 5 h at 37°C with 41% methylamine, leading to complete *O*-deacylation. The structure displayed is that of *B. pertussis* lipid A.

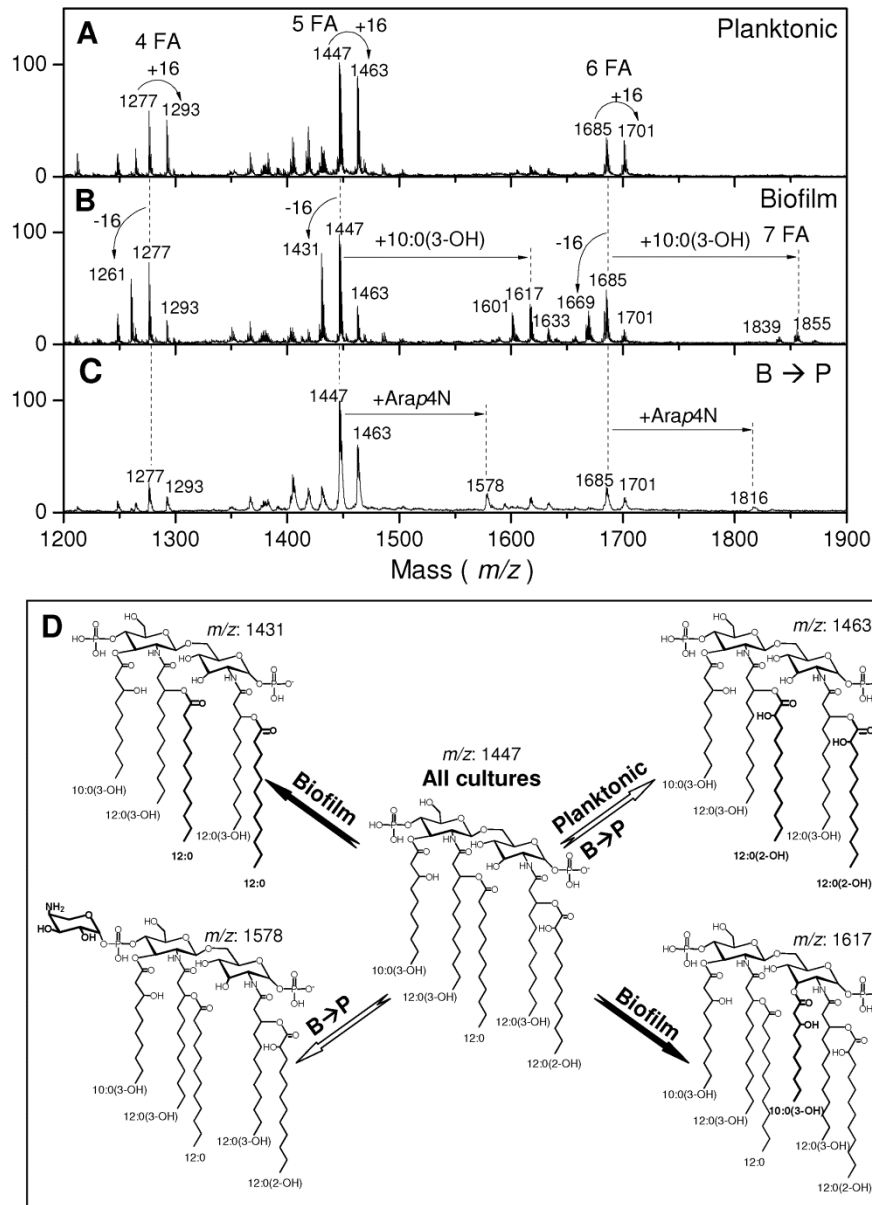


Fig. 2: Negative-ion MALDI mass-spectra of lipids A isolated (A) from a planktonic culture of PAO1 bacteria, (B) from biofilm ones, and (C) from Biofilm to planktonic cultures. 4FA: four fatty acids, 5 FA: five fatty acids, 6 FA: six fatty acids, 7 FA: seven fatty acids. (D) Structures of the major hexa-acyl lipid A species appearing at  $m/z$  1617 and of the different penta-acyl lipid A species appearing at  $m/z$  1431, 1447, 1463 and 1578. Comparison of MALDI mass-spectra shows an important decrease of the 12:0(2-OH) content, and an increase of 12:0 content in the lipid A of biofilm cultured bacteria.

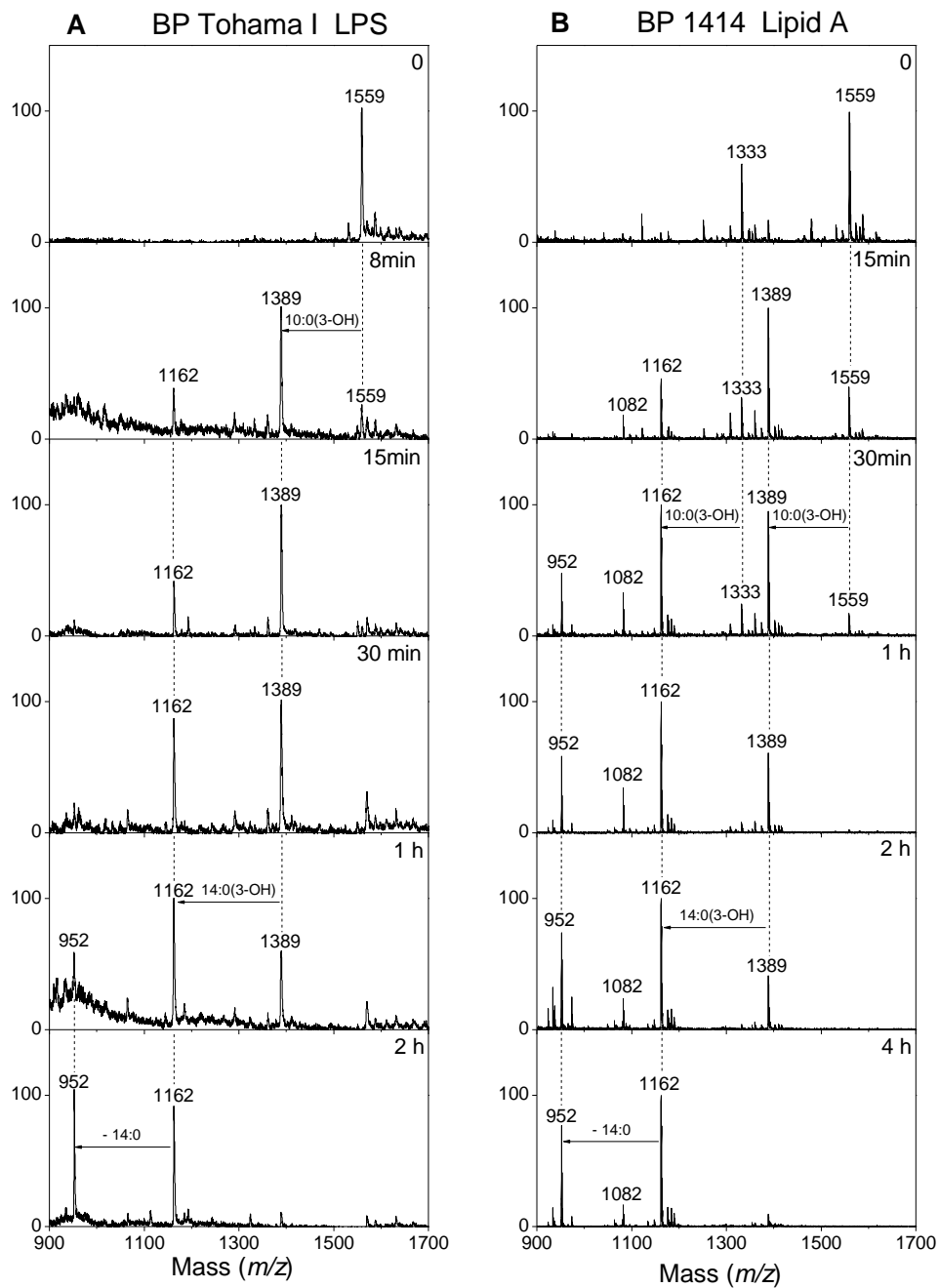


Fig.3: Negative-ion MALDI mass spectra of lipid A obtained from: (A) *B. pertussis* strain Tohama I LPS, and (B) *B. pertussis* strain BP1414 lipid A. The corresponding time of hydrolysis with 28% ammonium hydroxide at 50°C is given in each spectrum. A clear difference is observed for fatty-acids release between the two samples, due to differences in solubility. Both strains also display different natural degrees of heterogeneity

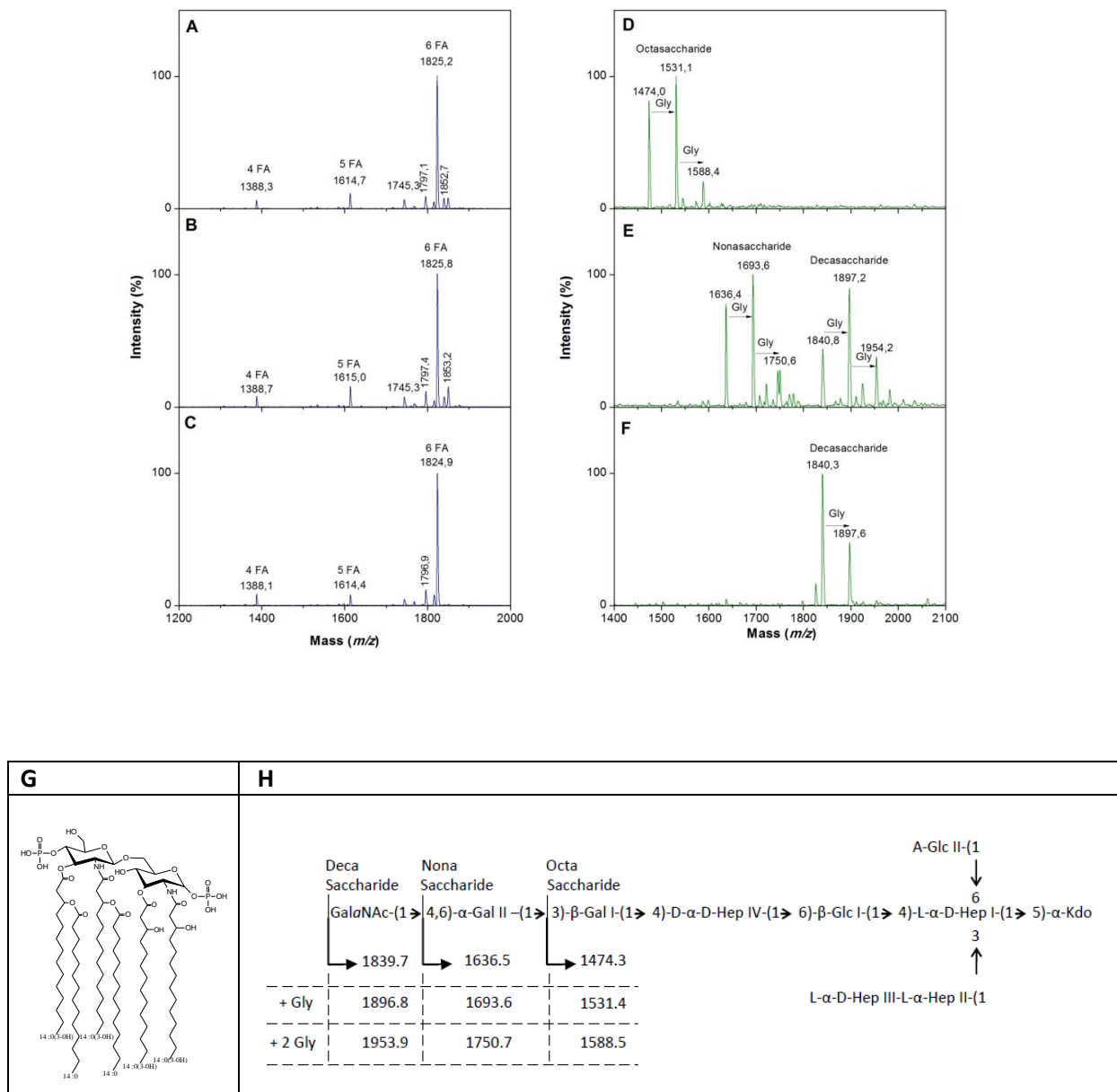


Fig.4: MALDI-MS analysis of lipid A and core OS regions of LPS from three *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 field isolates. A, B, C: lipid A negative-ion mass-spectra obtained respectively for isolates FMV94-9216, 00-7025 and 13-007. D, E, F: core OS negative-ion mass-spectra obtained respectively for isolates FMV94-9216, 00-7025 and 13-007. G: structure of the major hexa-acyl lipid A molecular species from *A. pleuropneumoniae*. F: complete and incomplete core OS structures of *A. pleuropneumoniae* serotype 1, observed for the three field isolates under study. S=Sugar.

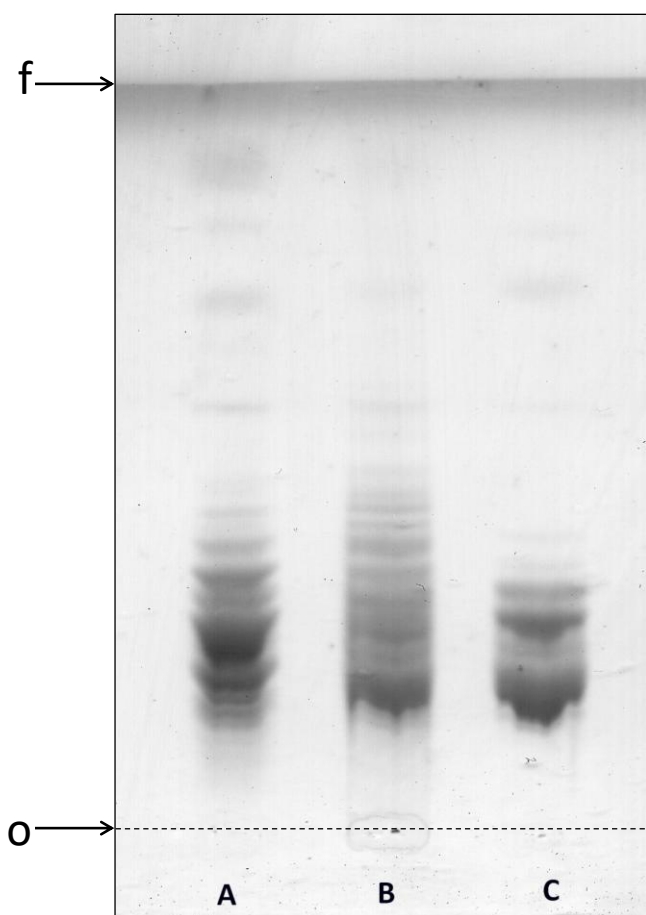


Fig. 5: HPTLC migration of the three samples (A) 50  $\mu\text{g}$  SmRe595-1, (B) 60  $\mu\text{g}$  SmRe595-2 (C) 30  $\mu\text{g}$  SmRe595-3 in isobutyric acid: 1M ammoniac (5:2; by vol.). The three samples display different profiles of migration indicating structural diversity and heterogeneity between them.

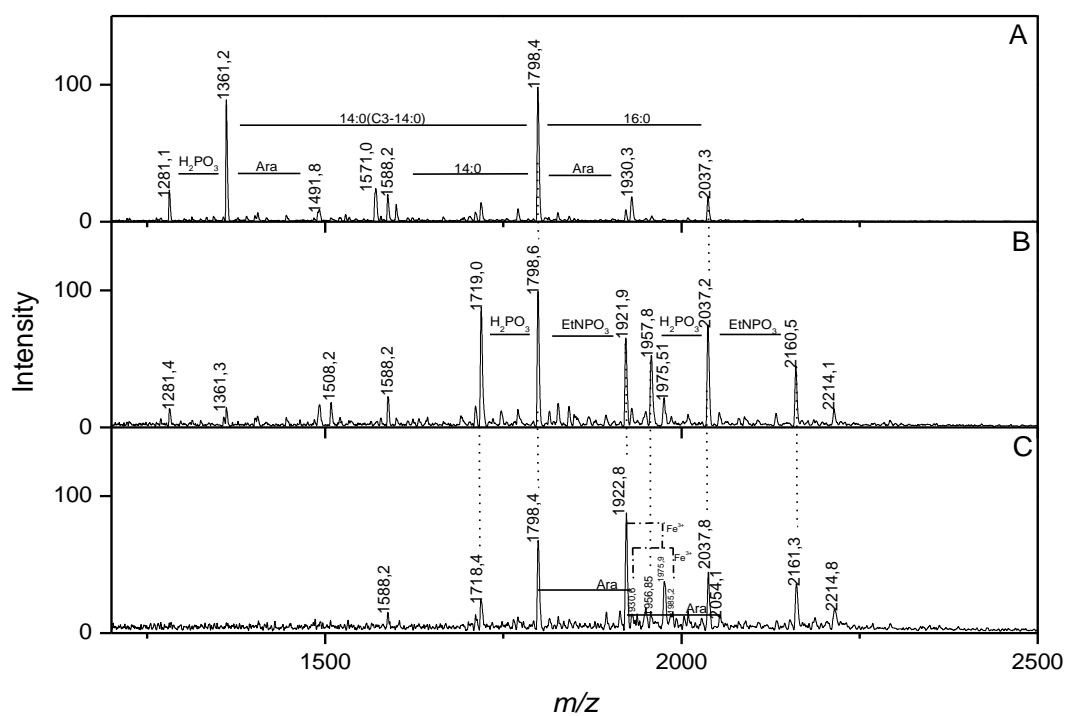


Fig. 6: Negative-ion MALDI mass-spectra of lipid A after TEA-Citrate treatment. (A) SmRe595-1, 45 minutes of treatment; (B) SmRe595-2, 20 minutes of treatment; (C) SmRe595-3, 45 minutes of treatment. Arap4N: Arabinose, EtNPO<sub>3</sub>: Ethanolaminephosphate, H<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>: phosphate group, 14:0: myristic acid, 16:0: palmitic acid.



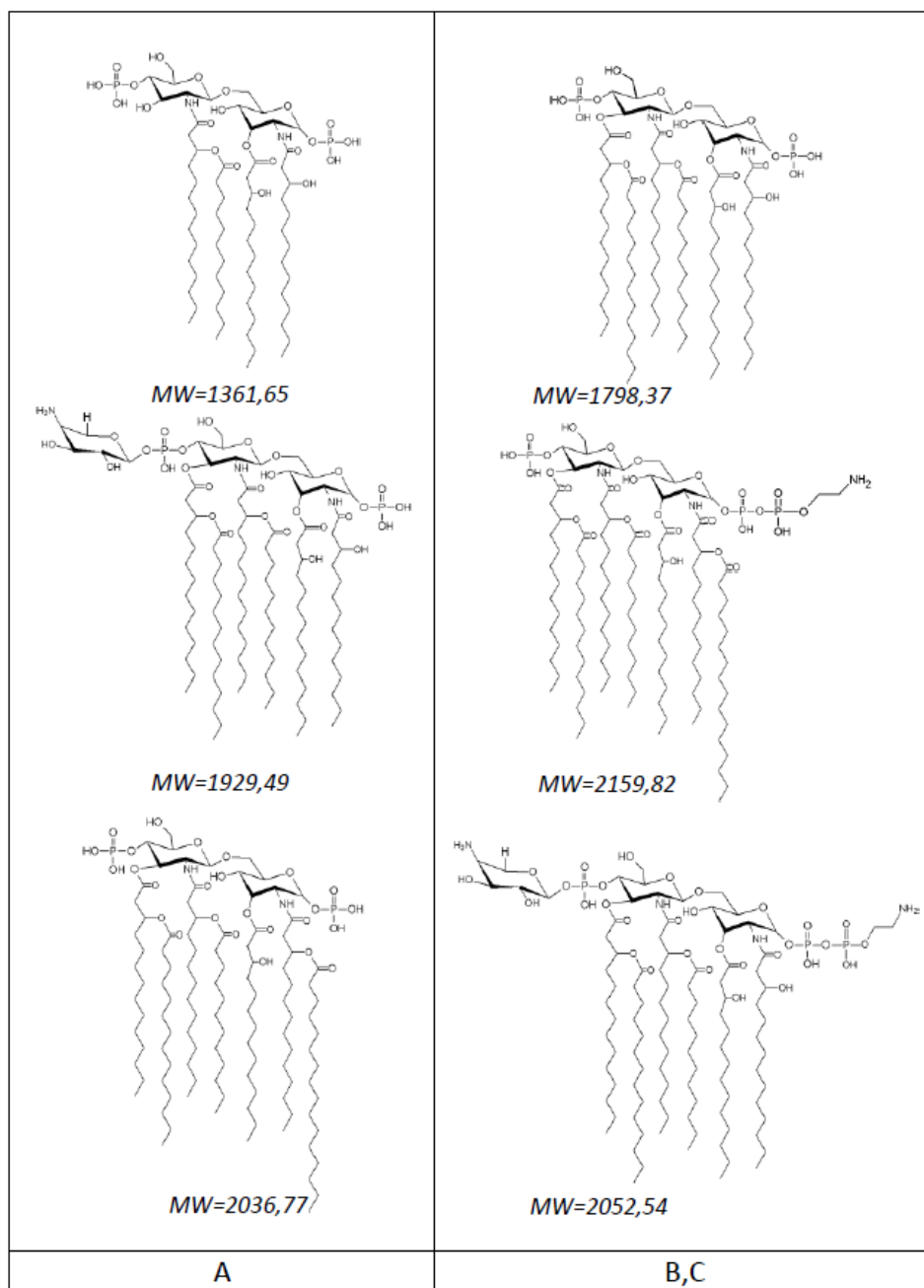
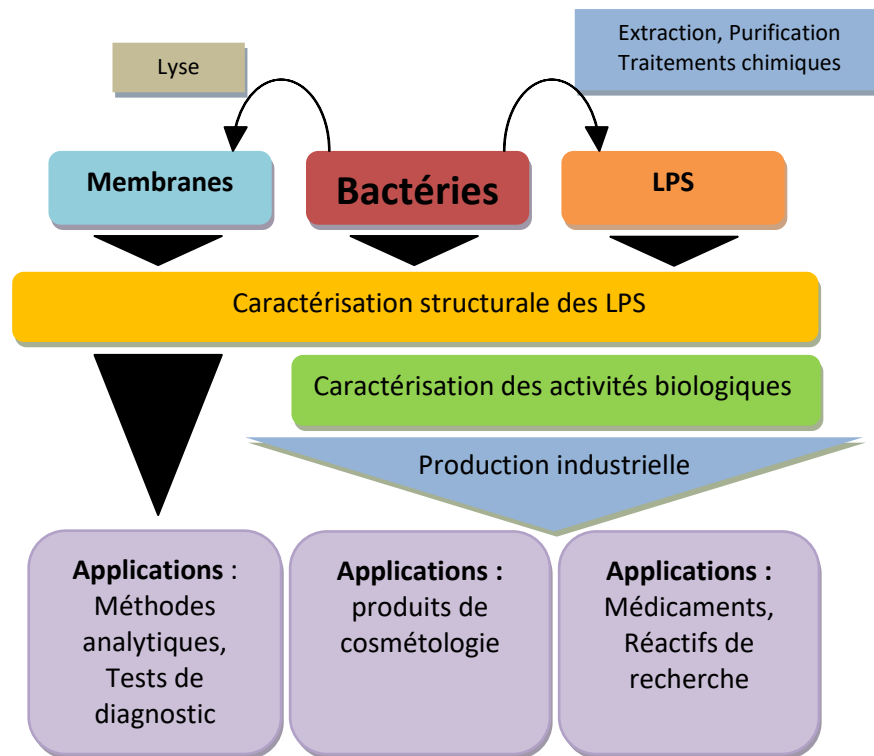


Fig. 7: Structure of the predominant lipid A molecular species present in each sample (A) SmRe595-1, (B) SmRe595-2 (C) SmRe595-3.

## IV- Résultats



**Figure 28 : Des bactéries aux applications utilisant des LPS biologiquement actifs.**

Les résultats suivants sont associés à toutes les étapes du processus de production de LPS pour des applications chez l'Homme : de leur extraction à leurs analyses structurales et biologiques.

# ***Chapitre I : Développement de micro-méthodes d'analyse structurale à partir de lysats bactériens***

## ***1) Introduction et objectifs***

Chaque bactérie possède une gamme de structures caractéristiques des LPS synthétisés. Cependant, pour une même bactérie, des variations structurales peuvent apparaître en fonction de différents stimuli extérieurs. Il est donc indispensable de disposer de méthodes d'études rapides de ces structures. En effet, il ne faut pas oublier qu'elles déterminent et modulent la reconnaissance des LPS par le récepteur MD-2 : TLR4 et donc les activités biologiques des LPS.

Les structures des LPS sont couramment étudiées par MALDI-MS. Cependant, les études structurales n'ont pas toujours été faciles sur des LPS natifs car ils s'agrègent dans les solvants polaires ou non à cause de leur nature amphiphile. Auparavant, pour être analysés, ils requéraient des modifications : clivage entre le PS et le lipide, déphosphorylation, ou dé-O-acylation. Puis des techniques ont été développées pour éviter ces traitements chimiques avant l'analyse par MS MALDI-TOF. Par exemple, une méthode d'analyse des LPS après leur migration sur chromatographie sur couche mince (CCM) a été développée dans l'équipe. Ce travail a montré l'importance d'ajouter de l'acide citrique dans la matrice pour participer à la désagrégation des LPS (Therisod et al. 2001). Une autre méthode, s'attachant au dépôt de la matrice THAP en couche mince avec de la nitrocellulose, a été développée (John et al. 2009). Enfin, l'utilisation de la MS MALDI-TOF/TOF et du mode reflectron ont montré leur efficacité dans l'analyse des LPS courts (Sturiale et al. 2011)

Cependant, ces méthodes demandent d'avoir préalablement extrait et purifié les LPS. Dans le but d'analyser rapidement et sans extraction les structures des LPS ou des lipides A d'autres méthodes ont été développées. Une méthode d'extraction et d'analyse appliquée aux lipides A directement sur les bactéries a été mise au point dans l'équipe. Les bactéries sont hydrolysées à chaud puis les lipides A sont extraits avec le solvant optimal. En un jour le spectre est obtenu par MS (El Hamidi et al.

2005). Une méthode plus rapide, sans hydrolyse des bactéries, a été publiée récemment pour l'analyse de la structure des lipides A directement sur les bactéries récoltées des culture et remises en suspension dans l'eau (Larrouy-Maumus et al. 2016). En testant cette technique, nous n'avons pas réussi à reproduire les résultats présentés à obtenir des spectres de lipides A analysables à partir de deux souches de bactéries lyophilisées (*B. holmesii* aux LPS courts et *E. coli* O157:H7 aux LPS longs). De plus, ces deux méthodes se concentrent seulement sur l'analyse des structures des lipides A.

Pour compléter ces méthodes et obtenir de précieux renseignements sur la région PS, il faut toujours extraire les LPS des bactéries, les cliver et les analyser en leurs régions PS et lipides A. Cette démarche prend plusieurs jours. Une avancée dans cette analyse a été publiée en 2011 et consiste en l'hydrolyse douce des LPS. Elle permet un gain de temps, elle est réalisable sur des petites quantités de LPS et elle dispose d'une meilleure sensibilité par rapport aux hydrolyses classiques comme c'est le cas avec l'acide acétique par exemple (Chafchaoui-Moussaoui et al. 2011).

L'analyse du PS est aussi possible en réalisant une hydrolyse acide directement sur la culture bactérienne dans le fermenteur. Cette méthode a été mise au point par le Dr Micoli dans le but de produire des antigènes-O de Salmonelles pour des formulations vaccinales mais elle n'est applicable qu'à des LPS possédant des chaînes de sucres de poids moléculaire élevé. Les antigènes-O ainsi hydrolysés sont ensuite purifiés par des étapes consécutives de filtrations tangentielles, de chromatographie échangeuse de cations, et de précipitation (Micoli et al. 2013). Cette méthode est longue et ne permet pas non plus l'analyse de la structure du lipide A ni des PS de LPS courts.

Obtenir une caractérisation rapide des molécules natives non-modifiées est essentielle pour établir des relations de structures à activités. De plus, les LPS étant uniques pour chaque bactérie, leur détection *in situ* permettrait l'amélioration des techniques d'identification bactérienne.

Les LPS étant ancrés dans les membranes bactériennes et constituant 35 à 40% de la membrane externe, le reste étant généralement constitué de 30 à 40% de protéines et 25% de lipides (Zariri & van der Ley 2015), il nous a semblé intéressant de développer des méthodes d'analyses en ciblant

directement les membranes à petite échelle. Effectivement, les membranes bactériennes représentent 20% du poids sec des bactéries, ainsi nous évitons les interférences dues aux contaminants cytoplasmiques qui perturbent souvent avec les méthodes d'analyses structurales habituelles (MS par exemple) et compliquent la purification. De plus, nous conservons les LPS dans un environnement au plus proche de la réalité, c'est-à-dire insérés dans la membrane bactérienne et reflétant ainsi leur composition telle qu'elle est *in vivo*. De nombreuses recherches sont actuellement en cours via l'utilisation de blebs bactériens (vésicules membranaires) obtenus par culture sous conditions de stress.

Pour obtenir les lysats membranaires, il faut préalablement lyser les bactéries. Plusieurs méthodes existent (Tableau V).

Dans ce travail, nous nous sommes affranchis des techniques comportant des solvants et des enzymes afin d'éviter la réalisation de longues étapes d'élimination de ces derniers. La méthode sélectionnée pour la production des membranes sera décrite dans la partie suivante.

**Tableau V: Différentes méthodes de lyse cellulaire existantes.**

Techniques	Exemples
<b>Mécanique</b>	Homogénéisateur haute pression (Press de French)
	Billes de verre
	Homogénéisateur (Potter, Dounce)
<b>Physique</b>	Sonication
	Choc osmotique
	Congélation/Décongélation
<b>Chimique</b>	Solvants (alcools, éther, chloroforme), chélateur (EDTA)
	Détergents (Triton, NP-40)
<b>Enzymatique</b>	Lysozymes, DNAses, RNAses

C'est donc en profitant de l'ancrage des LPS dans les membranes, qui évite la formation d'agrégats, que nous avons développé deux micro-méthodes d'analyses structurales :

1. Une première méthode permettant l'étude de la structure des molécules entières de LPS directement et rapidement sur les membranes. Le développement de cette méthode fait partie du projet Andromède, débuté en 2010 et initié par les Physiciens de l'Institut de Physique

Nucléaire d'Orsay. Il a permis de réaliser des expériences posant les bases des analyses de ce chapitre. Ce projet vise à développer des outils de micro-caractérisation et de micro-détection de composés bactériens membranaires. L'obtention rapide de spectres de LPS a permis la préparation du manuscrit correspondant à l'article n°2 joint ci-après.

2. Une méthode d'analyse des structures des régions PS et lipides A après l'hydrolyse des membranes. C'est en appliquant l'hydrolyse TEA-CA mise au point dans l'équipe (Chafchaoui-Moussaoui et al. 2011) directement sur les membranes, et en extrayant les PS et lipides A clivés, que nous avons réussi à obtenir des spectres de masse de ces deux entités. Ces travaux sont exposés dans l'article n°3 en cours de rédaction et joint ci-après.

Dans ce chapitre, nous avons donc finalisé une micro-méthode d'analyse structurale des LPS et développé une micro-méthode d'analyse structurale des régions PS et lipide A. Elles peuvent être employées pour comparer rapidement la structure des LPS de différents lots de bactéries. Elles pourront aussi être développées pour identifier rapidement des pathogènes dans des tests de détection.

Dans les deux cas, avec ces méthodes nous pouvons vérifier les structures des LPS, des PS et des lipides A car elles sont déjà connues et publiées dans la littérature, mais elles peuvent varier, d'où la nécessité de les analyser. Pour les LPS, dont seule la structure des lipides A est connue, la méthode d'hydrolyse des membranes nous donne les premières informations sur les masses des PS. Plusieurs modèles ont été utilisés : *B. pertussis*, *B. holmesii*, *E. coli* J5 et *E. coli* O157:H7.

## ***2) Analyse directe des LPS par MS MALDI-TOF à partir de lysats membranaires de bactéries***

### ***a) Sélection d'une méthode de lyse bactérienne***

Dans le cadre du projet Andromède, des expériences antérieures avaient comparé l'efficacité de la lyse par choc osmotique couplée à des étapes de sonication, et de la lyse utilisant la presse de French. A l'issue de cette comparaison, la lyse par choc osmotique (ou lyse à l'eau) renforcée par des étapes de sonication avait été sélectionnée.

Après la lyse par choc osmotique, différents tests de récupération des lysats bactériens par centrifugations différentielles ont été exécutés. Une première centrifugation lente, appelée « centrifugation douce » est mise en place pour séparer les bactéries non-lysées gardées dans le culot, des membranes accompagnées de contaminants dans le surnageant. Une seconde centrifugation est nécessaire pour obtenir un matériel bactérien suffisamment propre. Le but est de pouvoir analyser directement ce matériel dépourvu de contaminants, sans avoir à extraire et purifier les LPS. Le culot de l'ultracentrifugation contient donc ce que nous appellerons les « membranes » détenant les LPS, tandis que le surnageant d'ultracentrifugation ne contient pas de LPS que nous souhaitons analyser et permet donc l'élimination de contaminants. Plusieurs outils ont permis de suivre les membranes et les LPS au cours de ces étapes de récupération, ils seront décrits dans la partie b).

Cependant, nous avons souhaité réaliser d'autres tests à micro-échelle avec d'autres techniques disponibles pour comparaison. Leurs avantages et inconvénients sont synthétisés dans le Tableau VI.

C'est finalement la technique du choc osmotique qui a été maintenue. Les avantages sont qu'elle est réalisable en moins d'une journée, qu'elle est facile à mettre en place, et que la récupération des membranes est plus aisée. Néanmoins, elle est limitée par la quantité d'eau à manipuler et à centrifuger. C'est une méthode de lyse appropriée pour le développement de micro-méthodes car

elle permet l'obtention de plusieurs milligrammes de membranes sur lesquelles différents paramètres peuvent être testés et affinés.

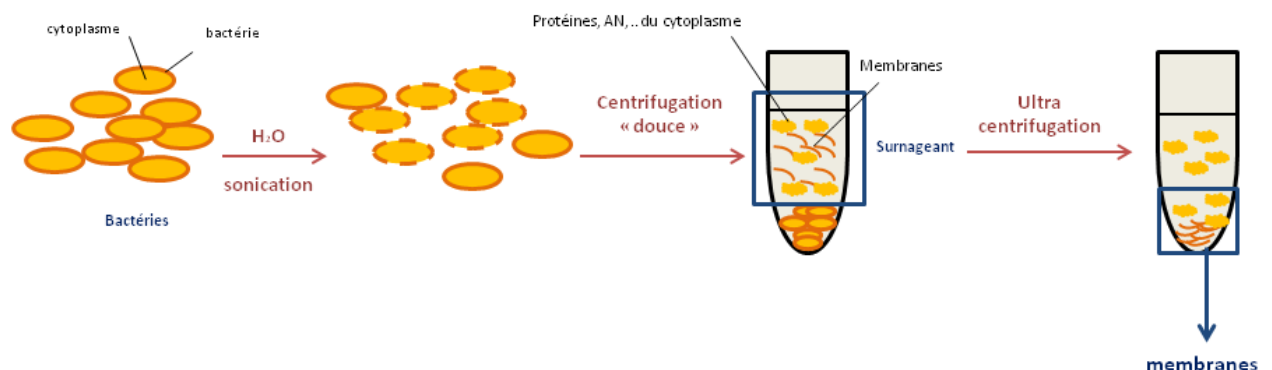
**Tableau VI: Avantages et inconvénients des différentes techniques de lyse testées.**

« Bactéries non-lysées » fait référence au poids du culot obtenu après la centrifugation douce. [Bactéries] signifie concentration bactérienne.

Techniques	Exemples	Avantages	Inconvénients
<b>Mécanique</b>	Homogénéisateur haute pression	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rapide (10 minutes)</li> <li>[Bactéries] élevée: &gt;100 mg/ml</li> <li>Pour la micro-échelle (7 ml)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Petit volume / cycle (7 ml) mais répétable</li> <li>Récupération du lysat (mousse, pertes 25%)</li> <li>Bactéries « non lysées » = 30%</li> </ul>
	Billes de verre	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rapide (10 minutes)</li> <li>Pour la micro-échelle analytique (8 ml)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Petit volume (8 ml)</li> <li>Récupération du lysat (billes, mousse, pertes 50%)</li> </ul>
	Choc osmotique	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cycle de 2 heures</li> <li>Facile à mettre en place au laboratoire (~1 g de Bactéries)</li> <li>Volumes manipulables de l'ordre de 2 litres</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>[Bactéries] faible : 2-10 mg/ml pour être efficace</li> <li>Bactéries « non lysées » =25-30%</li> <li>Répétition des cycles</li> </ul>
	Congélation / Décongélation	<ul style="list-style-type: none"> <li>Facile à mettre en place au laboratoire</li> <li>Efficace</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Long (temps de congélation en fonction du volume)</li> <li>Nombreux cycles</li> </ul>

## b) Résultats du suivi de la lyse

Des tests de lyse par choc osmotique ont d'abord été réalisés à des échelles de l'ordre du gramme avec des bactéries lyophilisées d'*E. coli* J5. Par la suite, cette méthode a été appliquée à d'autres bactéries pour démontrer son applicabilité à d'autres modèles. Ci-dessous, un rappel du procédé d'obtention des membranes décrit dans la partie « matériels et méthodes ».



**Figure 29 : Obtention des membranes bactériennes contenant les LPS par choc osmotique et sonication.**

Différents outils ont permis de suivre ces étapes de lyse :

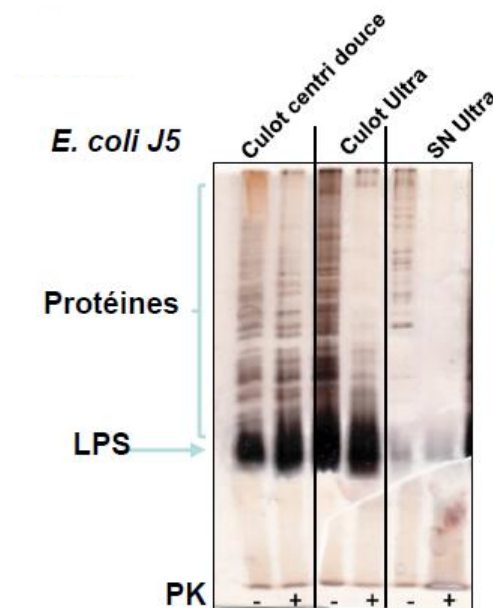


Par coloration de Gram, nous avons observé : autant de bactéries entières dans les « **bactéries** » que dans le « **culot de la centrifugation douce** » ; très peu de bactéries entières dans le « **surageant de la centrifugation douce** » et le « **culot de l'ultracentrifugation** » ; et aucune bactérie entière dans le « **surageant de l'ultracentrifugation** » (Figure 29).

Par gel SDS-PAGE, nous avons observé la présence des LPS dans différentes fractions (Figure 30). Des LPS sont présents dans le « **culot de la centrifugation douce** », qui correspond à des bactéries non-lysées très contaminées en protéines.

Des LPS sont davantage présents dans le « **culot de l'ultracentrifugation** » et ils sont absents du « **surageant de l'ultracentrifugation** ».

Le « **surageant de l'ultracentrifugation** » est composé de quelques protéines et pas ou très peu de LPS.



**Figure 30 : Suivi des LPS lors des centrifugations post-lyse par gel SDS-PAGE.**

Exemple de la lyse d'*E. coli* J5. Dépôt de 4 µg d'échantillon sans (-) et avec (+) traitement à la protéinase K (PK).

Ces résultats corroborent ceux de la coloration de Gram. Ces LPS du « **culot de l'ultracentrifugation** » peuvent être inclus dans des membranes, ou alors être présents sous d'autres formes (LPS libres, vésicules). Nous remarquons que ces LPS restent contaminés en protéines, elles pourraient provenir des membranes.

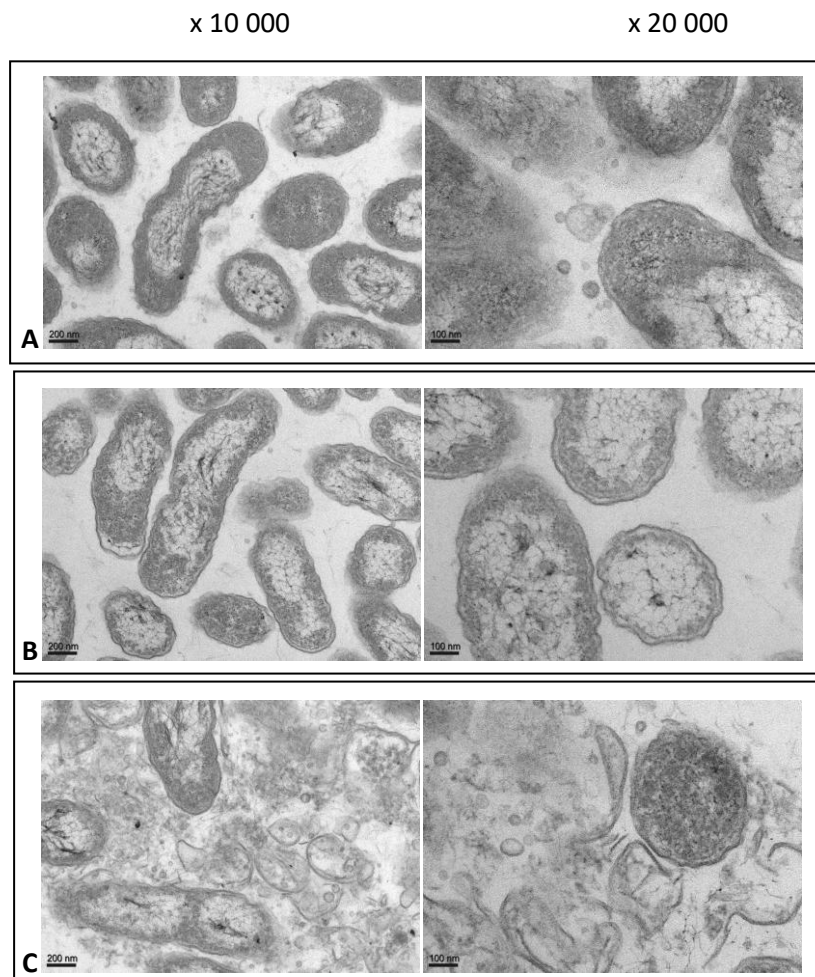
Finalement, c'est par microscopie électronique, dans le cadre de l'ANR LPS-MD-SF, que nous avons visualisé le contenu et l'aspect des différentes fractions. Cette analyse a été effectuée sur les bactéries *Bordetella pertussis* 1414 de Nicole Guiso (Institut Pasteur, Paris). Nous avons comparé les **bactéries de départ** (avant lyse), le « **culot de la centrifugation douce** » (bactéries non-lysées) et le « **culot de l'ultracentrifugation** » (Figure 31).

Dans l'échantillon contenant les **bactéries avant lyse** (Figure 31A), nous observons des bactéries intactes et quelques vésicules entourées d'une bicouche lipidique.

Dans le « **culot de la centrifugation douce** » (Figure 31B), les bactéries conservent majoritairement leur forme de bâtonnet et leur taille, mais nous observons un « décollement » du cytoplasme à l'intérieur de la bactérie. Ceci est un signe d'altération physique des bactéries due au choc osmotique. Elles sont probablement proches de la lyse. Cependant dans cette fraction, les bactéries conservent le colorant de Gram, leur intégrité membranaire n'est donc pas affectée. De plus, aucune vésicule n'est visible dans cette fraction.

Pour ce qui est du « **culot de l'ultracentrifugation** » (Figure 31C) nous retrouvons majoritairement des débris membranaires, mais aussi des fantômes de bactéries et quelques bactéries encore entières. Les vésicules se retrouvent dans cette fraction et elles sont plus nombreuses que pour les bactéries non-lysées. Concrètement, la fraction « **surageant de l'ultracentrifugation** » est majoritairement composée de membranes et de vésicules, bien que quelques bactéries entières y soient présentes. Nous appellerons donc « membranes » cette fraction.

Le « **surageant de la centrifugation douce** » contenant donc peu de bactéries, la pesée du « **culot de la centrifugation** » douce apporte une estimation relativement correcte de la quantité de bactéries non-lysées et nous permet de calculer un rendement de lyse



**Figure 31 : Observation en MET de différentes fractions issues de la lyse par choc osmotique des bactéries *B. pertussis*.**

A) Bactéries *B. pertussis* avant lyse ; B) « Culot de la centrifugation douce » ou « bactéries non lysées » ; C) « Culot de l'ultracentrifugation » ou « membranes ».

Enfin, en parallèle, le suivi de la masse de chacune des fractions a permis de suivre l'isolement des membranes. En moyenne après la lyse à l'eau, nous obtenons 25% du poids sec dans le culot résiduel (bactéries non-lysées), 25-40% du poids dans le culot de l'ultracentrifugation (membranes), et 35-50% du poids dans le surnageant de l'ultracentrifugation (contaminants protéiques et nucléiques). Les membranes correspondent en théorie à 20% du poids sec des bactéries, nous isolons donc également des contaminants avec ces dernières.

Nous avons ensuite appliqué la lyse à plusieurs modèles bactériens pour produire des membranes et développer les deux micro-méthodes d'analyse qui ne nécessitent pas l'extraction de LPS. A partir de ces membranes :

- nous pouvons analyser directement la structure des LPS par MS (article n°2) ;
- nous pouvons appliquer une hydrolyse sur les membranes pour cliver et analyser séparément les structures des parties PS et lipide A (article n°3).

### **3) Article n°2: LPS Characteristics obtained by compared innovative and classical Mass-Spectrometry methods**

Alexey Novikov<sup>1</sup>, Aude Breton<sup>1,2</sup>, Michele Pautrat<sup>3</sup>, Mireille Fallavier<sup>4</sup>, Serge Della-Negra<sup>3</sup> and Martine Caroff<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> LPS-BioSciences, Bât. 409, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France

<sup>2</sup> Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France

<sup>3</sup>IPNO, IN2P3, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France

<sup>4</sup>IPNL

#### **Article en cours de rédaction**

Dans cet article, les travaux réalisés au cours de cette thèse consistent en la participation à l'analyse et à l'identification, par spectrométrie de masse directement sur les membranes bactériennes et sans extraction, des LPS et de leurs fragments (lipide A et PS). Suite à des expériences réalisées dans le cadre du projet ANDROMEDE sur *B. pertussis* et *E. coli* C600, différentes lyses bactériennes ont été effectuées sur *E. coli* J5, *B. pertussis*, *B. holmesii*, ainsi que des analyses par spectrométrie de masse MALDI-MS et par microscopie électronique à transmission.

Les spectres de la figure 4 exposés ci-après, et décrit page 10 de l'article en cours de rédaction, illustrent la faisabilité de l'analyse par MALDI-MS des molécules de LPS directement sur les lysats membranaires de *B. pertussis*, *B. holmesii* et *E. coli*. Nous retrouvons les marqueurs (masses) correspondant aux LPS (Fig 4 D) sur les spectres des fragments membranaires (Fig 4 C).

Cette méthode permet l'analyse rapide et sans extraction des structures des LPS au plus proche des structures présentes sur les bactéries entières. Cette méthode est représentative de l'hétérogénéité naturelle des LPS sur les bactéries. Lorsque l'analyse nécessite des étapes d'extraction, certaines espèces moléculaires peuvent être sélectionnées.

## Micro-methods for lipopolysaccharides structural characterization applied to different

### Gram-negative bacterial membranes

Aude Breton<sup>1,2</sup>, Alexey Novikov<sup>2</sup>, Stephanie Le Moullec<sup>1</sup>, and Martine Caroff<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>  
*Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Batiment 409, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France*

<sup>2</sup>  
*LPS-BioSciences, I2BC, Bât. 409, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France*

#### ABSTRACT

Lipopolysaccharides, the main components of Gram-negative bacterial membranes, are key actors of Innate Immunity. They are powerful immuno-modulators, and their structures, directly impacting the host-pathogen relationships necessitate to be defined in a short time, with improved sensitivity. Mass spectrometry techniques have been evolving a lot over recent years, allowing such sensitivity, but a major interest was first spent for lipid A characterization, the later part of the molecule being responsible for the great majority of the biological effects. We describe here an easy way to reach the natives molecules and both polysaccharide, and lipid A spectra, without previous complicated and time-consuming extraction steps, for use with different Mass Spectrometry technologies.

Key words: Lipopolysaccharides, endotoxins, lipid A, core, O-chains, mass spectrometry, bacterial lysate

Abbreviations: DHB, 2,5-dihydroxybenzoic acid; TEA, Triethylamine; MALDI, Matrix-assisted laser desorption/ionization ; MS, Mass Spectrometry ; PS, Polysaccharide;

## Introduction

Endotoxins are the main components of the outer leaflet of the outer membrane of Gram-negative bacteria. Each bacterial species possesses a specific structure which is characteristic and unique. LPS structures of the same species could also be modified in response to environmental variation [1,2]. Chemically, endotoxins are Lipopolysaccharides (LPS) composed of two moieties: the polysaccharidic (PS) and the lipidic ones [3]. The PS is composed of repetitive units of a few sugars, up to 8, called O-antigen, and a core oligosaccharide that comprises up to 15 residues. Some bacteria do not possess O-antigen moieties, these types of LPS are called Rough-type LPS (R-LPS). In contrast, when the O-antigen are present, they are named Smooth-type LPS (S-LPS). The PS moiety carries the antigenic properties of the molecule and can be used in vaccines as well as in bacterial detection tests. The lipidic moiety, called lipid A, is responsible for most of the immuno-modulating activities of the molecule. These activities can be beneficial, or deleterious, even leading to septic shock and death depending on the LPS concentration and on LPS structures. Structure to activity relationships have shown that the smallest structural detail can make all the difference in terms of immuno-modulating properties [4,5].

Since the sixties, the methods of analysis and structural characterization of lipopolysaccharides have evolved and became in the last decades less time-consuming and improved in terms of accessibility and sensitivity. In all cases, the analysis of lipid A structures became accessible by direct hydrolysis on bacterial cells [6]. The method very efficient and sensitive is used in many current projects, however, the polysaccharide moiety remained difficult to access.

In some peculiar cases, mainly for production, long-chain polysaccharide were liberated by direct hydrolysis of the cells, but they still necessitated time-consuming purification steps to get the final polysaccharides [7].

We had set up new conditions of hydrolysis applied to small amounts of LPS allowing direct hydrolysis and immediate mass spectrometry analysis thanks to the Triethylamine-citrate (TEA-citrate) buffer helping LPS molecules aggregation and bivalent cations capture [8]. The later was a mild hydrolysis, allowing to maintain acid-labile LPS decoration in the molecule, like lipid A phosphate groups, or Glycine residues [9]. Direct analysis gives a very informative spectrum displaying both lipid A and core corresponding signals in addition to the non-fragmented native LPS molecules. However, for a better understanding, when both types of signals are overlapping and especially for undescribed structures, lipid A and core moieties have to be separated. The method also gave access to O-chain signals.

We describe herein the application of this method to bacterial membrane fragments.



## **Material and Methods**

### **Bacteria**

Bacterial samples were grown in the laboratory (*Escherichia coli* J5), Bordetella samples grown at the Mérieux Institute (*Bordetella pertussis*), or received from collaborators (*Bordetella holmesii* from Dr Nicole Guiso at the Pasteur Institute – Paris). *Escherichia coli* O157:H7 sample was a generous gift from LPS-BioSciences Company.

### **LPS Extraction**

The standard LPS were extracted by the Isobutyric/1M Ammonium hydroxide method [10]. LPS were purified by enzymatic treatments to remove DNA, RNA and proteins as already described [11]. It was also extracted with a mixture of solvents to remove phospholipids and lipoproteins [12].

### **Production of bacterial membranes**

Lyophilized bacteria are suspended in MilliQ water at 2 mg/ml. The suspension is agitated during 2 hours by magnetic stirring at room temperature with alternative immersion in an ultrasonic bath for periods of 5 min every 30 min. The suspension is centrifuged at 2000 g during 15 minutes at 4°C. The pellet contains the non-lysed bacteria. The supernatant is selected for an ultracentrifugation at 300 000 g during 1 hours at 4°C. The supernatant containing contaminants (DNA, protein) is discarded. The pellet of this ultracentrifugation contains the bacterial membranes.

### **Hydrolysis methods**

#### **Lipid A isolation from whole cells**

Briefly, cells (10 mg) were washed twice with 400 µl of a fresh, single phase mixture of chloroform: methanol (1:2, v:v) and once with 400 µl of chloroform: methanol: water (3:2:0.25, v:v:v). The insoluble material, corresponding to washed cells, was recovered by centrifugation in the pellet, and the supernatants were discarded. The washed cells were suspended in 400 µl of isobutyric acid/ammonium hydroxide 1M (5:3, v:v), and kept for 1.5 hours at 100°C in a screw cap

test tube under magnetic stirring. The mixture was cooled in iced water, and centrifuged (2000 g for 15 min). The supernatant was diluted with water (1:3, v:v), and lyophilized. The sample was then washed twice with 400 µl of methanol, and centrifuged (2000 g for 15 min). Finally, the insoluble lipid A was solubilised and extracted once with 200 µl of a mixture of chloroform : methanol : water (3:1.5:0.25, v:v:v) [6].

#### **Lipid A and PS isolation from LPS as performed by the triethylamine-citrate (TEA-citrate) method**

A concentration of 0.01M TEA-citrate (1:1 molar ratio, pH 3.6) was used. LPS were suspended in Eppendorf® tubes in the above-mentioned reagents at concentrations of 5 µg/µl, or 10 µg/µl depending to their solubility. After agitation and homogenization using an ultrasonic bath, the tubes were incubated for 1h in a Thermomixer system under stirring at 1000 RPM and 100°C. Hydrolysed samples were dried by desiccation. Excess of salt was extracted with methanol, and lipid A was recovered with a mixture of chloroform: methanol: water (3:1.5:0.25v/v/v) at a concentration of 10 mg/ml. The tubes were homogenized by vortex and sonication. They were then centrifuged at 10 000 g for 10 min at RT. The chloroform: methanol: water phase contains the lipid A and was kept aside for a direct MALDI-MS analysis. The remaining material was suspended in water (10 mg/ml) and the polysaccharide (PS) moiety was recovered from the supernatant after centrifugation at 10 000g for 15 min at RT [8].

#### **LPS cleavage in Membranes as performed by the triethylamine citrate method**

A concentration of 0.05M TEA-citrate (1:1 molar ratio, pH 3.6) was used. Samples were suspended in Eppendorf® tubes in the above-mentioned reagents at concentrations of 25 µg/µl. After agitation and homogenization using a vortex, the tubes were incubated for 1h in a Thermomixer system under stirring at 1000 RPM and 100°C. The mixture was cooled in iced water, and centrifuged (2000 g for 15 min). The supernatant contained the liberated PS and was kept aside for a direct MALDI MS analysis. The pellet was then washed three times with methanol (50 µg/µl),

and centrifuged (2000 g for 15 min). Finally, the insoluble lipid A was solubilized and extracted once with a mixture of chloroform: methanol: water (3:1.5:0.25, v:v:v) at 100 µg/µl.

### **Thin Layer Chromatography**

TLC was performed on glass HPTLC silica gel plates (Merck). Forty micrograms of membranes or of hydrolyzed membranes were deposited on the origin of HPTLC plate chromatographed in a solvent mixture of Isobutyric acid and 1M ammonium hydroxide (1,1; v,v) [13]. Products were visualized by charring (in an oven at 150°C for 5 min) after spraying with 10% sulfuric acid in ethanol.

### **MALDI-MS analysis**

MALDI-MS was performed in the linear mode with delayed extraction using a Perseptive Voyager STR (PE Biosystem, France) time-of-flight mass spectrometer and/or on a Shimadzu Axima Performance system.

A suspension of lipid A (1 mg/ml) in chloroform: methanol: water (3:1.5:0.25, v: v: v) was desalted with a few grains of Dowex 50W-X8 (H<sup>+</sup>), one µl was deposited on the target, mixed with one µl of the matrix of Gentisic acid (2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB) suspended at 10 µg/µl in 0.1M citric acid in chloroform: methanol: water, and dried. Analyte ions were desorbed from the matrix with pulses from a 337nm nitrogen laser. Spectra were obtained in the negative-ion mode at 20 kV.

When LPS were directly analysed, they were suspended in water and decationized in the same way, using the same matrix of DHB at 10 µg/µl in aqueous 0,1M citric acid.

When liberated PS present in the supernatant of hydrolysed membranes were analysed, they were deposited on the target with DHB matrix at 10 µg/µl in aqueous 0,1M citric acid. When lipid A liberated from hydrolysed membranes were analysed, they were deposited on the target with DHB matrix at 10 µg/µl in 0,1M citric acid in chloroform: methanol: water (3:1.5:0.25, v: v: v).

### **Transmission Electron Microscopy**

Lyophilized bacteria and bacterial membranes were suspended in Phosphate Buffer Saline (PBS) and centrifuged. The pellets were fixed with glutaraldehyde 2.5%, PFA 1% in tampon CaCo 0,1M pH

7,4 for 1h. Then, they were post-fixed with 1% osmium for 1h. They were further dried in successive baths from ethanol 10% to absolute ethanol. They were finally included in an Epon resin and after polymerization, thin slices were cut thereof and observed with a JEOL 1400 station (Imagerie-Gif).

## Results

### 1- *B. pertussis* microscopy analysis

In order to check the bacterial lysis level obtained by the current process described in Material & Methods, we compared the suspension of bacteria before and after lysis by transmission electron microscopy. The TEM experiment was performed on *B. pertussis*, our historical model and best-studied LPS structure. As shown on Figure 1A, the *B. pertussis* bacteria are 0.8 to 1  $\mu\text{m}$  size coccobacteria and they release blebs. The water-lyzed and sonicated bacteria released the cytosol and appeared like a mixture of fragmented membranes and ghost bacteria. A few bacteria kept part of their cytoplasm, but the whole aspect representing about 75% of bacterial lysis seemed a good compromise.

### 2- Kinetics of *E. coli* LPS cleavage inside the membranes

The conditions of *E. coli* J5 LPS cleavage inside isolated membrane fragments were followed by TLC. One hour of hydrolysis in TEA-citrate were selected for liberating enough core and corresponding lipid A molecular species. As shown on Figure 2 A, when membrane fragments are deposited on the baseline, native LPS and phospholipids are eluted and migrate close to the front, LPS generate a semi-circled shape form just under spots corresponding to phospholipids co-eluted from the membrane.

In Figure 2B, after LPS hydrolysis in the membrane, some bacterial residues remain on the baseline while the LPS core moiety migrated at about one third of the solvent front, residual uncleaved LPS migrated like in A, up to the front, under the lipid A moiety appearing like a short vertical line under the phospholipids. In Figure 2C, the core-moiety alone is displayed as used when isolated for the MS analysis experiment.

### 3- MALDI mass spectrometry analysis of *B. pertussis*, *B. holmesii*, *E. coli* J5, *E. coli* O157:H7 PS and lipid A moieties of the respective hydrolyzed membrane samples

#### 3-1 *B. pertussis* hydrolyzed membrane

After extraction of the core and lipid A moieties from the hydrolyzate, the samples were compared to a native LPS standard. In the lipid A spectrum, the two major molecular species appearing at  $m/z$  1558 and 1332 were similar to the ones observed in the low-mass region of the corresponding extracted LPS. Two minor satellite peaks at minus 80 corresponded to some dephosphorylation. They are interesting in the way that they can only originate from phosphate groups in a glycosidic linkage, and according to the fact it is only partially liberated it can only be of the alpha type. Other peaks at  $m/z$  1376 and 1348 indicate some microdiversity of the fatty acid distribution like the length of the fatty acids or their hydroxylation.

The free core region is much less heterogeneous when it is compared to the core obtained by fragmentation in the mass spectrometer. This heterogeneity is due to the presence of EtN and EtN-P substituting the Kdo residue, released by  $\beta$ -elimination during the hydrolysis process.

#### 3-2 *B. holmesii* hydrolyzed membranes

The core and lipid A samples were compared to a standard sample of extracted LPS.

The main lipid A molecular species were observed at  $m/z$  1376 and 1603 corresponding respectively to penta and hexa molecular species. Peaks at minus 80 for partial dephosphorylation during hydrolysis were observed at  $m/z$  1296 and 1523. Some natural heterogeneity was observed at minus 16 corresponding to non-hydroxylated FA in acyl-oxo-acyl position. This structure has recently been described in [xxx](#). The core region is currently under investigation and corresponds to a nonasaccharide by homology to other *Bordetella* core structures (unpublished results).

### **3-3 *E. coli* J5 hydrolysed membranes**

In the lipid A region, peaks corresponding to the classical hexa-, penta-, and tetra-acylated *E. coli* molecular species. Small peaks at minus 80 corresponded to monophosphorylated molecular species.

In the core region,

**Data not shown : lipid A from whole-cell bacteria, lipid A and PS from hydrolyzed LPS**

**PS *B. holmesii* (unpublished data)**

## **Acknowledgements**

Part of this work was funded by the French Research National Agency through the Andromede EquipEx funding, and by the ANR grant LPS-MD-SF ANR-12-BSV1-0037-01. Aude Breton is a recipient of a CIFRE grant thesis.



**Figures:**

Fig.1: *B. pertussis* whole bacteria (A) and bacterial membranes (B) observed by TEM.

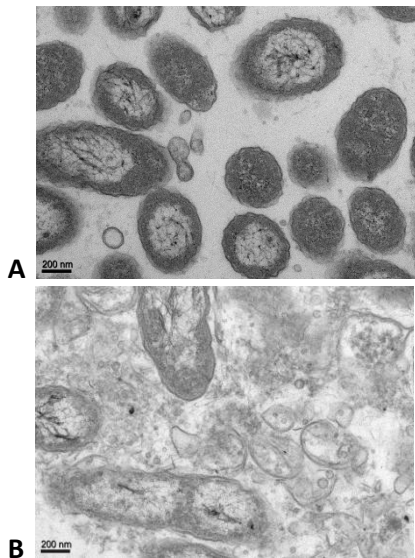


Fig.2: Monitoring of *E. coli* J5 bacterial membranes hydrolysis TEA-CA 0.05 M by TLC.  
d, deposit line; f, front of migration.

A) Kinetic of TEA-CA treatment.

1- Membranes before hydrolysis; 2-3-4- whole hydrolyzate after 1h, 2h, and, 3h of treatment.

B) PS recovery in the supernatant after bacterial lysis.

5- Membranes before lysis; 6- whole hydrolyzate after 1h; 7- supernatant after 1h of treatment.

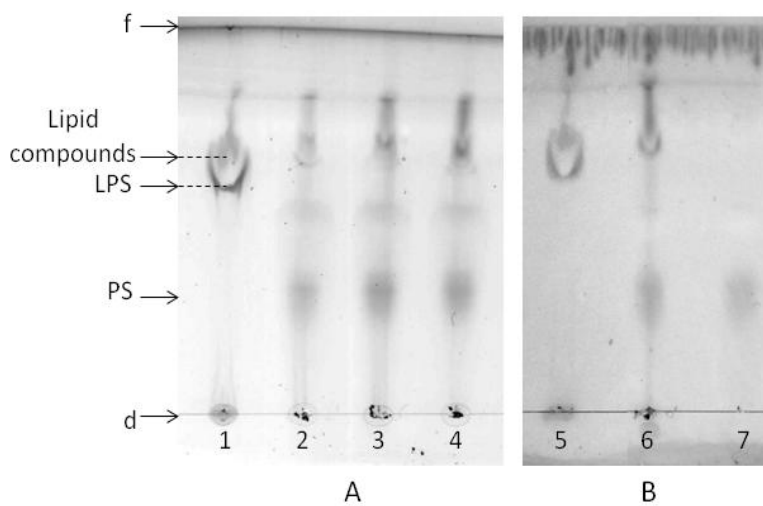


Fig.3 : Lipid A and PS structures of *B. pertussis*, *B. holmesii*, *E. coli* J5 and *E. coli* O157:H7.

Fuc2NAc4NMe : 2-acetamido-4-N-methyl-2,4,6-deoxy-galactose ; Gal : Galactose ; GalNa : AcideGalactosaminuronique ; GalNAc : N-AcétylGalactosamine ; Glc : Glucose ; GlcA : Acide glucuronique ; GlcN : Glucosamine ; GlcNAc : N-AcétylGlucosamine ; Hep : Heptose ; Kdo : acide 3-deoxy-D-manno-octulosonique ; Man2Nac3NAcA : 2-acetamido-2,3-dideoxy-mannuronic acid ; P : Phosphate ; PEA : Phosphoéthanolamine ; PPEA : Pyrophosphateethanolamine.

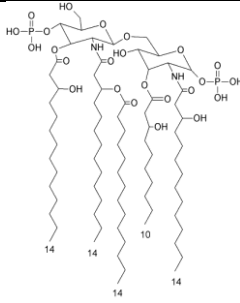
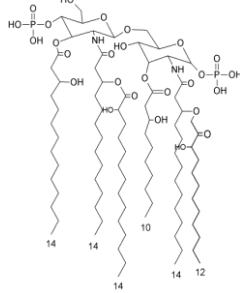
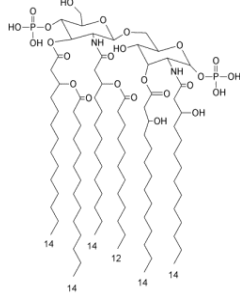
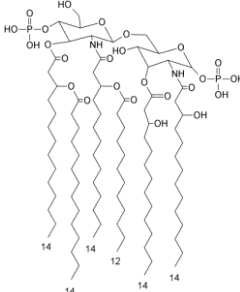
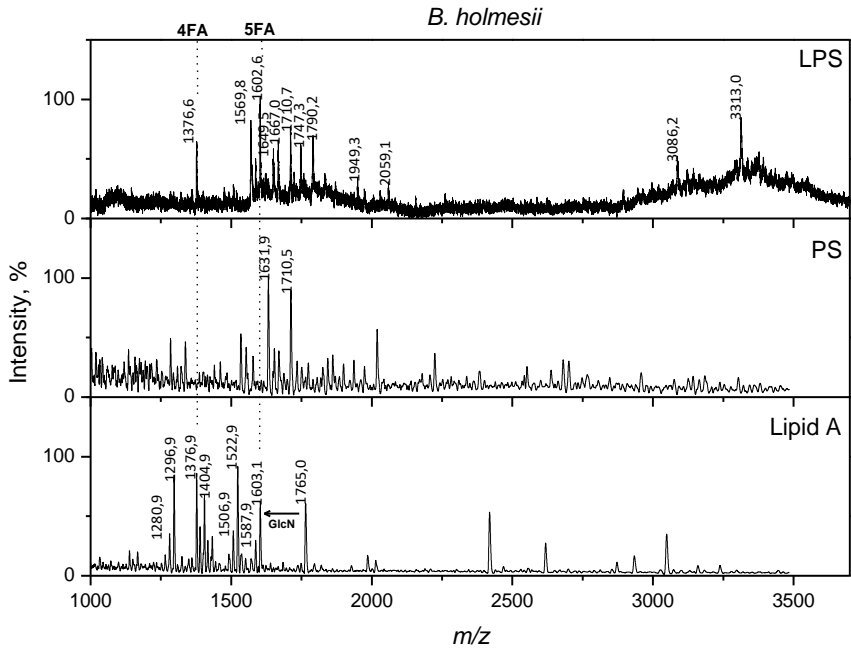
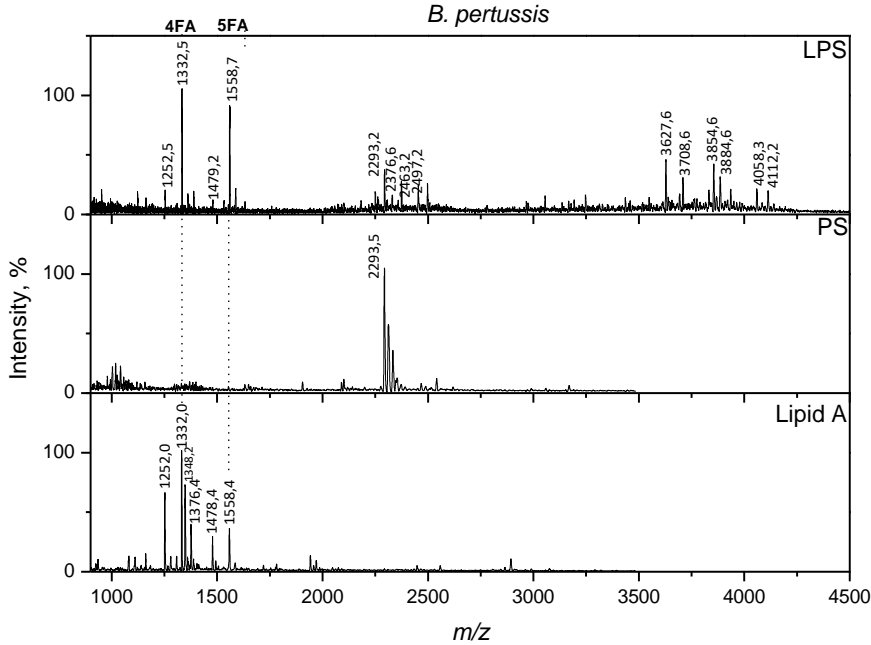
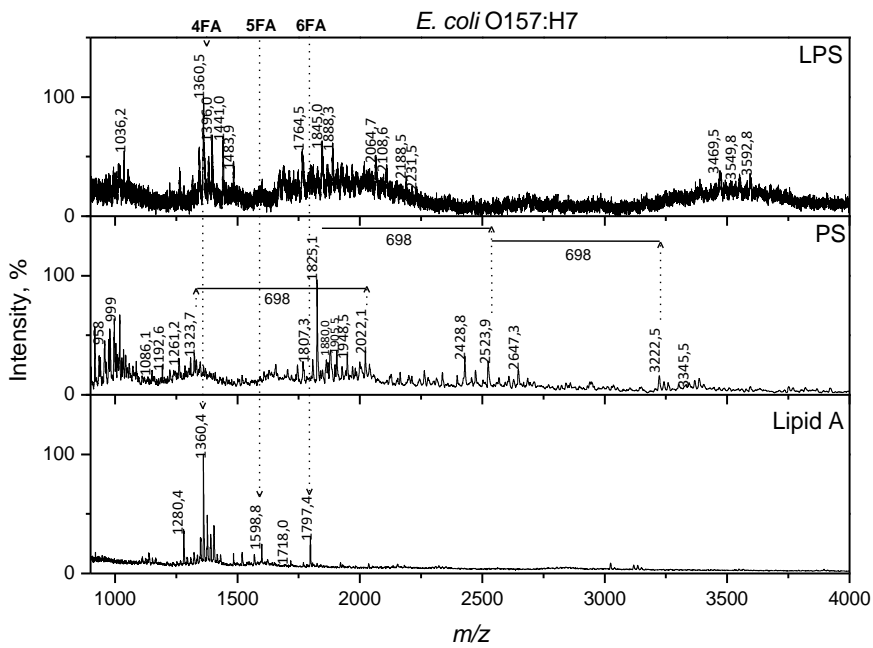
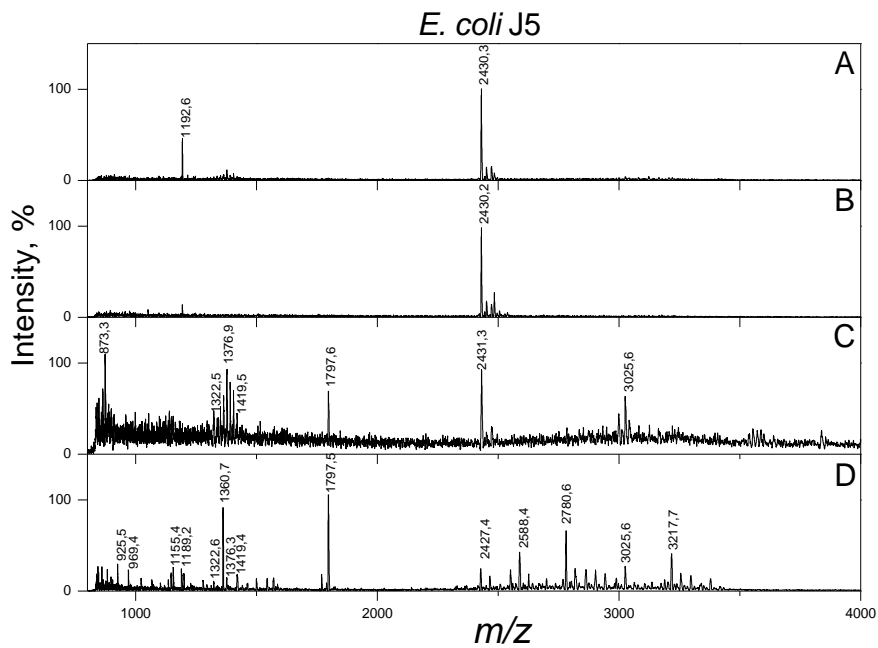
Bacteria	Lipid A	PS
<i>B. pertussis</i> 1414 [14,15]	 <p>MW=1559.95</p>	<p style="text-align: center;">GlcN - GlcA - Hep - Hep - Kdo - Lipid A</p> <p style="text-align: center;">GlcNAc - Man2NAc3NAcA - Fuc2NAc4NMe - GlcN Glc PPEA</p> <p style="text-align: center;">Hep GalNa</p> <p style="text-align: center;">MW=2294</p>
<i>B. holmesii</i>	 <p>MW=1575.95</p>	<p style="text-align: center;">Unpublished data</p> <p style="text-align: center;">MW=1631</p>
<i>E. coli</i> J5 [16]	 <p>MW=1798.36</p>	<p style="text-align: center;">GlcN - Hep - Hep - Hep - Kdo - Lipid A</p> <p style="text-align: center;">Glc P Kdo</p> <p style="text-align: center;">MW=1419</p>
<i>E. coli</i> O157:H7 [17,18]	 <p>MW=1798.36</p>	<p style="text-align: center;">P</p> <p style="text-align: center;">Glc- Glc- Gal- Glc- Hep - Hep - Kdo - Lipid A</p> <p style="text-align: center;">Glc/GlcNAc Hep PPEA Kdo</p> <p style="text-align: center;">GlcNAc PEA</p> <p style="text-align: center;">O-chain: (GalNAc-PerNac-Fuc-Glc)<sub>n</sub></p> <p style="text-align: center;">MW<sub>core</sub>=2356</p> <p style="text-align: center;">MW<sub>O-chain</sub>= 716 (-18 = 698)</p>

Fig.4: Negative-ion MALDI mass spectra of (A) *B. pertussis*, (B) *B. holmesii*, (C) *E. coli* J5, (D) *E. coli* O157:H7: extracted standard LPS, cleaved PS and lipid A moieties obtained after 0.05M TEA-citrate treated bacterial membrane (1h at 100 °C).





- 1 Raetz CR, Reynolds CM, Trent MS & Bishop RE (2007) Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem* **76**, 295–329.
- 2 Ciornei CD, Novikov A, Beloin C, Fitting C, Caroff M, Ghigo JM, Cavailon JM & Adib-Conquy M (2010) Biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* bacteria undergo lipopolysaccharide structural modifications and induce enhanced inflammatory cytokine response in human monocytes. *Innate Immun* **16**, 288–301.
- 3 Caroff M & Karibian D (2003) Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr. Res.* **338**, 2431–2447.
- 4 Park BS, Song DH, Kim HM, Choi B-S, Lee H & Lee J-O (2009) The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* **458**, 1191–5.
- 5 Maeshima N & Fernandez RC (2013) Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, 1–13.
- 6 El Hamidi A, Tirsoaga A, Novikov A, Hussein A & Caroff M (2005) Microextraction of bacterial lipid A: easy and rapid method for mass spectrometric characterization. *J Lipid Res* **46**, 1773–1778.
- 7 Micoli F, Rondini S, Gavini M, Pisoni I, Lanzilao L, Colucci AM, Giannelli C, Pippi F, Sollai L, Pinto V, Berti F, MacLennan CA, Martin LB & Saul A (2013) A scalable method for O-antigen purification applied to various *Salmonella* serovars. *Anal. Biochem.* **434**, 136–145.
- 8 Chafchaoui-Moussaoui I, Novikov A, Bhrada F, Perry MB, Filali-Maltouf A & Caroff M (2011) A new rapid and micro-scale hydrolysis, using triethylamine citrate, for lipopolysaccharide characterization by mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **25**, 2043–2048.
- 9 Chafchaoui-Moussaoui I, Novikov A, Bhrada F, Perry MB, Filali-Maltouf A & Caroff M (2011) A new rapid and micro-scale hydrolysis, using triethylamine citrate, for lipopolysaccharide characterization by mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **25**, 2043–2048.
- 10 Caroff M (2004) Novel method for isolating endotoxins. WO Patent 2004/062690 A1. .
- 11 Marr N, Hajjar AM, Shah NR, Novikov A, Yam CS, Caroff M & Fernandez RC (2010) Substitution of the bordetella pertussis lipid a phosphate groups with glucosamine is required for robust nf- $\kappa$ b activation

and release of proinflammatory cytokines in cells expressing human but not murine toll-like receptor 4-MD-2-CD14. *Infect. Immun.* **78**, 2060–2069.

12 Tirsoaga A, Novikov A, Adib-Conquy M, Werts C, Fitting C, Cavaillon JM & Caroff M (2007) Simple method for repurification of endotoxins for biological use. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1803–1808.

13 Caroff MGL & Karibian D (1990) Several uses for isobutyric acid-ammonium hydroxide solvent in endotoxin analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1957–1959.

14 Caroff M, Deprun C, Richards JC & Karibian D (1994) Structural characterization of the lipid A of *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. *J Bacteriol* **176**, 5156–5159.

15 Caroff M, Brisson J, Martin A & Karibian D (2000) Structure of the *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. *FEBS Lett* **477**, 8–14.

16 Holst O, Muller-Loennies S, Lindner B & Brade H (1993) Chemical structure of the lipid A of *Escherichia coli* J-5. *Eur. J. Biochem.* **214**, 695–701.

17 Amor K, Heinrichs DE, Fridrich E, Ziebell K, Johnson RP & Whitfield C (2000) Distribution of core oligosaccharide types in lipopolysaccharides from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **68**, 1116–1124.

18 Smith AE, Kim SH, Liu F, Jia W, Vinogradov E, Gyles CL & Bishop RE (2008) PagP activation in the outer membrane triggers R3 core oligosaccharide truncation in the cytoplasm of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Biol. Chem.* **283**, 4332–4343.



**4) Article n°3 en cours de préparation: Micromethods for lipopolysaccharides structural characterization applied to Gram-negative bacterial lysates**

Aude Breton<sup>1,2</sup>, Alexey Novikov<sup>2</sup>, Stephanie Le Moullec<sup>1</sup>, and Martine Caroff<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Batiment 409, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France

<sup>2</sup> LPS-BioSciences, Bât. 409, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France

*Le manuscrit est en cours de rédaction, ci-après les premiers éléments de l'article, puis les résultats et la discussion qui l'intégreront.*

*Cet article exposera les méthodes :*

- *d'obtention des lysats bactériens,*
- *de l'hydrolyse des résidus de lyse ainsi obtenus,*
- *puis de l'analyse par MALDI-MS des régions PS et lipides A issues de cette hydrolyse.*

*Cette méthode est à associer à l'analyse des LPS non-clivés et elle permet d'obtenir des spectres sur lesquels les masses des PS et des lipides A ne se recouvrent pas. Ainsi l'analyse des LPS est facilitée et nous obtenons aussi des informations sur les régions PS et lipides A de LPS inconnus.*



# **LPS Characteristics compared by innovative and classical Mass-Spectrometry methods**

Alexey Novikov<sup>1</sup>, Aude Breton<sup>1,2</sup>, Michelle Pautrat<sup>3</sup>, Mireille Fallavier<sup>4</sup>, Serge Della-Negra<sup>3</sup> and Martine Caroff<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*LPS-BioSciences, Bât. 409, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France*

<sup>2</sup>*Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France*

<sup>3</sup>*IPNO, IN2P3, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France*

<sup>4</sup>*IPNL, Lyon, France*

## **Abstract**

Different methods of mass spectrometry were applied to bacteria, bacterial membranes, and isolated LPS molecular species in order to improve sensitivity and access to these highly potent major antigens of Gram-negative bacteria.

The different methods were compared to PDMS, the first described method allowing direct analysis of LPS native molecules. Secondary Ion Mass Spectrometry was performed using impact of Galium ions as well as different sizes of gold aggregates. This study is opening the way to new approaches in the domain.

## Introduction

Endotoxins are made of related mixtures of lipopolysaccharides (LPS). They represent 70% of the outer membrane of Gram-negative bacteria and induce a high innate immune response. These molecules are very complex and heterogeneous structures. LPS are anchored in the outer leaflet of the bacterial membrane by their lipidic moiety called lipid A, they are substituted by an oligosaccharide core moiety of about 10 sugars, itself carrying a long polysaccharide moiety, called O-specific chain, made of oligosaccharide repetitive units. The latter is a unique structure due to the high diversity of sugars and the numerous levels of linkage and specificity. Therefore they represent the « fingerprint » of each bacterial species, especially at the level of this O-chain.

Endotoxins are so-called because they are highly toxic and not liberated by the bacteria like the proteic exotoxins are. However, during binary fission, outer-membrane vesicles formation, and bacterial lysis, LPS are released, and by passage to the blood they can elicit, at a certain level, multiple organ failure. Nevertheless LPS are also capable to induce, at low level, beneficial activities like adjuvant properties or anti-tumor activities. In order to prevent deleterious effects and exploit the beneficial properties of these molecules, their chemical and physical characteristics have to be deciphered and major discoveries were obtained thanks to Mass spectrometry analyses.

In the early stage of LPS MS analysis the LPS fragments, lipid A, core and O-chain short elements were amenable to analysis, however lipid A molecules had to be modified by phosphate removal or methylation in order to minimize their charges and interactions. Early studies by Fast Atom Bombardment- ( ), Laser-Desorption- ( ), and Plasma Desorption-Mass Spectrometry ( ) opened the way

with LPS fragments analysis. The physico-chemical behavior and LPS high aggregation capacities with the presence of natural charges and bivalent cations co-extracted from the bacterial membrane seemed to be the main problem inhibiting the analysis of native, unmodified LPS molecular species. As spectra were only obtained previously after neutralization of LPS charges, we hypothesized that intra-molecular interactions and LPS-LPS aggregation were the main problems to solve. Studies were thus performed in order to reduce the aggregation of the samples, and many different « matrices » were tested together with the estimation of the size of the aggregates in order to separate the interactions between molecules, as well as capture of the bivalent cations. The later, present in the outer membrane are naturally stabilizing the lipid A molecules by linking one to the other through their phosphate groups. LPS and bivalent cations are co-extracted and they induce molecule to molecule interactions leading to LPS precipitation in solution.

For decades these post-extraction induced aggregates prevented the LPS molecules to be desorbed from the MS targets, and to be ionized and analyzed. When we realized that aggregation was the obstacle, we tried many ways to reduce their size and succeeded using the Shands method for decationization ( ). Improving LPS solubility by using disaccharides admixed to LPS, we obtained their first spectra by PDMS. This method allowed important discoveries concerning the molecular heterogeneity and nature of LPS. It was followed by generating information for specialists in LPS biosynthesis steps resulting in the revealed structures ( . . . ).

PDMS was followed later on by MALDI-MS and somewhat abandoned due to security considerations. However, with the later we lost major information appearing at once by fragmentation in the positive and negative-ion modes. This information is again accessible in the SIMS methods as shown in this work. We

therefore exploited different methods to improve sensitivity, feasibility and analytical time.

In order to improve the sensitivity to enable natural samples analysis we tried to reach LPS molecules directly from bacterial samples and fragments thereof. LPS are representing about  $10^6$  molecules per bacterium, they are not be aggregated one to the other in the membranes, just stabilized and ready to be desorbed from this location where they are arranged in vicinal positions.

## **Material and Methods**

**Bacterial strains.** Strains were obtained from:

LPS-BioSciences collection: *Escherichia coli* O157:H7, *E. coli* J5, *E. coli* Ra K12, *Vibrio Cholerae*.

*Bordetella pertussis* was a gift from the Mérieux Institute, Lyon, France, and *B. holmesii* a kind gift from Nicole Guiso at the Pasteur Institute, Paris, France.

**Thin-layer chromatography (TLC)** was done on aluminium-backed silica-gel plates (Merck) in the solvent [24] Chloroform: Methanol: Water: Triethylamine (12:6:1:0.04). Spots were visualized by charring after spraying with 10% sulfuric acid in ethanol.

### **SDS-polyacrylamide gel analysis of LPS.**

Fifteen percent acrylamide gel was used, and 0.2  $\mu\text{g}$  of LPS was loaded onto the 4% starting gel. The LPS preparation, electrophoresis process and the Tsai and Frash Silver Nitrate coloration were performed as previously described.

### **Mass spectrometry**

**Nanometric localisation of bacteria by Gallium LMIS**

A suspension in water of *B. pertussis* lyophilized bacteria was deposited on a silicium target and submitted to a primary ion beam of Gallium delivered by Cobra FIB column with minimum Spot size ~ 3-4 nm, a few ten nm

**MALDI negative-ion mass spectrometry** analyses were performed on a PerSeptive Voyager-DE STR model time-of-flight mass spectrometer (Applied Biosystem) (IBBMC, Université de Paris-Sud XI), in linear mode with delayed extraction and with a Shimadzu Axima Performance system. The ion-accelerating voltage was set at 20 kV. Dihydroxybenzoic acid (DHB) (Sigma chemical Co., St Louis) suspended in 0.1M citric acid was used as a matrix. A few microliters of lipid A were dissolved in a mixture of chloroform: methanol: water (3:1.5:0.25, by vol.) at 1mg/ml and desalted with a few grains of ion-exchange resin (Dowex 50W-X8) ( $H^+$ ), in an Eppendorf tube. A 1  $\mu$ l aliquot of the solution (50 $\mu$ l) was deposited on the target and covered with the same amount of the matrix suspended at 10 mg/ml in the same mixture of solvents [30]. Different ratios between the samples and DHB were tested when necessary. *B. pertussis* lipid A was used as an external standard.

When whole bacterial samples were analysed, they were suspended in water at 5  $\mu$ g/ $\mu$ l and deposited on the target and covered with DHB matrix at 10  $\mu$ g/ $\mu$ l in aqueous 0,1M citric acid

### **Low Energy beams**

The secondary ion emission yields were measured in Orsay with  $Au_n^+$  clusters ( $n = 1 - 9$ ). The experimental setup using LMISource and Orthogonal Time of Flight has been described in a previous paper (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14966842> Tempez, A.; Schultz, J.A.; Della-Negra, S.; Depauw, J.; Jacquet, D.; Novikov, A.; Le Beyec, Y.; Pautrat, M.; Caroff, M.; Ugarov, M.; Bensaoula, H.; Gonin, M.; Fuhrer K.; and Woods, A. Rapid Commun. Mass-Spectrom. 2004, 18, 371-376.). The cluster beams were produced with a (Au-Si) liquid metal ion source (LMIS) build at the IPNO (S. Della Negra,

A. Brunelle, Y. Le Beyec, J.M. Curaudeau, J.P. Mouffron, B. Waast, P. Håkansson, B.U.R. Sundqvist and E.S. Parilis, Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B 74, 453 (1993).). A Wien filter is used for mass selection after acceleration of the clusters by a 10-20 kV electric potential. The  $Au_n^+$  beams are well separated up to  $n=9$ . In this study, we have measured the ion emission ions using 10-20 keV gold cluster, five different size clusters ( $Au^+$ ,  $Au_3^+$ ,  $Au_5^+$ ,  $Au_9^+$ ) were used. The spot size on the sample is about  $7 \text{ mm}^2$ . The primary beam incidence angle is  $45^\circ$  with respect to the sample surface. The secondary ions emitted from samples are collected into an orthogonal extraction time of flight mass spectrometer which allows the use of a continuous primary ion beam. The secondary ions are accelerated at 30 eV from the sample plate and focused to the orthogonal extraction region which is pulsed with a voltage of 800 V. The compact Orthogonal Time of Flight has a reflectron which permits to reach high mass separation. After reflection, the ions are post-accelerated up to 5 keV prior to detection onto MCP detectors. The mass resolution reaches 2500 around one hundred mass units.

### **High Energy Cluster beams**

The gold cluster beams  $Au_n^+(1 \leq n \leq 9)$  at energies between XX and xx0 keV/atom were delivered by the 2.5 MV Van de Graaff accelerator of the Institut de Physique Nucléaire de Lyon which was equipped with liquid metal ion sources.( 10 M. Fallavier, Y. Champelovier, M. Ferrari, R. Kirsch, J.C. Poizat, J. Remillieux, J.P.Thomas, B. Canut, M. Monchanin, S.M.M. Ramos, P. Thévenard, S. Della Negra, J.P. Mouffron and P. Nicol, Eur. Phys. J. D 9, 529 (1999).). >>( the minimum and maximum acceleration voltages are 150 kV and 2 MV)

The size of the primary ion beams is around 1mm of diameter and the primary beam incidence angle is  $45^\circ$  with respect to the sample surface.

The secondary ion emission yields were obtained from ion mass spectrometry experiments using time of flight measurement. For secondary ion detection we used two different detectors, a single-anode MCP detector and a multi-anode MCP detector. The experimental setup for time of flight measurements using the single-anode detector has been described in details in a previous paper ( M. Fallavier, R. Kirsch, S.N. Morozov, J.C. Poizat, J.P. Thomas and N. Wehbe, Phys. Rev. B 68, 140102(R) (2003).). The electrons and the negative secondary ions emitted from the target at each cluster impact were accelerated between the target biased at -10 kV and a grounded electrode facing the target. At the end of the flight tube they passed through an 85% transmission grid before hitting the entrance face of the single-anode MCP detector. We have also performed additional experiments using a 256-anode MCP detector.( S. Bouneau, P. Cohen, S. Della-Negra, D. Jacquet, Y. Le Beyec, J. Le Bris, M. Pautrat and R. Sellem, Rev. Sci. Instrum. 74, 57 (2003).) Each anode working independently, such a detector is able to detect several ions of the same mass which are simultaneously ejected from the solid under a single cluster impact, and so allows measuring the multiplicity distribution of the secondary ions the angular distribution and the initial velocity of these ions (S. Bouneau, S. Della Negra, D. Jacquet, Y. Le Beyec, M. Pautrat, M.H. Shapiro and T.A. Tombrello, Phys. Rev. B 71, 174110 (2005).). In this case the measured yield is given by the mean value of the multiplicity distribution. The detection efficiency of the multi-anode detector is lower,  $\varepsilon = 0.36$ , owing to the pixelated structure of the anode and to the presence of two acceleration grids. Taking into account the detection efficiency, the emission yield  $Y$  is given by the relation

$$Y = \frac{1}{\varepsilon} Y_m .$$

The experimental multiplicity distributions were observed to be well fitted by Poisson distributions. Therefore, for the experiments with the single-anode

detector, the emission yield  $Y$  is calculated from the measured yield, assuming a Poisson distribution for the emission statistics and the emission yield is given by the relation:

$$Y = -\frac{1}{\varepsilon} \ln(1 - Y_m), \quad (2)$$

but for small  $Y_m$  values ( $< \sim 0.5$ ).

The detection efficiency of the single-anode detector was estimated to be  $\varepsilon = 0.50$ .

### **OrsayPhysics experiment**

The experimental setup is constituted with an OrsayPhysics ionic column Cobrae and Orthogonal Time of Flight similar to them described in the reference (Tempez, A.; Schultz, J.A.; Della-Negra, S.; Depauw, J.; Jacquet, D.; Novikov, A.; Le Beyec, Y.; Pautrat, M.; Caroff, M.; Ugarov, M.; Bensaoula, H.; Gonin, M.; Fuhrer K.; and Woods, A. *Rapid Commun. Mass-Spectrom.* 2004, 18, 371-376.). The Cobra X column is equipped with a Gallium LMIS. The primary ion beam was  $\text{Ga}^+$  at 30 keV. The spot size of the focused ion beam reaches 3 nm of diameter (<http://www.orsayphysics.com/fib>). The beam scans a  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  area of the surface an electron detector permit to have an image of the surface simultaneously to the ion emission. The ion analysis with an orthogonal extraction allows the use of a continuous primary beam and the nano-focusing capabilities are not altered by the pulsing scheme that is required in classical linear TOF-SIMS instruments.

### **Preparation of bacterial samples**

Bacterial samples were obtained after osmotic shock by suspending lyophilised bacteria in water ( mg/ml) and periods of 2min. in an ultrasonic bath for favouring membrane disruption every 30 min. After 2h of such treatment, lysed



bacteria and intact ones were separated by mild centrifugation at 200g, the supernatant containing bacterial debris and cytosol was separated by ultracentrifugation for 30min. at 2000g and 4°C and the bacterial fragments were recovered in the pellet. The pellet was lyophilized, tested on SDS-PAGE and used directly for MALDI-MS.

**Transmission Electron Microscopy.** Lyophilized bacteria were suspended in PBS and centrifuged. The pellets were fixed with glutaraldehyde 2.5%, PFA 1% in tampon CaCo 0,1M pH 7,4 for 1h. Then, they were post-fixed with 1% osmium for 1h. They were dried in successive baths from ethanol 10% to absolute ethanol. They were included in resin (Epon). After polymerization, thin slices were cut and observed with a JEOL 1400 station.

## Results and Discussion

Different mass spectrometry techniques (fast atom bombardment, laser desorption, <sup>252</sup>Cf PDMS) have been used to determine molecular masses and chemical structures of major components of hydrophobic domains ("diphosphoryl lipid A") or fragments ("monophosphoryl lipid A") of endotoxic lipopolysaccharides (17-23). The material thus analyzed as obtained from endotoxin preparations by treatment with acid, followed by chromatographic purifications.

After obtaining the very first LPS native spectra by PDMS ( ) we went on in our Biochemist-Physicists collaborative projects aiming at exploring the capacities of Secondary-ion mass spectrometry in the field of biomolecular surfaces ( Rapid Comm MS, Novikov et al. 2005). A new technique combining

Matrix Implanted Laser Desorption (MILDI) accelerated massive gold cluster ions was also used to explore rat brain tissues (J.of Prot. Res, 2005).

The use of different size of gold clusters was used here to compare the yield of molecular ion peaks obtained on isolated lipid A samples (Fig.1). As shown on both *Escherichia coli*, a very common commensal, as well as pathogenic bacterium, and *Bordetella pertussis*, the agent of whooping-cough, lipid As were investigated and compared both by PDMS ( ) and MALDI-TOF mass spectrometry ( ). *E. coli* lipid A with characteristic molecular ions at  $m/z$  1797, for the hexa-acylated molecular species, and  $m/z$  1360 for the tetra-acylated one, showed regular increased yield gain when the size of gold clusters varied from 3, to 5, then 9 Au<sup>+</sup>. Some heterogeneity was observed in the *E.coli* spectra at minus 80 from the main peaks corresponding to some dephosphorylation. In the *B. pertussis* spectra, selected for a long-term specialty, the heterogeneity is due to masses observed at plus 28u, corresponding to heterogeneity in the length of the FA carbon chain. On Fig.3 A, the low-mass range displays interesting fragmentation in the *B. pertussis* PDMS spectrum with the ions corresponding to glucosamine-1 carrying part of GlcN-2 fragmentation at X=739u, Y=710u, Z=694u as indicated on the figure. This very informative fragmentation pattern completed with the one obtained in the positive ion mode, allowed an almost direct positioning of the FA on the GlcN disaccharide. This fragmentation pattern is not observed with MALDI-MS.

**Nanometric visualisation** of *B. pertussis* bacteria was performed with a primary ion beam of Gallium delivered by Cobra FIB column with minimum Spot size ~ 3-4 nm, with bacteria deposited on a silicium target. In the figure we compare the *B. pertussis* bacteria print shape obtained by ablating the surface to the same bacteria visualized by Transmission Electron Microscopy (TEM). In both

techniques bacteria in division can be visualised, as well as their characteristic coccoid shape and size of  $0.4 \times 0.8 \mu\text{m}$ .

**MALDI-mass spectrometry.** Bacteria of the *Bordetella* genus, *B. pertussis* and *B. holmesii*, as well as two species of *E. coli* mutants, a Ra complete core structure plus lipid A, and an *E. coli* J5 mutant were analyzed. For each sample the bacteria were directly tested by MALDI-MS in the negative ion-mode with the DHB matrix. In Fig 4 A, a single peak corresponding to some lipopeptide was observed at  $m/z$  2430 for the *E. coli* samples, the discarded supernatant was tested in 4-B. and bacterial fragments in 4-C. They displayed signals corresponding to both the lipid A and the core ion-peaks. The spectra are compared to isolated and purified LPS in 4-D.

No signal of interest was obtained on direct bacterial analysis, apart for a signal at  $m/z=2430$  shared by both *E. coli* samples, and a signal at  $m/z= 2416$ , vraisemblably corresponding to some membrane lipo- or glyco-peptides. The same signals appeared in the discarded supernatant of the isolated bacterial fragments.

In the *B. pertussis* LPS spectrum the major peaks at  $m/z=1332$  and  $1162$  represented respectively tetra-acyl and tri-acyl lipid A molecular species. They were obtained by fragmentation, and their corresponding LPS molecular species are signaling at  $m/z= 3707$  and  $3537$ . All the molecular species corresponding to core moieties appear in the 2000 medium masses region.

In the *B. holmesii* LPS spectrum peaks in the lipid A and core regions are clearly signaling and can be added to give signals corresponding to the LPS moieties obtained in the bacterial fragments or the purified LPS. These peaks correspond to lipids A with peaks at  $m/z= 1605$  and  $1379$  corresponding to penta- and tetra-acylated molecular species.

The two *E.coli* samples gave signals at  $m/z$  1797 and 1360 in the lipid A molecular species region corresponding to hexa- and tetra-acyl molecular species. The C600 sample corresponded to a K12 Ra-type bacterium with a complete core at  $m/z=$  2301

While the J5 mutant displayed a shorter core molecular species corresponding to 6 sugars...

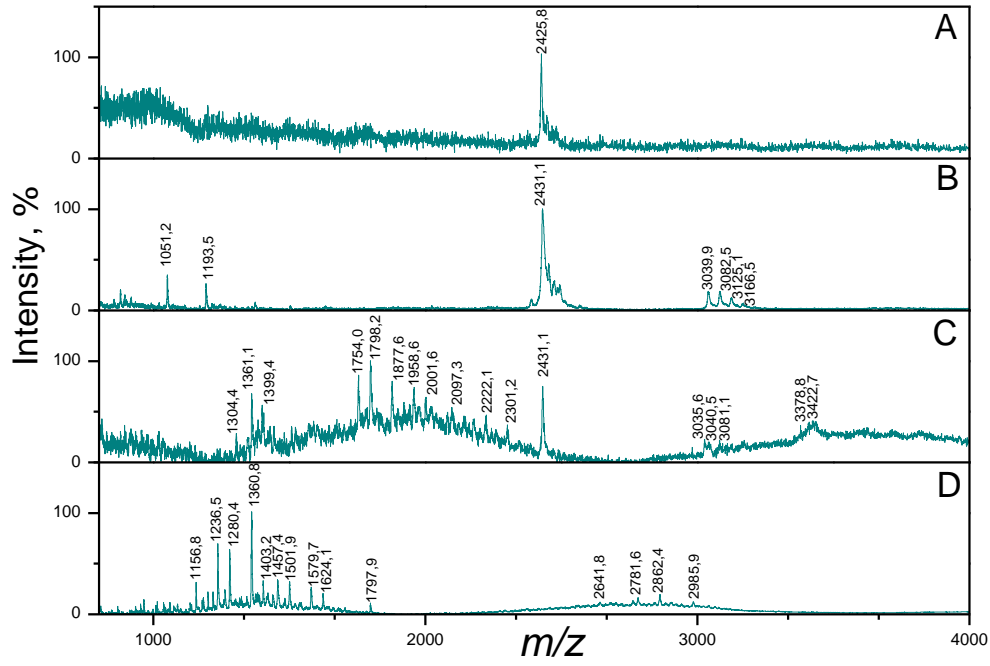
Bacterial lysis allowed the obtention of very informative spectra on all the tested samples. With no preliminary LPS extraction, one can define and compare Gram-negative bacterial markers as important as the one studied. An easy comparison of bacterial batches can be made in a single day in order to check the LPS structure and future production without involving the usual long-lasting extraction steps.

The difference between laser desorption and SIMS is mostly that laser shots are burning the sample in depth to liberate ionised molecular species. On the contrary Secondary Ion MS is peeling the sample, and in the case of gold aggregates, the size of the later moves more intact ionized sample material at each impact, as shown with the analysis of both *E. coli* and *B.pertussis* lipid A samples, even allowing in-depth layers experiments.

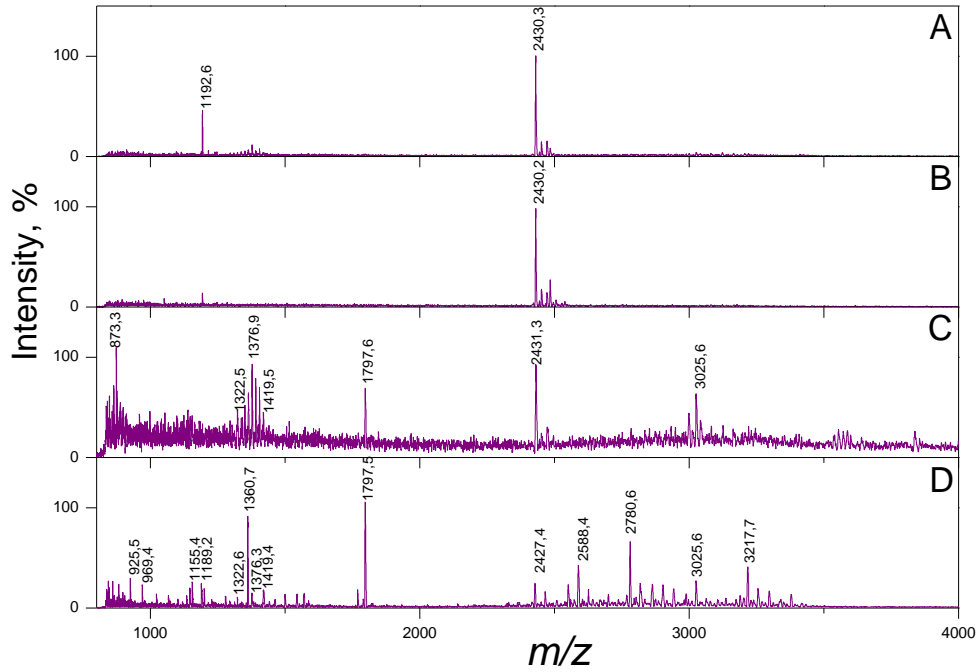
### **Acknowledgements**

Part of this work was funded by the French Research National Agency through the ANR grant LPS-MD-SF ANR-12-BSV1-0037-01, and by the Andromede EquipEx funding. Aude Breton is a recipient of a CIFRE grant thesis.

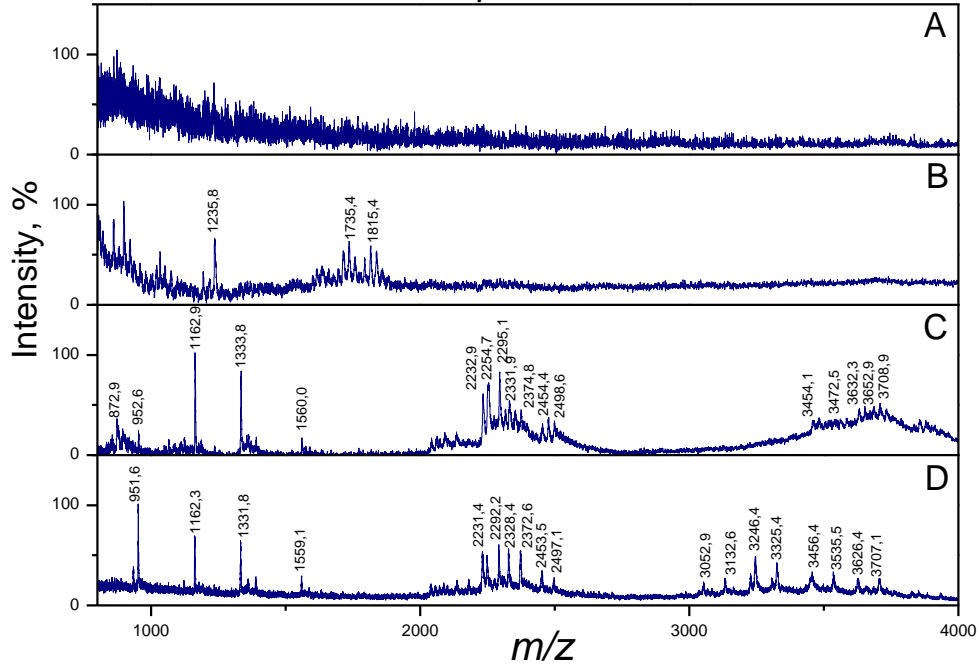
*E. coli* C600



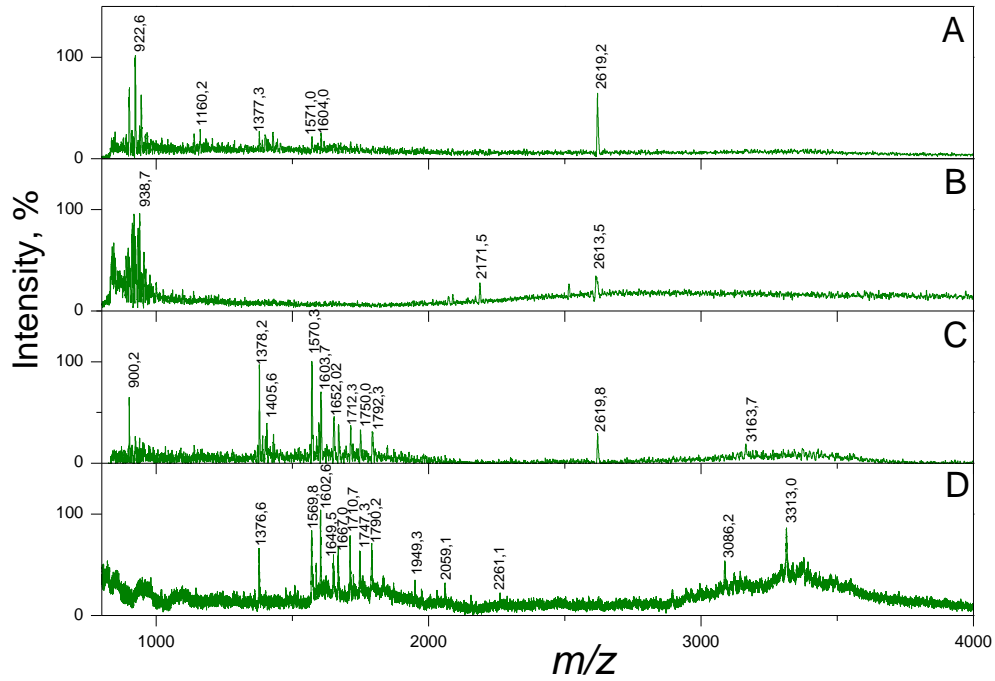
*E. coli* J5



*B. pertussis*



*B. holmesii*



17. Qureshi, N., Mascagni, P., Ribic, E., and Takayama, K. (1985) *J.*

*Biol. Chem.* **260**,5271-5278

18. Takayama, K., Qureshi, N., Hyver, K., Honovich, J., Cotter, R.

J.,Mascagni, P., and Schneider, H. (1986)*J. Biol. Chem.* **261**,

**10624-10631**

19. Qureshi, N., Takayama, K., Mascagni, P., Honovich, J., Wong,

R., and Cotter, R. J. (1988)*J. Biol. Chem.* **263**, 11971-11976 20. Qureshi, N., Honovich, J. P., Hara, H., Cotter, R. J., and Taka-

yama, K. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 5502-5504

21. Qureshi, N., Takayama, K., Heller, D., and Fenselau, C. (1983)

*J.Biol. Chem.* **258**,12947-12951

Qureshi,N.,Takayama, K., and Ribic, E. (1982) *J. Biol.Chem.* **257**, 11808-11815

23. Cotter, R. J., Honovich, J., Qureshi, N., andTakayama, K. (1987) *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **14**, 591-598

Figure 1:

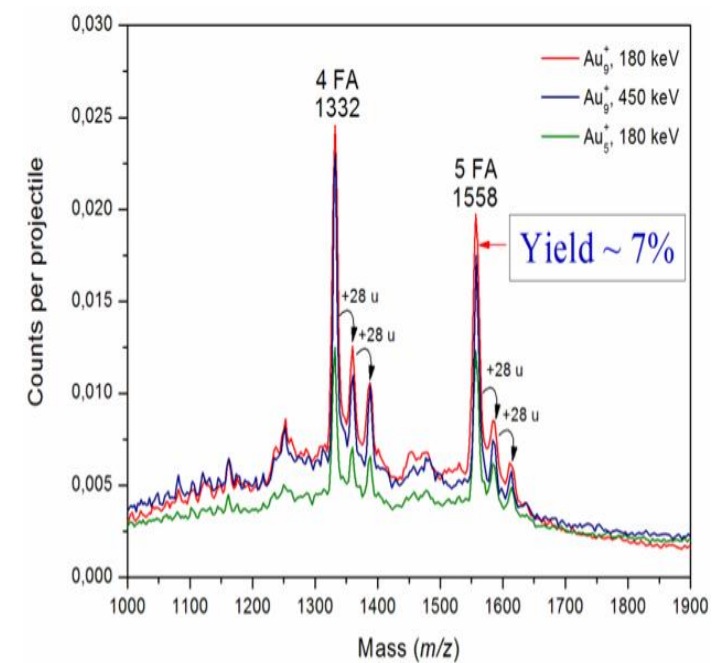
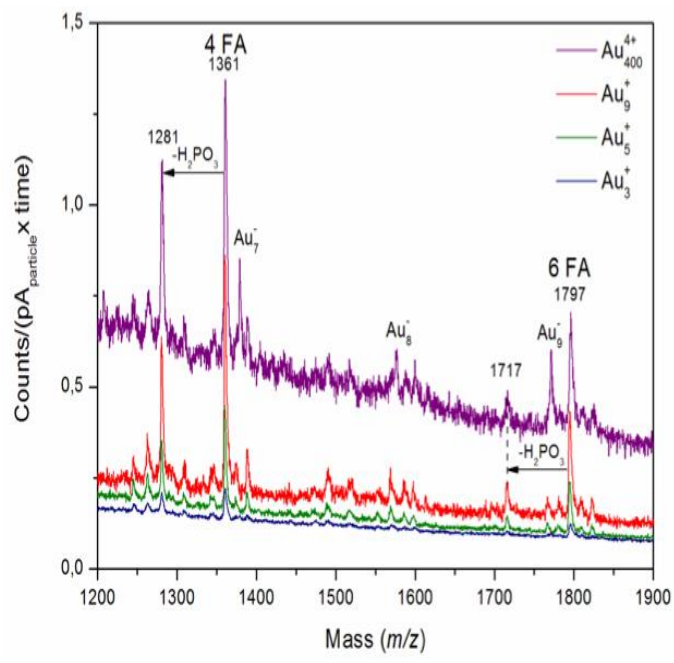




Figure 2:

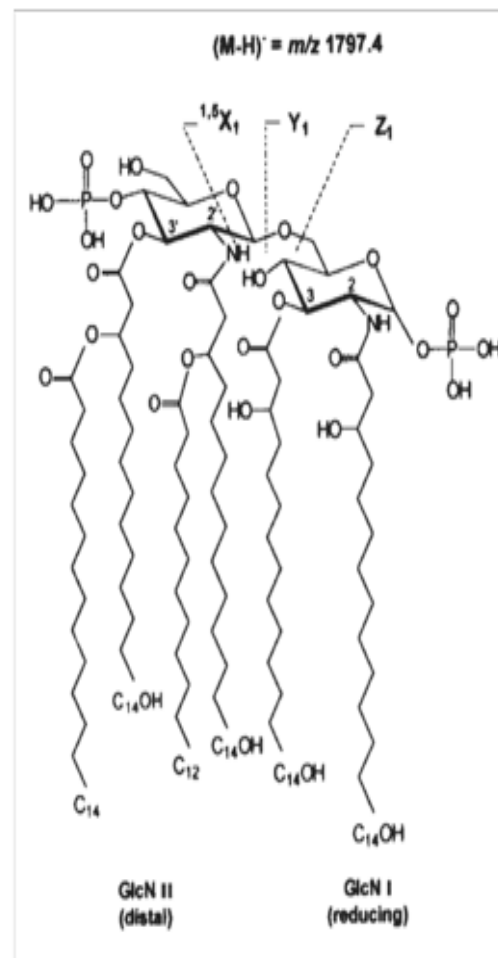
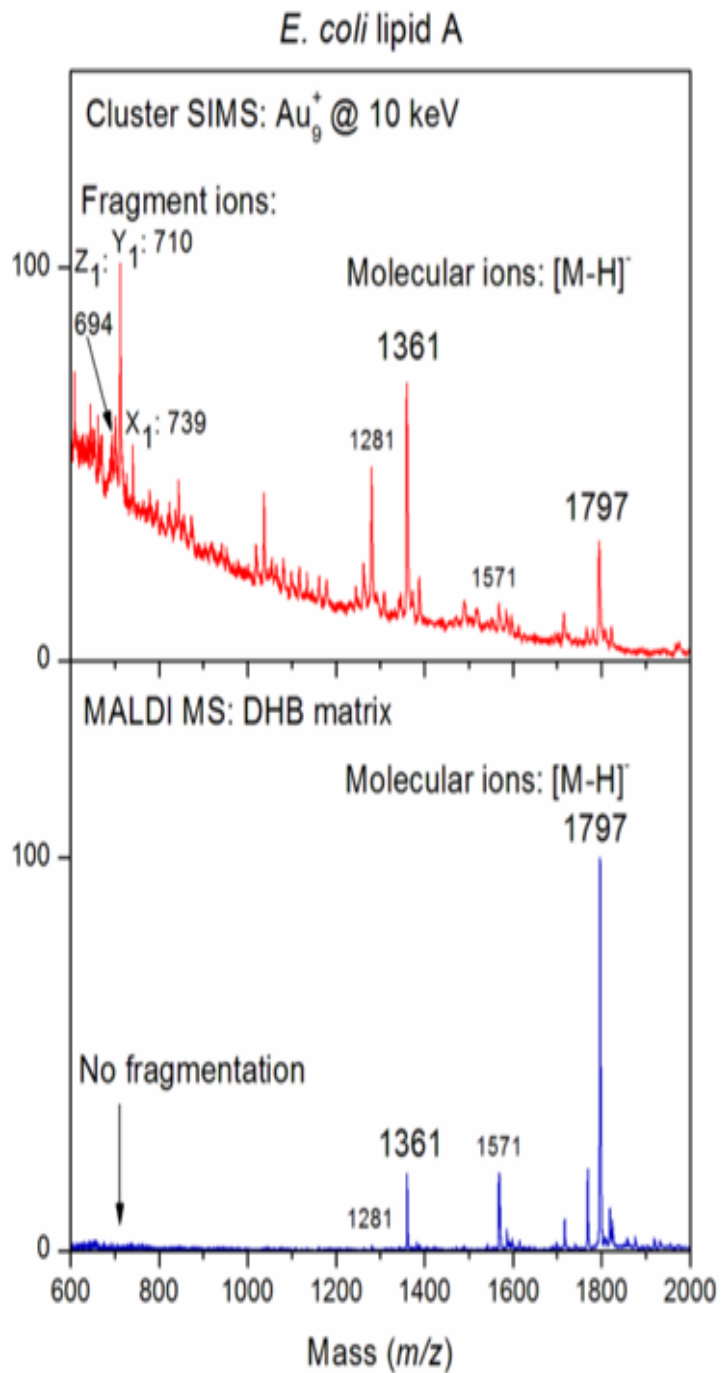


Figure 3:

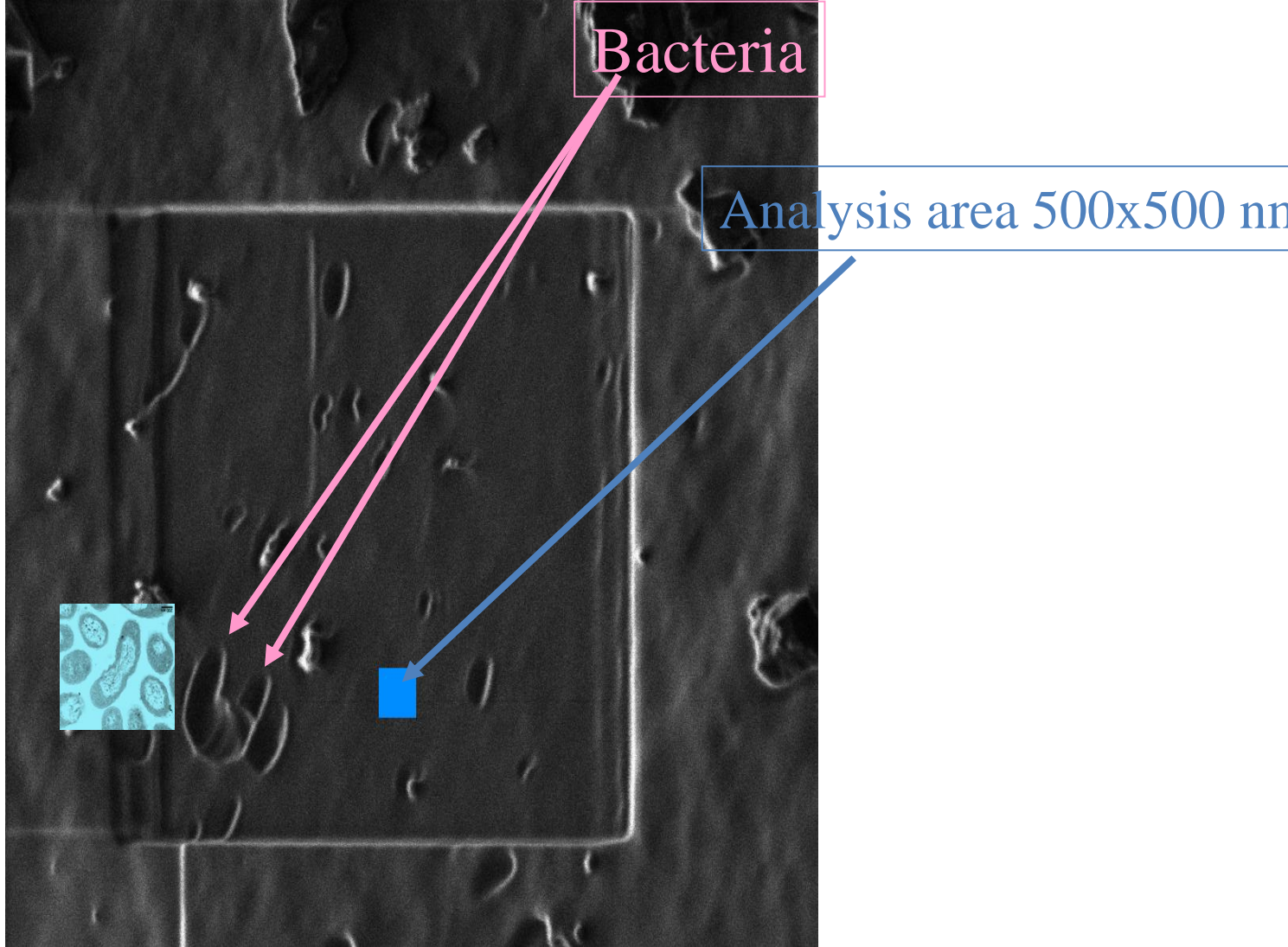
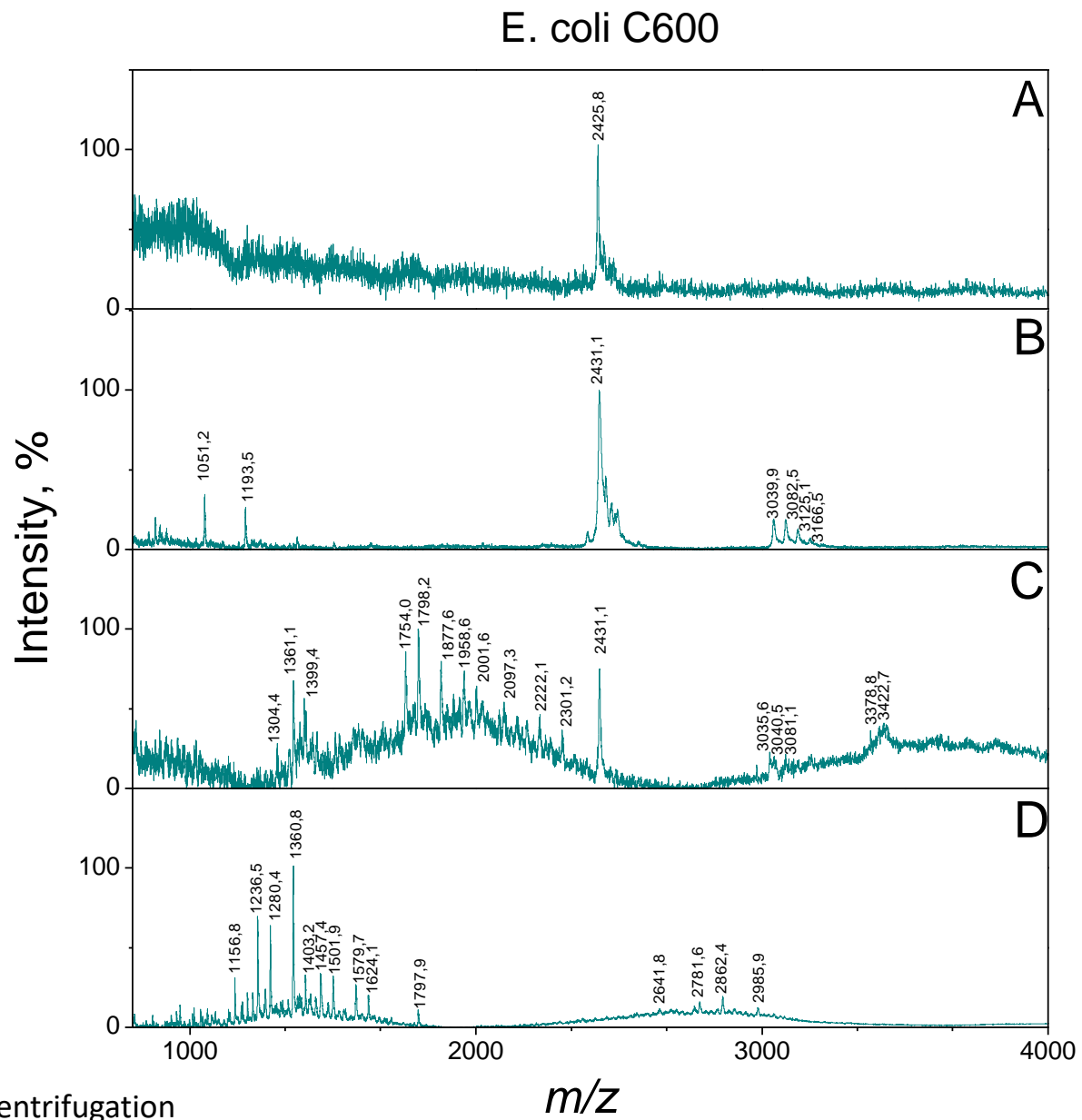
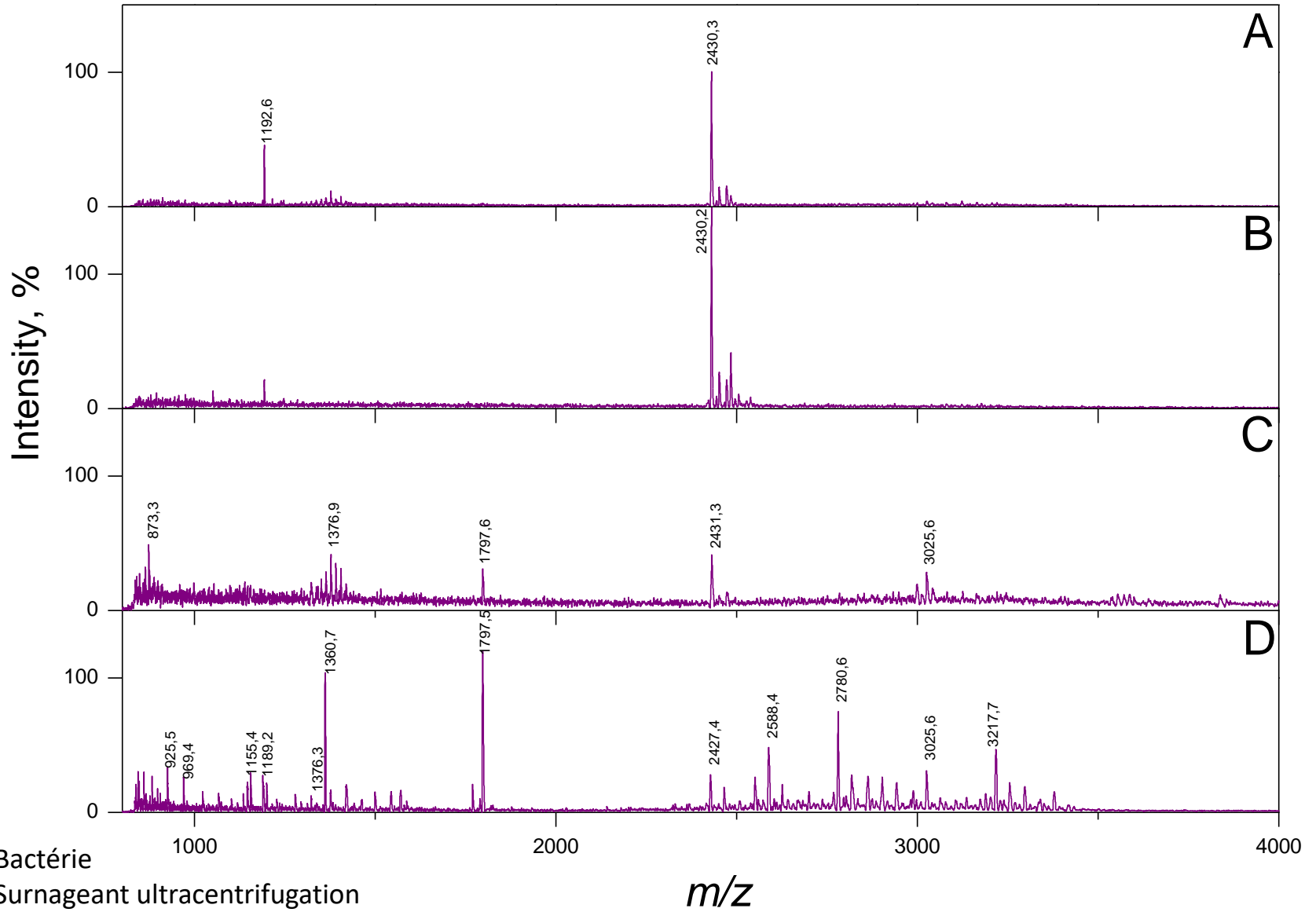


Figure 4: Analyse par MALDI-MS en mode linéaire négatif des Bactéries (A), Surnageant d'ultracentrifugation (B), Membranes (C), et LPS (D) d'*E. coli* C600, d'*E. coli* J5, de *B. pertussis*, de *B. holmesii*.



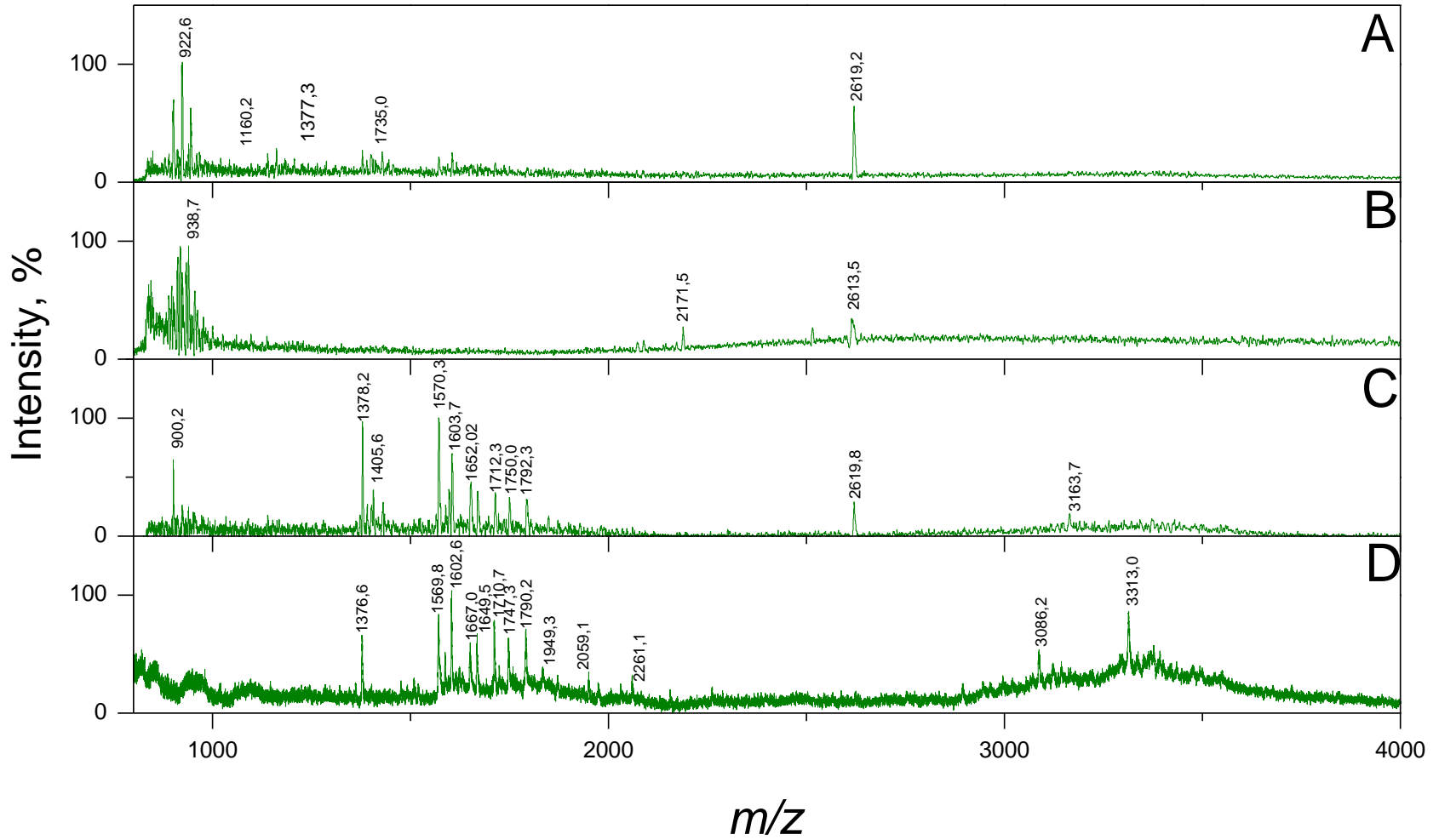
- A) Bactérie
- B) Surnageant ultracentrifugation
- C) Membrane (culot ultracentrifugation)
- D) LPS

*E. coli* J5



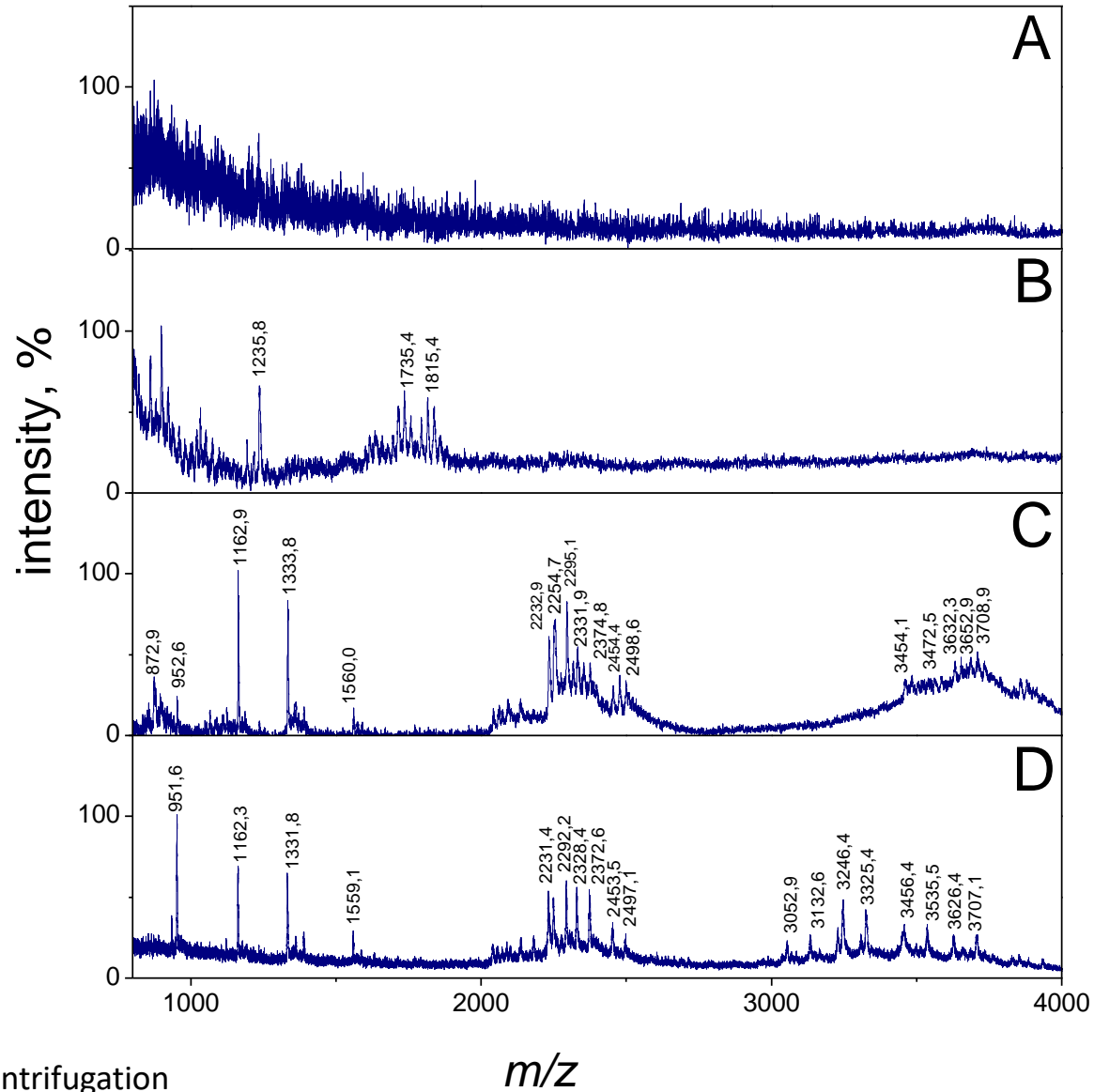
- A) Bactérie
- B) Surnageant ultracentrifugation
- C) Membrane (culot ultracentrifugation)
- D) LPS

*B. holmesii*



- A) Bactérie
- B) Surnageant ultracentrifugation
- C) Membrane (culot ultracentrifugation)
- D) LPS

*B. pertussis*



- A) Bactérie
- B) Surnageant ultracentrifugation
- C) Membrane (culot ultracentrifugation)
- D) LPS

**4) Article n°3 en cours de préparation: Micromethods for lipopolysaccharides structural characterization applied to Gram-negative bacterial lysates**

Aude Breton<sup>1,2</sup>, Alexey Novikov<sup>2</sup>, Stephanie Le Moullec<sup>1</sup>, and Martine Caroff<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Batiment 409, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France

<sup>2</sup> LPS-BioSciences, Bât. 409, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France

***Le manuscrit est en cours de rédaction, ci-après les premiers éléments de l'article, puis les résultats et la discussion qui l'intégreront.***

***Cet article exposera les méthodes :***

- ***d'obtention des lysats bactériens,***
- ***de l'hydrolyse des résidus de lyse ainsi obtenus,***
- ***puis de l'analyse par MALDI-MS des régions PS et lipides A issues de cette hydrolyse.***

***Cette méthode est à associer à l'analyse des LPS non-clivés et elle permet d'obtenir des spectres sur lesquels les masses des PS et des lipides A ne se recouvrent pas. Ainsi l'analyse des LPS est facilitée et nous obtenons aussi des informations sur les régions PS et lipides A de LPS inconnus.***

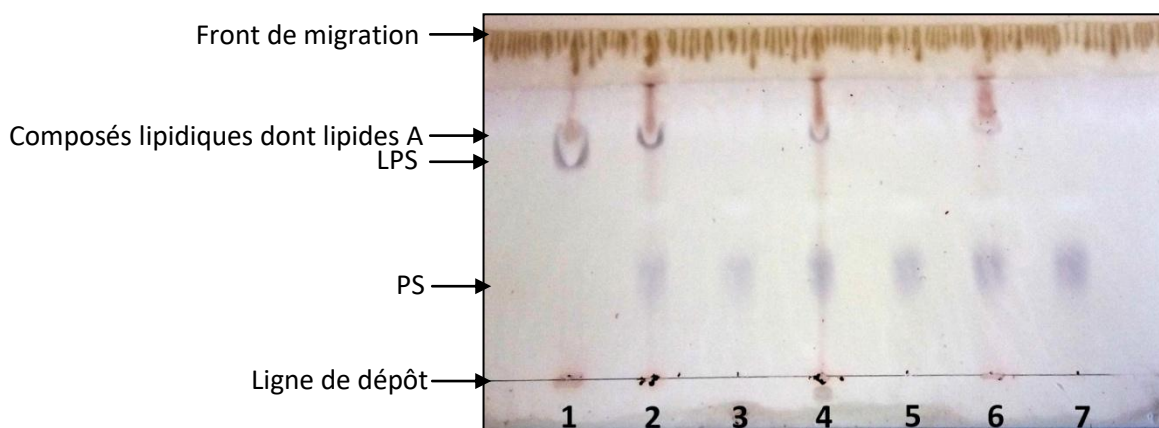
## a) Résultats

Une hydrolyse utilisant un mélange de triéthylamine et de citrate (TEA-CA), utilisée jusqu'ici directement sur les LPS purifiés (Chafchaoui-Moussaoui et al. 2011), a été appliquée sur lysats membranaires d'*E. coli* J5. Des cinétiques d'hydrolyse sur 10 mg de membranes ont été effectuées pour la mise au point de cette nouvelle approche.

Les hydrolysats sont centrifugés dans le but de récupérer les régions PS libérées, qui étant solubles dans l'eau se retrouvent dans le surnageant. Ensuite, les lipides A présent dans le culot avec les LPS non-clivés sont extraits avec un mélange de chloroforme, méthanol et eau (CMO).

- Ce surnageant d'hydrolyse et l'extrait CMO sont directement déposés sur la plaque MALDI pour être analysés.

Sur la CCM, nous voyons qu'en 30 minutes de traitement, les PS sont libérés. L'intensité du spot correspondant augmente au cours du temps. Il en est de même pour celui correspondant aux lipides A. Celui des LPS, quant à lui, diminue. Nous avons également confirmé que les PS libres étaient récupérés dans le surnageant de la centrifugation post-hydrolyse (Figure 32).



**Figure 32 : Récupération des PS clivés dans le surnageant de centrifugation après hydrolyse (TEA-CA 0,05M) des membranes d'*E.coli* J5.**

Migration dans le solvant acide isobutyrique : ammonium 1M (1 :1 ; v :v).

1-40 µg de membranes non-hydrolysées ;

2-hydrolysats à 0h30 avant centrifugation ; 3- Surnageant de l'hydrolysats à 0h30 ;

4-hydrolysats à 1h avant centrifugation ; 5-Surnageant de l'hydrolysats à 1h ;

6-hydrolysats à 1h30 avant centrifugation ; 7-Surnageant de l'hydrolysats à 1h30.



- Les analyses MS des surnageants d'hydrolyse contenant les PS libres et des lipides A extraits sont effectuées. Dès 1 heure d'hydrolyse, les spectres permettent d'identifier les PS et lipides A issus de l'hydrolyse.

La technique a été testée avec des quantités plus petites de matériel de départ. Nous avons appliqué l'hydrolyse au minimum sur 1 mg de membranes, et nous obtenons des spectres analysables. Dans ce cas, la lyse doit donc au minimum s'opérer au départ sur 20 mg de bactéries lyophilisées. Des améliorations afin de diminuer davantage les quantités de bactéries à hydrolyser sont à mener.

Cette technique a été appliquée aux bactéries *B. pertussis*, *B. holmesii*, *E. coli J5* et *E. coli O157:H7*. *B. pertussis* et *B. holmesii* font partie des bactéries du genre *Bordetella* dont l'espèce la plus connue est *B. pertussis* responsable de la coqueluche. L'analyse de la structure des LPS du genre *Bordetella* est une des spécialités de Martine Caroff qui les a décrites tout au long de sa carrière. Les bactéries *E. coli O157:H7* sont des pathogènes responsables de la colite hémorragique, elles font partie des bactéries étudiées par de la société LPS-BioSciences. La bactérie *E. coli J5* est considérée dans la communauté des LPS comme une référence parmi les LPS courts et comme la plus petite partie commune à la structure de plusieurs LPS de *E. coli*, *Salmonelles* et autres *Enterobactéries*.

Les structures des PS connues sont présentées dans la Figure 33. Les spectres MALDI-TOF des lipides A et des PS isolés après l'hydrolyse des membranes sont comparés à ceux de LPS témoins préalablement extraits et purifiés des bactéries (Figure 34).

**Pour l'échantillon d'*E. coli J5***, le spectre des LPS montre une majorité de lipides A hexa-acylés ( $m/z$  1797), mais aussi la présence de lipides A tetra-acylés ( $m/z$  1360). Deux pics correspondant aux PS sont détectés ( $m/z$  1420 et  $m/z$  1199), la différence entre ces pics est la présence d'un résidu Kdo. Le spectre de la partie PS fournit plus d'informations sur ce dernier. Nous retrouvons le pic du PS phosphorylé ( $m/z$  1199) et non-phosphorylé ( $m/z$  1118) et nous voyons qu'il peut être substitué par un groupement PEA, ce qui n'était pas visible sur le spectre des LPS. Pour les deux pics non-

substitués, une hétérogénéité de 18 unités de masse apparaît. Il s'agit d'une différence correspondant à la masse d'une molécule d'H<sub>2</sub>O. Nous observons aussi un fragment de PS ( $m/z$  969) avec cette même hétérogénéité. Sur le spectre des lipides A nous observons les deux formes, à 4 AG et 6 AG, avec leurs équivalents déphosphorylés (-80u).

**Pour l'échantillon de *B. pertussis***, sur le spectre des LPS nous identifions des LPS tetra- et penta-acylés ( $m/z$  1332 et  $m/z$  1558). Il y a aussi le pic correspondant au PS à 12 sucres ( $m/z$  2293). Ce pic correspondant aux PS est nettement retrouvé sur le spectre du PS. Enfin, avec le spectre des lipides A, nous retrouvons les mêmes espèces que celles trouvées sur le spectre des LPS. Nous avons des lipides A à 4 et 5 AG et leurs pics déphosphorylés associés (-80 u).

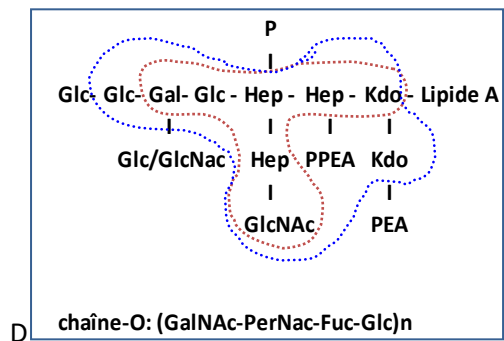
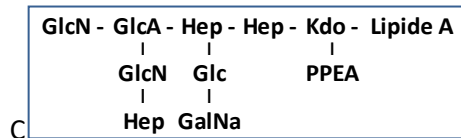
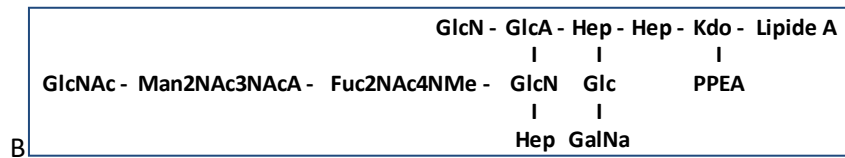
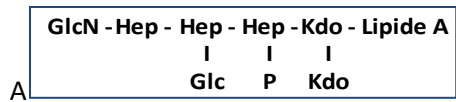
**Pour l'échantillon de *B. holmesii***, les structures du lipide A et du PS ont été caractérisées au sein du laboratoire et un article est en cours de soumission. Sur le spectre du PS, nous identifions clairement le PS à 9 sucres ( $m/z$  1631) et sa forme phosphorylée ( $m/z$  1710). Les formes des lipides A à 5 AG ( $m/z$  1602) et 4 AG ( $m/z$  1376) avec leurs formes déphosphorylées (-80u) sont présentes sur le spectre du lipide A. On y observe également la forme substituée d'une glucosamine ( $m/z$  1765) et l'hétérogénéité d'AG C12-OH/C14-OH avec le pic à  $m/z$  1404 (différence de 28u). La masse du PS phosphorylé additionnée de celle du lipide A à 4 AG ou de celle du lipide A à 5 AG donnent respectivement celles des LPS ( $m/z$  3086 et 3313).

***E. coli* O157:H7** est une bactérie aux LPS longs ayant un core de type R3. L'unité répétitive de sa chaîne-O est composée de (GalNAc-PerNAc-Fuc-Glc) (Perry et al. 1986). Il est plus difficile d'analyser le spectre des LPS longs. La forme majoritaire de lipide A est celle à 4 AG ( $m/z$  1360). Nous visualisons un pic correspondant à un fragment de PS ( $m/z$  1888) et un second correspondant à ce même fragment de PS substitué par un deuxième résidu Kdo ( $m/z$  2108). Ce Kdo peut être lui-même substitué par un groupement phosphate ou PEA (+80u ou +123u). La masse de ce fragment de PS ( $m/z$  2108) additionnée de celle du lipide A ( $m/z$  1360) donne la masse du fragment de LPS visible sur le spectre ( $m/z$  3469). Après l'hydrolyse des membranes, voici nos hypothèses pour l'analyse des

pics du spectre des PS dont la forme 1 ( $m/z$  1323) et la forme 2 ( $m/z$  1825) sont détaillées dans la Figure 33. D'après ces masses, le Kdo II ne serait pas clivé lors de l'hydrolyse et de la fragmentation douce de la MS. Cette hypothèse reste à démontrer avant d'intégrer l'article. Pour ce qui est des unités répétitives de la chaîne-O, elles sont clairement visibles (698u), et ce qui n'était pas le cas sur le spectre des LPS. Sur le spectre des lipides A extraits des membranes, nous identifions aisément les trois formes, l'hexa-acylée ( $m/z$  1797) ; la penta-acylée ( $m/z$  1598) et la tetra-acylée ( $m/z$  1360).

Ces résultats sur 4 modèles de LPS de nature différente, démontrent la capacité de cette méthode à identifier le PS et le lipide A directement à partir de membranes bactérienne sans nécessité d'extraire les LPS au préalable.

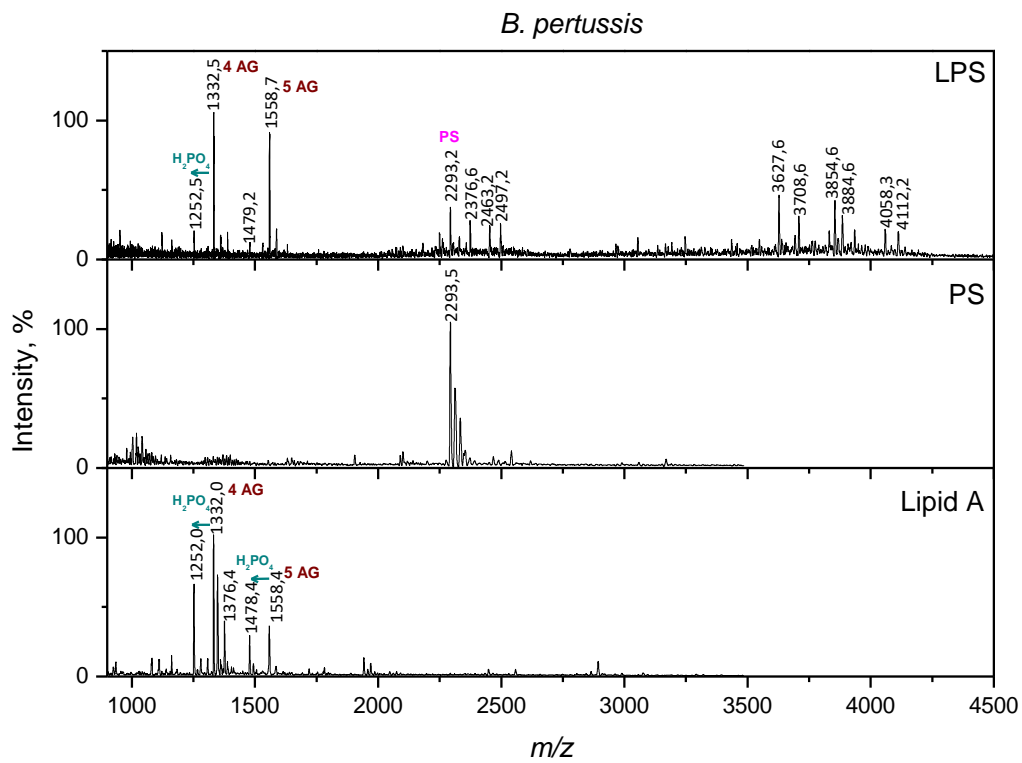
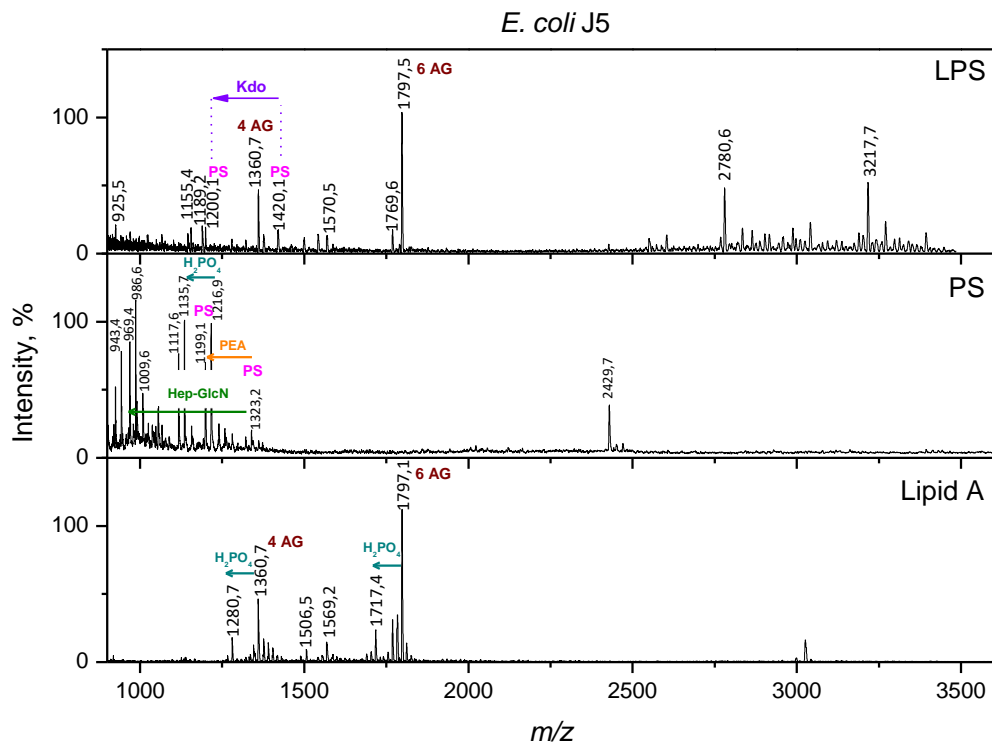
Cette possibilité est d'autant plus précieuse que ces structures sont connues pour leur variabilité en fonction des conditions de culture et de nombreux autres paramètres, ce que nous illustrerons au cours de ce travail à plusieurs reprises.

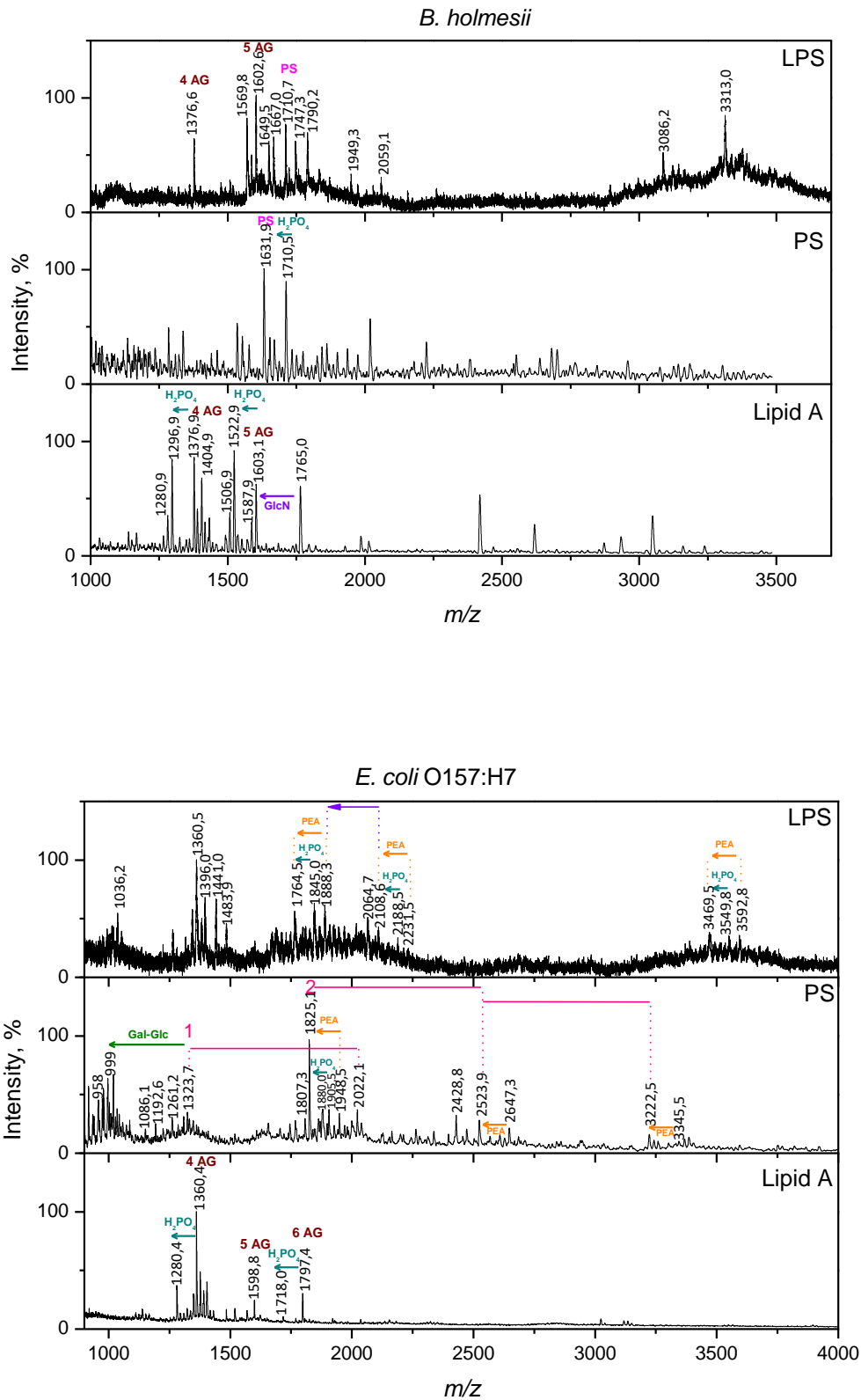


La forme 1 identifiée sur les spectres suivants est en pointillés rouges, et la forme 2 en pointillés bleus.

**Figure 33 : Structure des cores des LPS de différentes bactéries.**

A) *E. coli* J5 ; B) *B. pertussis* ; C) *B. holmesii*, D) ; *E. coli* O157:H7.





**Figure 34 : Analyse par MALDI-MS en mode linéaire négatif des Lipides A et PS obtenus après hydrolyse (TEA-CA 0.5M) des membranes bactériennes d'*E. coli* J5, de *B. pertussis*, de *B. holmesii* et d'*E. coli* O157:H7.**

Abréviations : GlcN : glucosamine ;  $H_2PO_3$  : groupement phosphate ; Hep : heptose ; PEA : phosphoéthanolamine ; PS : polysaccharide.

## ***b) Discussion et conclusion***

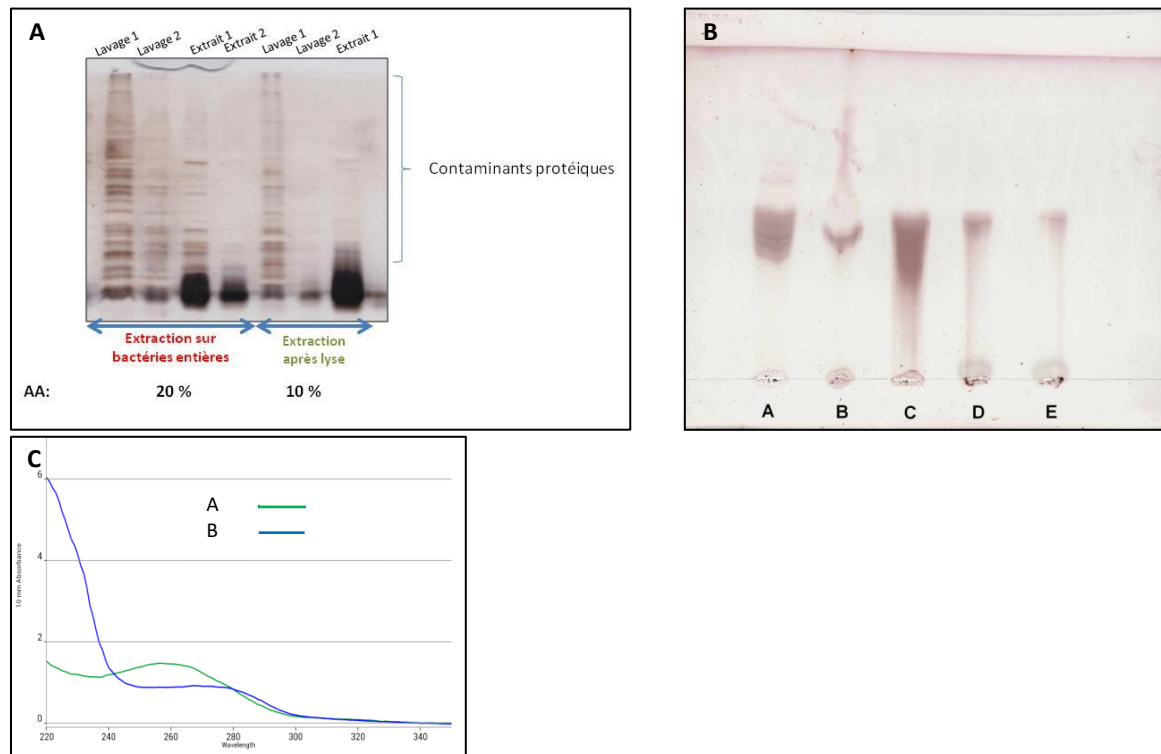
Avec la mise au point de cette deuxième micro-méthode, nous avons analysé rapidement et facilement les PS et les lipides A des LPS courts. De façon intéressante, cette méthode s'applique aussi aux LPS longs. Elle donne d'ailleurs davantage d'informations sur leurs structures. Pour *E. coli* O157:H7 elle permet de confirmer la structure de la chaîne-O. Des essais sur d'autres souches aux LPS longs devront être réalisés afin de confirmer le potentiel de la méthode sur tous les LPS.

Cette manipulation peut être exécutée en moins de deux jours. La lyse osmotique et ses centrifugations sont réalisables en moins de 3 heures. La lyophilisation des membranes obtenues s'effectue sur la nuit ou sur une demi-journée en fonction de leur quantité. L'hydrolyse et les extractions sont ensuite accomplies en moins d'une demi-journée. Rapidement, nous obtenons donc des informations sur le LPS, les lipides A et les PS présents à la surface des bactéries. Dans nos manipulations, le temps d'hydrolyse a été fixé à 1 heure car nous obtenons des spectres correctement analysables et de même qualité qu'avec des hydrolyses plus longues (allant jusqu'à 3h). Il se peut que ce temps soit à adapter pour d'autres analyses sur d'autres membranes bactériennes. Ce temps d'hydrolyse, comme nous l'avons vu, génère une déphosphorylation partielle des molécules de lipide A. Cette donnée est une information complémentaire permettant de démontrer que le phosphate libéré était engagé dans une liaison de type  $\alpha$ -P (Martine Caroff et al. 1988).

## ***5) Extrapolation : utilisation de lysat bactérien pour l'extraction de LPS à petite échelle***

Les bactéries lysées peuvent avoir d'autres applications que la microanalyse structurale. Elles peuvent, par exemple, être utilisées comme support d'extraction. La lyse par choc osmotique et des étapes confidentielles, nous permettent de produire aisément quelques centaines de mg de lysat bactérien et donc des LPS en petites quantités.

Nous avons extrait des LPS à partir de lysat bactérien, produit par la lyse à l'eau, et comparé leur qualité par rapport à l'extraction standard sur des bactéries entières non-lysées (Figure 35). Nous avons effectué l'extraction dans les conditions standards à partir de 100 mg de lysat bactérien et 500 mg de bactéries *E. coli* J5.



**Figure 35 : Comparaison de l'extraction des LPS d'*E. coli* J5 à partir de bactéries entières et de lysat bactérien.**

A) Gel SDS-PAGE ; dépôt de 2.5 µg d'échantillon pour les lavages et de 0.5 µg pour les extraits ; AA : contenu en acides aminés mesuré à l'auto-analyseur dans chacun des extraits 1.  
 B) HP-TLC ; migration dans de l'acide isobutyrique/ammonium 1M (5 :3,v :v), A-40 µg de LPS standards d'*E. coli* J5, B-40 µg de lysat bactérien d'*E. coli* J5, C-40 µg du 1<sup>er</sup> extrait de LPS bruts issus du lysat bactérien , D-40 µg du 1<sup>er</sup> extrait de LPS bruts issus des bactéries entières, E-40 µg du 2<sup>ème</sup> extrait de LPS bruts issus des bactéries entières.  
 C) spectre d'absorbance ; A-1<sup>er</sup> extrait de LPS bruts issus des bactéries entières ; B-1<sup>er</sup> extrait de LPS bruts issus du lysat bactérien. Solution à 2 µg/µl.

Nous obtenons, après extraction sur le lysat bactérien, des LPS bruts deux fois moins contaminés en protéines (dosage des acides aminés par auto-analyseur). Le profil d'absorbance nous permet de conclure que les contaminants nucléiques sont éliminés dans les extraits de LPS issus du lysat bactérien et ce n'est pas le cas pour ceux qui sont issus des bactéries. Pour des quantités identiques d'échantillons, la CCM et le gel SDS-PAGE confirment la présence d'une proportion nettement plus élevée de LPS dans les extraits bruts provenant du lysat bactérien que ceux issus des bactéries



entières. L'extraction à partir du lysat bactérien permet dans ce cas l'obtention de LPS bruts plus purs.

En partant du lysat bactérien à la place de bactéries pour l'extraction, nous éliminons dès le départ des contaminants qui ne pourront ainsi plus interférer lors de l'extraction et de la purification des LPS. Ces LPS ont ensuite été purifiés selon les méthodes classiques. Ils ont été utilisés comme des LPS standards dans le chapitre II.

## **6) Discussion et conclusion sur les deux micro-méthodes d'analyse**

Avec la mise en place de ces deux micro-méthodes d'analyse rapide des LPS nous disposons d'outils efficaces pour les caractériser. Actuellement, la possibilité d'analyser par MALDI-MS des LPS directement sur les bactéries a été testée mais n'a pas donné de résultats exploitables.

Les membranes sont un support d'analyse par MS permettant d'étudier la structure des LPS sans les extraire et sans utiliser de traitement chimique. L'utilisation des membranes pour détecter les LPS et donc d'identifier les bactéries peut être appliquée à des tests de détection. Par exemple, cet outil peut être développé afin d'aider au diagnostic de la coqueluche ou des infections respiratoires causées par les bordetelles. *B. pertussis* et *B. parapertussis* sont deux pathogènes responsables de la coqueluche. *B. bronchiseptica*, *B. holmesii*, *B. hinzii* et *B. petrii*, sont aussi des agents retrouvés dans certains cas d'infections respiratoires chez les humains. Ces bactéries possèdent des structures différentes de lipides A (Novikov et al. 2013; Al Bitar Nehmé 2014). Actuellement le diagnostic de la coqueluche s'effectue principalement par la mise en culture sur milieu spécifique des isolats ou par PCR (Dragsted 2004). La culture est une méthode de détection longue (jusqu'à 10 jours) et elle est seulement possible lors des deux premières semaines de la maladie. La PCR, pour la détection de *B. pertussis* ou *B. parapertussis* n'est pas vraiment spécifique mais elle donne des résultats en 48 heures. Ces résultats peuvent être faussés par la détection d'autres bordetelles comme *B. holmesii* ou *B. bronchiseptica* (Tang et al. 1998; Register & Sanden 2006). De plus, la PCR n'est applicable que

dans les 3 semaines suivant l'apparition de la toux. Elle est toutefois une méthode très sensible (1 à 10 CFU/ml).

La méthode développée par MALDI-MS donne des résultats rapides. En une journée nous obtenons les membranes et le spectre associé. Il est possible d'identifier la Bordetelle étant donné que les espèces possèdent des LPS différents. Cette méthode présente des avantages pour l'étude et le suivi de l'évolution dans le temps et dans l'espace des pathogènes responsables de la coqueluche ou d'infections respiratoires. Dans nos résultats (article n°2), nous discriminons aisément les bactéries *B. holmesii* et *B. pertussis* par leurs spectres de membranes. Par l'analyse des LPS sur les membranes, nous avons franchi une première étape dans l'analyse au plus proche de leur état *in vivo*.

Cependant, un développement de cette méthode doit être établi pour analyser directement les LPS à partir de prélèvements cliniques. Pour cela, la sensibilité de la méthode doit d'abord être améliorée. Dans un premier temps, des tests de lyses effectués directement sur un seul clone bactérien sont à mener, les premières expériences étant prometteuses. Ensuite, des micro-tests de lyse et d'analyse pourront être mis en place sur des prélèvements cliniques. A terme, l'objectif sera d'analyser directement les LPS à la surface des bactéries sans les lyser. Ce développement devrait s'effectuer en utilisant le spectromètre de masse TOF-SIMS du projet Andromède.

Enfin, cette première méthode d'analyse des LPS entiers, n'a pas permis l'analyse des LPS longs d'*E. coli* O157:H7. Mais, la deuxième micro-méthode a permis l'analyse de ces LPS longs sans les extraire.

La 2<sup>ème</sup> micro-méthode, celle de l'analyse des PS et lipides A en moins de deux jours, présente aussi de l'intérêt. Elle permet d'obtenir rapidement par MS la structure de LPS entiers sans les extraire, ce qui n'existait pas auparavant. Par exemple, elle peut être employée pour discriminer les structures des LPS de bactéries provenant de différentes cultures. En effet, il est fréquent, que les mêmes bactéries aient des structures différentes de LPS lorsque leurs conditions de culture ou leur environnement varient. Ce sera le cas des deux échantillons de LPS étudiés dans le chapitre II. La

méthode permet aussi d'affiner l'analyse des LPS. Dans de nombreux cas, l'analyse par MS des LPS, même purifiés, n'est pas optimale sans modification chimique. Le fait d'analyser séparément PS et lipides A procure plus d'informations sur leurs structures. Enfin, cette micro-méthode peut aussi être un moyen de déterminer le sérotype de bactéries.

Pour finir, le lysat bactérien produit par lyse osmotique est aussi un support avantageux pour l'extraction de LPS à petite échelle. Avec leur utilisation, l'extraction s'effectue sur une matière plus concentrée en LPS et contenant moins de composés potentiellement contaminants par rapport aux bactéries.

Nos micro-méthodes sont prometteuses et elles ouvrent la voie à d'autres améliorations qui seront poursuivies avec intérêt.

## ***Chapitre II : Etude de la structure du lipide A et des activités inflammatoires des LPS d'une bactérie non-pathogène : Vitreoscilla filiformis***

### ***1) Introduction et objectifs***

Dans le cadre de cette thèse, nous étudions les LPS dits « peu toxiques » en vue de possibles applications de leurs activités. Les LPS de *Vitreoscilla filiformis* ont été caractérisés comme non-toxiques pour des applications cutanées dans le brevet US/2005 0118118 (A1) (Martin 2005).

Les LPS des bactéries *Vitreoscilla filiformis* constituent l'un des principes actifs du lysat bactérien utilisé dans plusieurs produits dermatologiques et cosmétiques (Biotherm©, Laboratoire La Roche-Posay, L'Oréal ) afin de traiter la dermatite atopique (Gueniche et al. 2006; Gueniche et al. 2008). Les LPS ou le lysat bactérien détiennent plusieurs rôles bénéfiques. Ces bactéries ont été isolées dans le lac Erie en Amérique du Nord et sont aussi retrouvées dans les eaux sulfurées sodiques de sources thermales.

Les LPS de *V. filiformis* sont responsables de la sécrétion de peptides antimicrobiens par les kératinocytes (défensine  $\beta$ -2, RNASE-7, psoriasine) alors que ce n'est pas le cas de ceux d'*E. coli* (Mahe & Martin 2008; Mahe et al. 2013). Ils protègent ainsi la peau contre certaines infections.

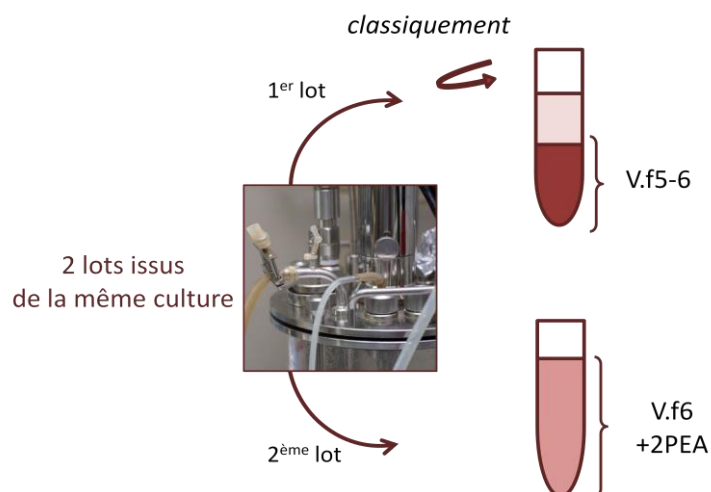
Les LPS de *V. filiformis*, présents dans le lysat bactérien, ont d'autres activités immunomodulatrices nécessaires pour l'activation du système immunitaire cutané via la voie MD-2 :TLR4. Des études montrent que ces LPS induisent la différenciation des cellules de Langerhans et un rééquilibrage de la balance Th1/Th2 (Gueniche & Breton 2004; Volz et al. 2014). Les cellules dendritiques (DC) du tissu cutané humain stimulées par les lipides A expriment davantage de molécules de co-stimulation du CMH nécessaires pour l'initiation de la réponse immune (B7-1, B7-2). Elles ont aussi une activité phagocytaire plus importante par rapport aux cellules stimulées avec les lipides A d'*E. coli* (Martin 2005). Cependant, les LPS ne sont pas les seuls principes actifs du lysat.

Le lysat de *V. filiformis* active des mécanismes antioxydants TLR2-dépendants en augmentant l'activité transcriptionnelle de la superoxyde dismutase MnSOD. Cette enzyme protège les cellules contre la production incontrôlée de ROS (Mahe et al. 2006; Mahe & Martin 2008). Ce mécanisme protège notamment la peau contre le vieillissement.

En comparant la stimulation des DC humaines avec les LPS de *V. filiformis* ou avec le lysat bactérien, des différences sont observées. Les LPS induisent un fort taux d'IL-12p70 et un faible taux d'IL-10 tandis que pour le lysat c'est le contraire. Deux voies de signalisation s'effectuent alors en parallèle : la signalisation par le TLR2, qui aboutit à de forts taux de cytokines anti-inflammatoires, et la signalisation par le TLR4 qui entraîne la production d'IL-12p70. Les LPS induisent une polarisation des cellules T en cellules Th1, mais ce n'est pas l'effet du lysat qui est responsable d'une différenciation en lymphocytes T régulateurs et de la mise en place de la tolérance aux antigènes du soi et aux antigènes non-dangereux. La biomasse totale permet une protection de l'épiderme humain contre le stress oxydatif et le vieillissement cutané par l'activation de la voie TLR2 et la sécrétion d'IL-10 (Mahe et al. 2013).

Les LPS gardent leur importance dans l'initiation de la réponse immunitaire, la production de peptides antimicrobiens mais ne sont pas responsables des effets du lysat induisant la tolérance et des effets antioxydants.

Le travail présenté dans ce chapitre a pour objectif de caractériser la structure des lipides A des LPS extraits de deux lots différents de *Vitreoscilla filiformis* et leurs activités TLR4 dépendantes. Seule la structure du lipide A d'un des deux lots a été caractérisée et décrite dans le brevet US/2005 0118118 (A1). Les deux lots sont différents : l'un correspond aux LPS, non-décrits dans le brevet, extraits à partir d'un culot bactérien obtenu après centrifugation de la culture, nous appellerons ces LPS : V.f5-6. L'autre correspond aux LPS décrits et extraits à partir de la biomasse totale (toute la culture), nous les nommerons : V.f6+2PEA. Cette différence de préparation aboutit à deux lots de LPS aux structures différentes ([Figure 36](#)).



**Figure 36 : Origine des deux lots de LPS de *V. filiformis***

Les effets de ces variations ont ensuite été étudiés en termes d'activités biologiques sur une lignée cellulaire de monocytes en les comparant à d'autres LPS de structure connue et d'intérêt. Ces LPS, devant servir de standards, ont dû préalablement être extraits, purifiés ou re-purifiés. L'activation cellulaire a été suivie en dosant les sécrétions de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 et la production de ROS après stimulation. La cytotoxicité de ces molécules a été suivie par l'analyse de l'activation des caspases 3/7 et de la viabilité cellulaire après stimulation.

Les LPS standards ont été choisis pour leurs caractéristiques structurales décrites dans la littérature. Un des exemples connus de la relation structure-toxicité des LPS est celui de *Bordetella pertussis* (Cf. Introduction- L'influence de la structure des LPS sur l'activation du récepteur MD-2:TLR4). Nous l'illustrerons ici avec l'emploi des LPS de *B. pertussis* 1414 et *B. pertussis* 18-323 dans les tests d'activités biologiques.

**2) Article n°4: Structural and biological characteristics of *Vitreoscilla filiformis* lipids A: Use of mass spectrometry to highlight structural discrepancies**

Aude Breton<sup>1,2</sup>, Alexey Novikov<sup>2</sup>, Richard Martin<sup>3</sup>, Pierre Tissieres<sup>1,4</sup> and Martine Caroff<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France*

<sup>2</sup>*LPS-BioSciences, Bât. 409, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France*

<sup>3</sup>*L'Oréal, Centre de Recherches Biotechnologiques, 37390 Tours, France*

<sup>4</sup>*Pediatric and Neonatal Intensive Care, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France*

\* Corresponding author

Tel. +33 1 69 15 71 91

E-mail: martine.caroff@u-psud.fr

Running title: *Vitreoscilla filiformis*, lipid A structures and activities

Submitted at Journal of Lipid Research – Online - Janvier 2017.

## 1. Title page

### **Structural and biological characteristics of different forms of *Vitreoscilla filiformis* lipid A : Use of mass spectrometry to highlight structural discrepancies**

Aude Breton<sup>1,2</sup>, Alexey Novikov<sup>2</sup>, Richard Martin<sup>3</sup>, Pierre Tissieres<sup>1,4</sup> and Martine Caroff<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>  
*Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France*

<sup>2</sup>  
*LPS-BioSciences, Bât. 409, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France*

<sup>3</sup>*L'Oréal, Centre de Recherches Biotechnologiques, 37390 Tours, France*

<sup>4</sup>*Pediatric and Neonatal Intensive Care, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France*

\* Corresponding author

Tel. +33 1 69 15 71 91

E-mail: martine.caroff@u-psud.fr

Running title: *Vitreoscilla filiformis*, lipid A structures and activities

Abbreviations: DC, dendritic cells; DHB, 2,5-dihydroxybenzoic acid; EA, ethanolamine; FA, fatty acid; GlcN, glucosamine; IL, Interleukin; LPS, lipopolysaccharide; NAC, N-acetyl-cystein; PBS, phosphate buffer saline; PEA, phosphoethanolamine; PS, polysaccharide; ROS, reactive oxygen species; V.f, *Vitreoscilla filiformis*



## 2. **Abstract**

*Vitreoscilla filiformis* is a Gram-negative bacterium, isolated from spa waters, and described for its beneficial effects on the skin. We characterized the detailed structure of its LPS lipid A moiety, an active component of the bacterium, that contributes to the observed skin activation properties. Two different batches, differing in post-culture cells recovery, were tested. Chemical analyses and mass spectra, obtained before and after mild-alkali treatments, revealed these lipid A share the common bisphosphorylated  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-linked D-glucosamine disaccharide with hydroxydecanoic acid in an amide linkage. Short-chain fatty acids: hydroxydecanoic and dodecanoic acids were found in a 2:1 ratio. The two lipid A structures differed by the relative amount of the hexa-acyl molecular species and phosphoethanolamine substitution of the phosphate groups.

The two *Vitreoscilla filiformis* LPS batches induced variable IL-6 and TNF- $\alpha$  secretion by stimulated myelomonocytic THP-1 cells, without any difference in reactive oxygen species production, or activation of caspase 3/7. Other different well-known highly purified LPS samples were characterized structurally and used as standards. The structural data obtained in this work explain the low inflammatory response observed for *Vitreoscilla filiformis* LPS, and previously demonstrated beneficial effects on the skin.

### **Keywords:**

Cytokines, Lipid Biochemistry, Lipopolysaccharide, Mass Spectrometry, Skin, Toll Like Receptor.

### 3. Introduction

Lipopolysaccharides are the main components of the outer-membrane of Gram-negative bacteria, representing about  $10^6$  molecules per bacterium (1). They are also major antigens displaying unique structures for each bacterium. This is a signature for which each small detail may exert important differences on LPS recognition by host cells and signal transduction (2). LPS does not necessarily induce a toxic response, so all LPS are not endotoxins, but endotoxins are always composed of LPS. LPS are the first non-secreted toxins found to interact with host innate immunity, generating cytokine production, immune cell recruitment, and specific host-cell responses leading, at higher doses, to multiple organ failure and septic shock (3). The smallest change in the structures of LPS, or their hydrophobic moiety, named lipid A, is directly linked to innate immune recognition and development of a specific host response. The interaction between LPS molecules and their innate receptor, the MD-2/TLR4 complex is greatly affected by the fine details of LPS structures. First, LPS molecules are recognized by the LPS Binding Protein and presented as monomers to the soluble or membrane CD14 receptors. Then, the LPS is transferred to the MD-2/TLR4 complex (2, 4) allowing its dimerization of the receptor through ionic and hydrophobic interactions and activation of the cellular signaling pathways. Among these, the activation of the NF $\kappa$ B pathway directly induces rapid pro-inflammatory cytokine production. Secreted cytokines are ultimately central to generate an efficient responses to pathogens and activation of the adaptive immune system (5, 6).

The *Neisseriaceae* family, including the *Vitreoscilla* genus are obligate aerobic bacteria described for the first time in 1949 by F.G.Pringsheim as colorless, gliding filamentous organisms (7). Similar organisms were in fact described earlier by Cohn in 1870 (8). They are known as the first genus in which bacterial haemoglobin (VHb) was discovered (9).

After the discovery of the improvement of the atopic dermatitis skin syndrome by spa waters containing such non-pathogenic bacteria (10), interest was focused on the bacterial elements responsible for this beneficial effect.

During the last decades, biological activities have been found to be beneficial for the skin, after application of *V. filiformis* biomass. These activities include : substance P antagonist (11), stimulation of skin anti-microbial peptide secretion, recovery of sunburn areas (12, 13), activation of MnSOD as an inducible free-radical scavenger in keratinocytes for protecting cells against the uncontrolled production of reactive oxygen species (ROS) (14), modulation of mouse and human cutaneous inflammatory responses inducing interleukin-10 (IL-10) production in dendritic cells (DC), and priming of regulatory T cells (15). It was shown that the activation of two independent TLRs pathways occurs following DC stimulation with a *V. filiformis* lysate (13, 15). Firstly, the TLR2 pathway induces IL-10 secretion and activation of antioxidant responses. Secondly, the TLR4 pathway activation induces IL-12p70 production. In contrast to *E. coli* LPS, it was shown that *V. filiformis* LPS stimulate anti-microbial peptides secretion by keratinocytes. Dendritic cells stimulated with *V. filiformis* LPS induce a Th1 polarisation during T cell priming. This effect is not found with *V. filiformis* lysate stimulation. The role of *V. filiformis* lipid A, in contrast to *E. coli* lipid A, was found to promote a skin DC response through increased expression of co-stimulatory factors (B7-2), and phagocytosis (10, 16). Altogether, the effects of a *V. filiformis* lysate on the skin are dominated by TLR2 signaling and induction of tolerance (17) while *V. filiformis* lipid A acts through TLR4 signaling promoting pathogens clearance.

In dermatologic treatments including *V. filiformis* lysates, the structure of the biologically active part of the corresponding LPS had to be characterized. We present herein the chemical characterization of the lipids A of two closely related forms of LPS from *V. filiformis*, and their TLR4 related myeloid response. The two LPS batches correspond to LPS extracted from a bacterial culture pellet, named V.f 5-6, and LPS isolated from the whole Biomass, including LPS from the pellet and LPS soluble in the growth medium, named V.f 6+2PEA. We therefore stress that culture supernatants should always be tested for the presence of more soluble LPS molecules which could be under-estimated and lost while being part of LPS relevant molecules for a given experiment.

We also demonstrated the importance of Mass Spectrometry (MS), during the process of structural

characterization of these molecules, and for the control of LPS structures known to vary according to different bacterial growth conditions and showing discrepancies with structures described in the literature.

#### **4. Materials and Methods**

##### **Bacterial strains.**

*V. filiformis*, ATCC® 15551<sup>TM</sup> was collected in two different manners as described in the European Patent 2144995 A1 (18). The  $\mu$ production is regulated at 0,12 H<sup>-1</sup>, the temperature at 26°C and the pH at 7.00. The biomass is harvested by centrifugation (9000g at 4°C), then stabilized by lyophilization.

Two batches were examined for lipid A characterization, the first batch corresponded to a first growth corresponding to the bacterial pellet of the whole Biomass after centrifugation. The second corresponded to another growth in similar conditions, without pellet and supernatant separation before LPS extraction (*i.d.* the whole Biomass).

*Escherichia coli* J5 ATCC® 43745<sup>TM</sup> was cultured in Lysogeny Broth at 37°C overnight in our laboratory. *Bordetella pertussis* 1414 and *Neisseria meningitis* bacteria were grown at the Institut Mérieux, Lyon, France, and LPS were extracted in the laboratory.

##### **Reference LPS samples.**

Several purified LPS samples with already described structures were used as references.

*Haemophilus influenzae* EAGAN LPS sample was a generous gift from the National Research Center (Ottawa, Canada).

*Rhodopseudomonas gelatinosa* and *Pseudomonas aeruginosa* LPS were kindly provided by the company LPS-BioSciences (Orsay, France).

##### **LPS and lipid A preparation.**

All LPS samples were re-purified to obtain the necessary quality for optimal conditions of MS analysis and no contamination by other bacterial components, required for biological use, as shown by UV spectrometry, SDS-PAGE, TLC and amino acid analyses (19, 20).

The *V. filiformis* LPS were extracted by the isobutyric acid/1M ammonium hydroxide method (21). LPS were purified by enzymatic treatments to remove DNA, RNA and proteins as already described (22). They were also extracted with a mixture of solvents to remove phospholipids and lipoproteins. Lipid A was prepared by mild, detergent-facilitated hydrolysis of LPS and purified as before (23).

Alternatively, lipid A was obtained by direct hydrolysis of the lyophilized bacteria (24). Briefly, 10 mg of lyophilized bacteria were suspended in 400  $\mu$ l of isobutyric acid and 1M ammonium hydroxide (5:3, v:v), heated 2 hours at 100°C with stirring, cooled to 4°C, and centrifuged. The supernatant was diluted with water (1:1, v:v) and lyophilized. The material obtained was then washed twice with 400  $\mu$ l of methanol and centrifuged (2000 g for 15 min). Finally, the insoluble lipid A was extracted once in a 100 to 200  $\mu$ l mixture of chloroform: methanol: water (3:1.5:0.25, v: v: v).

Monophosphorylated lipids A were obtained by HCl 0.1M hydrolysis of the lipid A for 10 min at 100°C, neutralised and recovered by ultracentrifugation.

#### **Identification of glycosyl absolute configurations.**

Lipids A (4 mg) were hydrolyzed with 0.5 ml of 4M HCl at 100°C for 2 hours. After cooling and extraction of fatty acids with chloroform, residual solutions were brought to neutrality by repeated evaporation under reduced pressure. After N-Acetylation, the residue was treated with trifluoroacetic acid - R-(-)-2-butanol, per-Acetylated, and analyzed by gas chromatography (GC) on a BP10 capillary (Scientific Glass Engineering) column using a program 160°C (1 min) to 220°C, 5°C min<sup>-1</sup> at 0.6 kPa (25).

#### **Sequential liberation of ester-linked fatty acids by mild alkali treatment.**

This treatment was used to establish the lipid A acylation patterns (22). For the first-step liberation of primary ester-linked fatty acids, lipid A (200  $\mu$ g) was suspended at 1 mg/ml in 28% ammonium hydroxide and stirred for 5 hours at 50°C. The solutions were dried under a stream of nitrogen, the residues taken up in a mixture of chloroform: methanol: water (3: 1.5: 0.25, v: v) followed by MALDI-MS analysis. In this case, kinetics (15 min, 30 min, 2 h30, 5 h) were done to follow the complete process in parallel to the *B. pertussis* lipid A kinetics taken as a reference (26).

#### **Chemical analyses.**

Fatty acids were analyzed as in (27), briefly, LPS (1 mg) were submitted to strong acid treatment, 4M HCl, 2 hours at 100°C with 20:0 (20  $\mu$ g) as internal standard, extraction with ethyl acetate and esterification with diazomethane. GC-MS analysis was performed as before (28) using a Finnigan Mat 95S mass spectrometer.

The aqueous phase containing the free soluble compounds were lyophilized, and hydrolyzed with 6M HCl for 6 hours at 95°C in order to remove the glucosamine Phosphate group. Acid was removed under vacuum, and the residue, recovered into a citrate buffer, was subjected to hexosamine, ethanolamine (EA) and phosphoethanolamine (PEA) analysis.

The contents of these components were measured with a Hitachi L-8800 amino acid analyzer equipped with a 2620 MSC-PS column (ScienceTec, Les Ulis, France). The elution protocol recommended by the manufacturer for the separation of amino acids and hexosamine was used. Under these conditions, PEA, Glucosamine (GlcN) and EA were eluted respectively at 3.5, 39.84 and 46.91 min.

#### **Thin Layer Chromatography.**

TLC was done on glass HPTLC silica gel plates (Merck). Twenty micrograms of LPS were deposited at the origin of the HPTLC plate, and chromatographed in a solvent mixture of isobutyric acid and 1M ammonium hydroxide (5:3, v:v) (29). Products were visualized by charring (in an oven at 150°C for 5 min) after spraying with 10% sulfuric acid in ethanol.

#### **SDS–polyacrylamide gel analysis of LPS.**

Fifteen percent poly-acrylamide gel was used, and 0.2 µg of LPS was loaded onto the 4% stacking gel. The LPS samples preparation, electrophoresis process and the Tsai and Frash Silver Nitrate coloration, were performed as previously described (30, 31).

#### **MALDI-MS analysis.**

MALDI-MS was done in the linear mode with delayed extraction using a Perseptive Voyager STR (PE Biosystem, France) time-of-flight mass spectrometer and/or on a Shimadzu Axima Performance system. A suspension of lipid A (1 mg/ml) in chloroform: methanol: water (3:1.5:0.25, v:v:v) was desalted with a few grains of Dowex 50W-X8 (H<sup>+</sup>), one µl was deposited on the target, mixed with one µl of the Gentisic acid (2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB) matrix suspended at 10 µg/µl in the same solvent or in 0.1M aqueous citric acid, and dried (23). Analyte ions were desorbed from the matrix with pulses from a 337 nm nitrogen laser. Spectra were obtained in the negative-ion mode at 20 kV. When LPS were analysed directly, they were suspended in water and decationized in the same way, using the same matrix and conditions.

### **Cell culture.**

ATCC® TIB-202™ THP-1 cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated (56°C for 30 min) foetal bovine serum (PAA laboratory, GE lifesciences), 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin, under standard conditions.

### **LPS stimulations and cytokines production.**

For stimulations,  $5 \times 10^5$  myelomonocytic cells THP-1 were seeded in each well of a 12-well tissue culture-plates (CELLSTAR®, Greinerbio-one, GmbH, Germany) and stimulated with 0, 5, 10, 25, 100 ng/ml LPS. THP-1 cells were stimulated for 6 or 30 hours and TNF- $\alpha$  and IL-6 were measured in cell-free supernatants by ELISA kit (Ready-Set-Go!® human IL-6 and human TNF- $\alpha$ , eBioscience, San diego, CA, USA). The OD of each well was read by using a microplate (96-well Maxisorp Nunc) reader at 450 nm (Multiskan EX, Thermofisher scientific, Waltham, MA, USA).

### **Reactive oxygen species production and caspase 3/7 activation.**

$1 \times 10^6$  THP-1 cells were seeded in 12-well tissue culture-plates and stimulated for 1 or 24 hours with or without LPS (100 ng/ml). Different controls were realized, N-Acetyl-Cystein (10 mmol/L; HIDONAC, Zambon, France), a reactive oxygen species (ROS) taken as a production inhibitor, was incubated for one hour before LPS stimulation. ROS induction was obtained with polymyristate-acetate (PMA, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO USA) at 100 ng/ml incubation for 5 min just before labelling. Caspase 3/7 activation was controlled with PMA incubation at 100 ng/ml for 3 hours before the 24 hours-culture. Shortly, after stimulation, cells were incubated with mouse anti-human monoclonal antibody CD14 PE-Cy5.5® TuK4 (InvitroGen, Carlsbad, CA, USA) for 15 minutes at RT. Cells were resuspended in PBS and labeled for either ROS production (CellRox Green Reagent; Molecular Probes, Life Technology, Carlsbad, CA, USA) or caspase 3/7 activation (CellEvent Caspase3/7 Green detection reagent; Molecular Probes, Life Technology, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer instruction. Cell viability was measured with Live/Dead fixable aqua dead cell stain (Molecular Probes, Life Technology, Eugene, OR, USA). Samples were analyzed with an Attune Acoustic focusing Cytometer (Thermofisher scientific, Germantown, MD, USA). 20.000-30.000 events on CD14+ live cells were counted to measure intensity emission. Data are



analyzed with the Attune Cytometer software v2.1. Data groups were compared two by two with the statistical student's t-Test.

## 5. Results

### **Total fatty-acid composition of the two forms of *V. filiformis* lipid A**

Lipid A fatty acid composition was found to correspond to 3-hydroxydecanoic acid (10:0(3-OH)), and dodecanoic acid (12:0), in the proportions 1.8:1 for the Pellet sample and 1.6:1 for the whole Biomass sample. Taking into account the heterogeneity of these lipid A and the tendency towards underestimation of the short-chain fatty acids, these proportions translated to 2 units of 10:0(3-OH), 1 unit of 12:0 for the main molecular species.

**The anomery of the GlcN-I glycosidic phosphate** was determined to be  $\alpha$  by the kinetics of phosphate release compared to the  $\alpha$ - and  $\beta$ -P anomers of synthetic GlcNAc references. The glucose absolute configuration of D-GlcN was determined by GC-MS compared to L- and D-GlcN reference samples (32).

### **Molecular heterogeneity and distribution of the fatty acids between the two D-glucosamine residues in lipid A from two *V. filiformis* bacterial samples.**

Negative-ion mass-spectra of lipid A isolated from the pellet and the whole Biomass samples are shown in Figure 1A and 1B respectively. They share the major peak of deprotonated  $[M-H]^-$  ions observed at  $m/z$  1544.8. Based on the overall chemical composition, this peak is attributed to a molecular species containing two GlcN, two phosphates, four hydroxydecanoic acids and two dodecanoic acids (theoretical MW= 1545.88). Another common molecular ion observed at  $m/z$  1667.8 would carry an additional PEA residue (+123 u). While its abundance is relatively low for the pellet sample, it represents a major molecular species for the whole Biomass sample. Interestingly, this latter also contains a molecular species with two PEA residues, which is observed at  $m/z$  1791.4. This means that both phosphate groups of the lipid A isolated from the whole Biomass sample can be substituted, and that the level of PEA substitution varies from one batch to another. The pellet sample also displays more heterogeneity due to the presence of a penta-acyl molecular species observed at  $m/z$  1374.9 and containing three 10:0(3-OH) residues and two 12:0 residues. Other peaks observed in the mass-spectra correspond to de-phosphorylated ions whose presence is most probably due to hydrolysis (corresponding molecular species are observed at -80 u, e.g. at  $m/z$  1295.3 and

1465.1) or due to the MS fragmentation process (-98 u, e.g.  $m/z$  1570.1 and 1693.4). In the light of the present data, we named the LPS from the pellet sample: V.f 5-6, to reflect the number of fatty acids in the two main molecular species, and the LPS from the biomass sample : V.f6+2PEA to reflect the number of fatty acids in the main molecular species, combined with PEA.

The negative-ion mass-spectrum of monophosphorylated lipid A from V.f6+2PEA (data not shown) displays a major peak at  $m/z$  1465 and another one at  $m/z$  1587. These peaks correspond to monophosphoryl hexa-acyl lipid A produced by the loss of the glycosyl phosphate or ethanolamine pyrophosphate at the C1 position. In the molecular species observed at  $m/z$  1465, the C4' position is substituted with phosphate, and in the one observed at  $m/z$  1587, it is substituted with ethanolamine pyrophosphate. This result validates the presence of two PEA residues in this lipid A.

A Post-Source-Decay negative-mode experiment performed by MALDI-MS on the ion at  $m/z$  1668 (not shown) gave three main daughter-ion peaks appearing at  $m/z$  1570 (minus 98 u, phosphate) and at  $m/z$  122.9 (PEA) and 98 (phosphate) in the low-mass region. The presence of EA and PEA was also confirmed after hydrolysis, and detection of the soluble released substituents, with an amino acid analyzer, after elution and comparison with standard molecules.

#### **Kinetics of sequential liberation of ester-linked fatty acids from the V.f5-6 lipid A**

The kinetics of lipid A deacylation presented in Figure 2, revealed after 15 min of treatment, the almost complete release of the fatty acid at C-3, according to previous data (26). It corresponded to a 10:0(3-OH), according to the mass difference, which agrees with the fatty acid composition previously determined. It was also linked to the concomitant increase of the penta-acyl molecular species at  $m/z$  1374, with the disappearance of the hexa-acylated molecular species at  $m/z$  1544. After 30 min, the peak at  $m/z$  1374 became a minor one and a molecular species at  $m/z$  1204 appeared, corresponding to a tetra-acyl molecular species. The loss of the two 10:0(3-OH) at C-3 and C-3' was complete at 2h30 min and confirmed by GC/MS. The mass difference also corresponded to the loss of two 10:0(3-OH). This demonstrated that these 10:0(3-OH) were not carrying any other FA on their hydroxyl groups in the native structure. Therefore, the two 12:0 had to be substituting the two remaining 10:0(3-OH) present in amide linkage as shown by

MALDI-MS. The release of secondary 12:0 from C-2 and C-2' positions was much slower, and was not even completed after 5h of treatment. A tri-acylated molecular species corresponding to a peak at  $m/z$  1022 increased progressively along the kinetics, it corresponded to the loss of a branched 12:0. The release of a second branched 12:0 led to a di-acyl molecular species at  $m/z$  840. All data contributed to the design of a symmetrical fatty acid distribution for the two *V. filiformis* lipid A structures. The FA distribution was also confirmed by fragmentation in the positive-ion mode giving a B<sub>1</sub> fragment ion at  $m/z=764$  (not shown) corresponding to GlcN-II, one phosphate, two 10:0(3-OH) and one 12:0 residues (33, 34).

**MALDI-MS analysis of LPS from different bacterial genera.** *Bordetella*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas* and *Rhodopseudomonas* LPS were highly purified for structural and biological comparison with the two *V. filiformis* LPS. SDS-PAGE and TLC profiles of the reference samples used in this work are presented in Figure 3. The predominant lipid A moiety molecular species of these LPS samples are presented in Figure 4.

*E. coli* J5 lipid A structure is composed of the classical hexa-acylated molecular species (35). Two weaker signals corresponding to tetra- and penta-acyl molecular species were observed in this lipid A sample.

*H. influenzae* lipid A is usually not very heterogeneous as described before (36), but the tested sample is composed of a major tetra-, followed by the penta-, tri-, and hexa-acyl molecular species with smaller intensity. Choi and Cox have already described the lipid A heterogeneity for this sample (37).

Frequently, *N. meningitidis* lipid A structures differ from strain to strain by the presence of one or two PEA decorations on the GlcN (38). In our sample, the predominant LPS species possesses 5 FA, and do not display any PEA decoration.

*B. pertussis* 18-323 lipid A structure was shown, in our laboratory, to differ from the vaccine strain *B. pertussis* 1414 lipid A structure by the presence of a 10:0(3-OH) on the C3' instead of a 14:0(3-OH) (39). The two detected major molecular species for *B. pertussis* 1414 are the tetra- and the penta-acylated form, the latter lacking the 14:0(3-OH) at C3'.

*P. aeruginosa* lipid A structure has been described as composed of a bisphosphorylated GlcN disaccharide substituted by two amide-linked 12:0(3-OH), themselves substituted by one 12:0(2-OH) and one 12:0. The

two other FA on the C3 and the C3' are both 10:0(-3OH) (40). When we examined by MALDI-MS the strain at our disposal, the lipid A structure established according to previous studies was essentially composed of the penta-acyl molecular species, the 10:0(3-OH) at C3 being absent. Only small amounts of the hexa-acyl molecular species were detected.

The lipid A structure of the tested *R. gelatinosa* sample was found to be composed of 6 FA including four 10:0(3-OH), one 12:0 and one 12/14:0 as already described (41).

#### **Comparison of IL-6 and TNF- $\alpha$ production after LPS stimulation.**

Although the pro-inflammatory response to stimulation by both *V. filiformis* LPS samples was lower than with *E. coli* J5 LPS. Both batches showed differences in TNF- $\alpha$  and IL-6 responses (Figure 5). Early cytokine production, as displayed by TNF- $\alpha$ , showed that V.f5-6 reaches a plateau at lower concentration (5 ng/ml) than V.f6+2PEA (25 ng/ml). In addition, late IL-6 production was measurable for V.f5 at 30 h but not for V.f6+2PEA. In our experiment, *E. coli* J5 LPS showed the stronger IL-6 and TNF- $\alpha$  responses whereas *H. influenzae*, *B. pertussis* 18-323, *R. gelatinosa*, and *N. meningitidis* LPS did not induce any cytokine production. *B. pertussis* 1414 and *P. aeruginosa* displayed an intermediate TNF- $\alpha$  and IL-6 response.

#### **Caspase 3/7 activation and ROS production.**

In order to better characterize the cellular response to *V. filiformis* LPS stimulation, ROS production and caspase 3/7 activation were compared to those of *E. coli* J5 LPS. No difference in cell viability was observed after *E. coli* J5, or both *V. filiformis* LPS stimulations (Figure 6A). Caspase 3/7 activation was evaluated at 0, 1, 12, 24, 48 h after stimulation and for the ROS induction at 0, 0.5, 1, 2, 12, 24, 48 h (data not shown). Significant caspase 3/7 activation occurred after 12 h of LPS stimulation reaching a plateau after 24 h. No difference in caspase 3/7 activation was found between *E. coli* J5 and *V. filiformis* LPS stimulations (Figure 6B). ROS production started as early as 30 minutes, reaching a plateau after 1 h of LPS stimulation. No significant difference in ROS production was found after *E. coli* J5 or *V. filiformis* LPS stimulations (Figure 6C).

## 6. Discussion.

We describe here, for the first time, the structure of *V. filiformis* lipid A. This was important in order to understand the previously described remarkable skin activation capacities of this molecule in the bacterial lysate (42). We characterized two different batches, and found some differences. This structural variability in *V. filiformis* batches induces significant differences in some of the tested biological responses, stressing the necessity of controlling the fine structures in each LPS sample used for structure to activity relationship studies.

LPS and lipid A biosynthesis were remarkably well described for *E.coli* by CRH Raetz and colleagues (43). The conserved process leads to the synthesis of whole LPS molecules. In the lipid A moiety, the “decorations” on the phosphate groups, or the heterogeneity in the number of FA, are due to post-translational modifications. The details of the structures are crucial for the recognition of the whole structure by the MD-2/TLR4 complex, hence for the induction of biological activities (4). The standard LPS samples presented in this work in comparison with the two *V. filiformis* LPS displayed various examples of these modifications.

After characterization of the different standard LPS structures, corresponding as expected, to molecules with short-chain fatty acids, like 10:0(3-OH) and 12:0, we compared their cell activation capacities by TNF- $\alpha$  production, IL-6 production, and ROS induction; the cytotoxicity was illustrated by caspase 3/7 activation. We also compared these activations to those of a J5 *Escherichia coli* LPS sample, a strong inflammatory inducer, involving all the characteristics for a good receptor recognition, and also selected for similarity in its molecular weight. Effectively, the size of the LPS molecular species is rarely taken into account in such comparisons. However, LPS molecular weights vary from 2 to 20 kDa, therefore it is obvious that their biologically active moieties (*i.e.* lipids A) correspond to almost 70% of deep-Rough type LPS, 50% of LOS, and only 10 to 20% of long-chain Smooth-type LPS. In addition, the LPS solubility and state of aggregation vary considerably from one type to the other.

We thus compared the production of two cytokines stimulated by the two *Vitreoscilla* LPS batches, with different known LPS samples originating from *Bordetella*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas* and *Rhodopseudomonas* genera. All of them, except for *Pseudomonas*, corresponded to R-type LPS or LOS as shown in Fig. 3. Observed differences resulted in the lack of one or two FA or phosphate substitutions compared to published data, this was expected to induce differences in the MD-2/TLR4 activation and in cytokine production (2).

According to the structure and previously described biological data, we thus found that two of our samples, those isolated from *Neisseria* and *Haemophilus* behaved as poor cytokine inducers, although they should not, according to their well-known described lipid A structure (37, 44). We then showed by MALDI-MS that these *Neisseria* and *Haemophilus* samples, usually described as displaying major hexa-acyl molecular species, were in the present case, respectively penta- and tri/tetra-acylated. The hypo-acylation of these samples explains their relative weak activity compared to *E. coli* J5 LPS. One of the best illustrated examples of structure to activity relationships, related to the low number and short length of FA carbon chains, is that of *B. pertussis*, displaying mixtures of tetra- and penta-acyl molecular lipid A species. This example has been extensively studied (20, 39, 45) and compared to standard LPS as well as to closely related structures differing by only two carbons in a single FA at C-3', or the presence of GlcN on both phosphate groups. Both *B. pertussis* lipids A were hypo-acylated with tetra- and penta-acyl molecular species. Interestingly, *R. gelatinosa* LPS did not induce any inflammatory responses whereas it was previously described as being highly pyrogenic in rabbit, and lethal for mice (46). *R. gelatinosa* LPS contains short-chain FA: four 10:0(3-OH), one 12:0 and one 12/14:0. This type of lipid A structure, as shown with the many other examples of short-chain and hypo-acylated molecules, are not expected to induce high levels of inflammation (20). Several *P. aeruginosa* LPS differing by their origin (biofilm, planktonic, cystic fibrosis, bronchiectasis) were studied by ourselves and others (47, 48). In this work, *P. aeruginosa* forms of LPS induced an intermediate level of TNF- $\alpha$  and IL-6 secretions by THP-1 cells although the penta-acyl lipid A form was predominant. The latter was already described for inducing low levels of TNF- $\alpha$  in THP-1 with a good activation of TLR4 (49). When we compared the TNF- $\alpha$  and IL-6 activities of the two *V. filiformis* forms of

LPS, we observed major differences: a lower TNF- $\alpha$  dose-response and no late cytokine production for V.f6+2PEA compared to V.f5-6. These results suggest that the addition of PEA significantly modifies cytokine production by host cell, and formation of the LPS MD-2/TLR4 complex. Nevertheless, cytokine production is lower than the one observed after *E. coli* LPS stimulation. Moderate cytokine production by both *V. filiformis* LPS forms is however not negligible, explaining their capacity to contribute to the effects described on skin, and the induction of the innate immune response that is necessary for setting up the adaptive immune response.

In addition to cytokines production, comparative effects of *V. filiformis* and *E. coli* LPS on myeloid ROS production, cell viability and induction of apoptosis were tested. No significant difference was observed in this case between the different LPS. ROS is a useful mechanism for phagocytes to eliminate pathogens by killing the intracellular bacteria and is an essential element in the activation of the innate immune response via TLR and NF $\kappa$ B (50). Caspase activation is known to regulate cell viability and apoptosis. This is associated with the known effect of *V. filiformis* LPS in inducing co-stimulatory effectors and production of antimicrobial peptides (12, 13, 16) that promote efficient antimicrobial effects with a limited pro-inflammatory cytokine response.

In summary, we established the detailed structure of two batches of *V. filiformis* lipids A, one of the active contributors of the bacterial lysate used to treat atopic dermatitis. These structures mostly composed of short-chain fatty acids, and PEA can substitute the phosphate groups. The two bacterial samples corresponded to two different LPS extraction ways, which by itself, could explain the observed structural differences in the number of fatty acids, but also the presence of two PEA derivatives linked to the phosphate groups. By experience, we can anticipate that the latter is more soluble than the non-substituted one, not only because PEA adds some natural solubility in water, but also because substituting the phosphate groups prevents LPS aggregation through bivalent cation capture by these phosphates. Therefore, it is not surprising that such molecular species could be solubilized and lost in the supernatant of the growth medium during the centrifugation process separating bacterial cells and solubilized free LPS molecules in the growth



medium used in the usual LPS purification steps. In the other sample, the non-PEA substituted lipid A remained in the pellet. It is very interesting to give this additional example of the loss of natural LPS molecular species during LPS purification steps leading, in this peculiar example, to the biological differences observed between the two samples. Then, we compared their biological activities to standard LPS, whose structures were characterized in this work. Differences in cytokines production were observed between both *V. filiformis* LPS compared to standard LPS. The moderate cytokines release matches with the described structures of both *V. filiformis* lipids A displaying short-chain FA. However, neither caspase 3/7 activation nor ROS production differences, compared to *E. coli* J5 LPS appeared, confirming the maintained antimicrobial effects induced by *V. filiformis* LPS with limited pro-inflammatory cytokines production.

## 7. **Acknowledgments / grant support**

Aude Breton is a recipient of a CIFRE doctoral grant. We thank Pr Jean-Marc Cavaillon and Catherine Fitting for their help in preparing the cytokine experiments and Dr Ian-Barry Holland for his kind help in editing the manuscript.

## 8. References

1. Rietschel, E. T., T. Kirikae, F. U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A. J. Ulmer, U. Zähringer, U. Seydel, and F. Di Padova. 1994. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* **8**: 217–25.
2. Maeshima, N., and R. C. Fernandez. 2013. Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**: 1–13.
3. Martich, G. D., J. Boujoukos, and F. Suffredini. 1993. Response of man to endotoxin. *Immunobiology.* **187**: 403–416.
4. Park, B. S., D. H. Song, H. M. Kim, B.-S. Choi, H. Lee, and J.-O. Lee. 2009. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature.* **458**: 1191–5.
5. Tissières, P., and J. Pugin. 2009. The role of MD-2 in the opsonophagocytosis of Gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **22**: 286–291.
6. Drifte, G., I. Dunn- Siegrist, P. Tissières, and J. Pugin. 2013. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit. Care Med.* **41**: 820–832.
7. Pringsheim, E. G. 1951. The Vitreoscillaceae: A Family of Colourless, Gliding, Filamentous Organisms. *J. Gen. Microbiol.* **5**: 124–149.
8. Cohn, F. 1870. über den Brunnenfaden (*Crmothrix polyspora*), nebst Bemerkungen über die mikroskopische Analyse des Brunnenwassers. *Beitr. Biol.* **1**: 108.
9. Webster, D. A., and D. P. Hackett. 1966. The Purification and Properties of Cytochrome *o* from *Vitreoscilla*. *J. Biol. Chem.* **241**: 3308–3315.
10. Gueniche, A., and L. Breton. 2004. Utilisation d'une fraction de lipopolysaccharides de bactérie filamenteuse non-fructifiante non-photosynthétique comme agent immunorégulateur cutané. FR

Patent 2879461.

11. Pineau, N., R. Martin, L. Breton, and L. Aubert. 2001. Cosmetic/pharmaceutical compositions comprising microorganism culture media. US Patent 62422295(B1).
12. Mahe, Y. F., and R. Martin. 2008. Use of a vitreoscilla filiformis lipopolysaccharide fraction as an agent for stimulating the synthesis of anti-microbial skin peptides. EP Patent 1974720(A1).
13. Mahe, Y. F., M. J. Perez, C. Tacheau, C. Fanchon, R. Martin, F. Rousset, and S. Seite. 2013. A new Vitreoscilla filiformis extract grown on spa water-enriched medium activates endogenous cutaneous antioxidant and antimicrobial defenses through a potential Toll-like receptor 2/protein kinase C, zeta transduction pathway. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **6**: 191–196.
14. Mahe, Y. F., R. Martin, L. Aubert, N. Billoni, C. Collin, F. Pruche, P. Bastien, S. S. Drost, A. T. Lane, and A. Meybeck. 2006. Induction of the skin endogenous protective mitochondrial MnSOD by Vitreoscilla filiformis extract. *Int. J. Cosmet. Sci.* **28**: 277–287.
15. Volz, T., Y. Skabytska, E. Guenova, K.-M. Chen, J.-S. Frick, C. J. Kirschning, S. Kaesler, M. Röcken, and T. Biedermann. 2014. Nonpathogenic bacteria alleviating atopic dermatitis inflammation induce IL-10-producing dendritic cells and regulatory Tr1 cells. *J. Invest. Dermatol.* **134**: 96–104.
16. Martin, R. 2005. Lipid A -type compound and composition containing It. US2005/0118118 (A1). 1–10.
17. Nakatsuji, T., and R. L. Gallo. 2014. Dermatological therapy by topical application of non-pathogenic bacteria. *J. Invest. Dermatol.* **134**: 11–4.
18. Martin, R., and P. Hilaire. 2010. Preparation of cosmetic active pinciples by culturing Vitreoscilla on thermal water and compositions comprising them. EP Patent 2144995.
19. Tirsoaga, A., A. Novikov, M. Adib-Conquy, C. Werts, C. Fitting, J. M. Cavaillon, and M. Caroff. 2007. Simple method for repurification of endotoxins for biological use. *Appl. Environ. Microbiol.*

73: 1803–1808.

20. Marr, N., A. Novikov, A. M. Hajjar, M. Caroff, and R. C. Fernandez. 2010. Variability in the lipooligosaccharide structure and endotoxicity among *Bordetella pertussis* strains. *J. Infect. Dis.* **202**: 1897–906.
21. Caroff, M. 2004. Novel method for isolating endotoxins. WO Patent 2004/062690 A1.
22. Tirsoaga, A., A. El Hamidi, M. Perry, M. Caroff, and A. Novikov. 2007. A rapid, small-scale procedure for the structural characterization of lipid A applied to *Citrobacter* and *Bordetella* strains: discovery of a new structural element. *J. Lipid Res.* **48**: 2419–27.
23. Chafchaoui-Moussaoui, I., A. Novikov, F. Bhrada, M. B. Perry, A. Filali-Maltouf, and M. Caroff. 2011. A new rapid and micro-scale hydrolysis, using triethylamine citrate, for lipopolysaccharide characterization by mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **25**: 2043–2048.
24. El Hamidi, A., A. Tirsoaga, A. Novikov, A. Hussein, and M. Caroff. 2005. Microextraction of bacterial lipid A: easy and rapid method for mass spectrometric characterization. *J Lipid Res.* **46**: 1773–1778.
25. El Hamidi, A., A. Novikov, D. Karibian, M. B. Perry, and M. Caroff. 2009. Structural characterization of *Bordetella parapertussis* lipid A. *J. Lipid Res.* **50**: 854–859.
26. Caroff, M., and A. Novikov. 2011. In *Methods in molecular biology Microbial Toxins*. Springer protocols (Holst, O., ed.). pp. 135–146.
27. Wollenweber, H. W., and E. T. Rietschel. 1990. Analysis of lipopolysaccharide (lipid A) fatty acids. *J. Microbiol. Methods.* **11**: 195–211.
28. Basheer, S. M., N. Guiso, A. Tirsoaga, M. Caroff, and A. Novikov. 2011. Structural modifications occurring in lipid A of *Bordetella bronchiseptica* clinical isolates as demonstrated by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass*

*Spectrom.* **25**: 1075–81.

29. Caroff, M., and D. Karibian. 1990. Several uses for isobutyric acid-ammonium hydroxide solvent in endotoxin analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1957–1959.
30. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680–685.
31. Tsai, C. M., and C. E. Frasch. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **119**: 115–119.
32. Caroff, M., A. Tacken, and L. Szabo. 1988. Detergent-accelerated hydrolysis of bacterial endotoxins and determination of the anomeric configuration of the glycosyl phosphate present in the “isolated lipid A” fragment of the *Bordetella pertussis* endotoxin. *Carbohydr Res.* **175**: 273–282.
33. Karibian, D., A. Brunelle, L. Aussel, and M. Caroff. 1999. 252Cf-plasma desorption mass spectrometry of unmodified lipid A: fragmentation patterns and localization of fatty acids. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **13**: 2252–2259.
34. Que, N. L. S., S. Lin, R. J. Cotter, and C. R. H. Raetz. 2000. Purification and mass spectrometry of six lipid A species from the bacterial endosymbiont *Rhizobium etli*: Demonstration of a conserved distal unit and a variable proximal portion. *J. Biol. Chem.* **275**: 28006–28016.
35. Heine, H., E. T. Rietschel, and A. J. Ulmer. 2001. The biology of endotoxin. *Mol Biotechnol.* **19**: 279–296.
36. Karibian, D., C. Deprun, L. Szabo, Y. Le Le Beyec, and M. Caroff. 1991. 252Cf-plasma desorption mass spectrometry applied to the analysis of endotoxin Lipid A preparations. 273–286.
37. Choi, J., A. D. Cox, J. Li, W. McCready, and M. Ulanova. 2014. Activation of innate immune responses by *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharide. *Clin. Vaccine Immunol.* **21**: 769–76.
38. Cox, A. D., J. C. Wright, J. Li, D. W. Hood, E. R. Moxon, and J. C. Richards. 2003. Phosphorylation

- of the lipid A region of meningococcal lipopolysaccharide: Identification of a family of transferases that add phosphoethanolamine to lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* **185**: 3270–3277.
39. Shah, N. R., S. Albitar-Nehme, E. Kim, N. Marr, A. Novikov, M. Caroff, and R. C. Fernandez. 2013. Minor modifications to the phosphate groups and the C3' acyl chain length of lipid A in two *Bordetella pertussis* strains, BP338 and 18-323, independently affect Toll-like receptor 4 protein activation. *J. Biol. Chem.* **288**: 11751–60.
40. Bhat, R., A. Marx, C. Galanos, and R. S. Conrad. 1990. Structural Studies of Lipid A from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 : Occurrence of 4-Amino-4-Deoxyarabinose. *J. Bacteriol.* **172**: 6631–6636.
41. Masoud, H., L. Buko, J. Weckesser, and H. Mayer. 1990. The Structure of the Lipid A Component of *Rhodocyclus gelatinosus* Dr2 Lipopolysaccharide. *Syst. Appl. Microbiol.* **13**: 227–233.
42. Gueniche, A., B. Knaudt, E. Schuck, T. Volz, P. Bastien, R. Martin, M. Röcken, L. Breton, and T. Biedermann. 2008. Effects of nonpathogenic gram-negative bacterium *Vitreoscilla filiformis* lysate on atopic dermatitis: A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *Br. J. Dermatol.* **159**: 1357–1363.
43. Raetz, C. R. H., and C. Whitfield. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 635–700.
44. Zughaier, S. M., Y. Tzeng, S. M. Zimmer, R. W. Carlson, D. S. Stephens, and A. Datta. 2004. *Neisseria meningitidis* Lipooligosaccharide Structure-Dependent Activation of the Macrophage CD14 / Toll-Like Receptor 4 Pathway. *Infect. Immun.* **72**: 371–380.
45. Marr, N., A. Tirsoaga, D. Blanot, R. Fernandez, and M. Caroff. 2008. Glucosamine found as a substituent of both phosphate groups in *Bordetella* lipid A backbones: role of a BvgAS-activated ArnT ortholog. *J. Bacteriol.* **190**: 4281–4290.

46. Galanos, G., J. Roppel, J. Weckesser, E. T. Rietschel, and H. Mayer. 1977. Biological Activities of Lipopolysaccharides and Lipid A from Rhodospirillaceae. *Infect. Immun.* **16**: 407–412.
47. Bedoux, G., K. Vallee-Rehel, O. Kooistra, U. Zahringer, and D. Haras. 2004. Lipid A components from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (serotype O5) and mutant strains investigated by electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* **39**: 505–513.
48. Ciornei, C. D., A. Novikov, C. Beloin, C. Fitting, M. Caroff, J. M. Ghigo, J. M. Cavaillon, and M. Adib-Conquy. 2010. Biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* bacteria undergo lipopolysaccharide structural modifications and induce enhanced inflammatory cytokine response in human monocytes. *Innate Immun.* **16**: 288–301.
49. Hajjar, A. M., R. K. Ernst, J. H. Tsai, C. B. Wilson, and S. I. Miller. 2002. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat. Immunol.* **3**: 354–359.
50. Park, H. S., H. Y. Jung, E. Y. Park, J. Kim, W. J. Lee, and Y. S. Bae. 2004. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J. Immunol.* **173**: 3589–3593.



## 9. Figures

Figure 1.

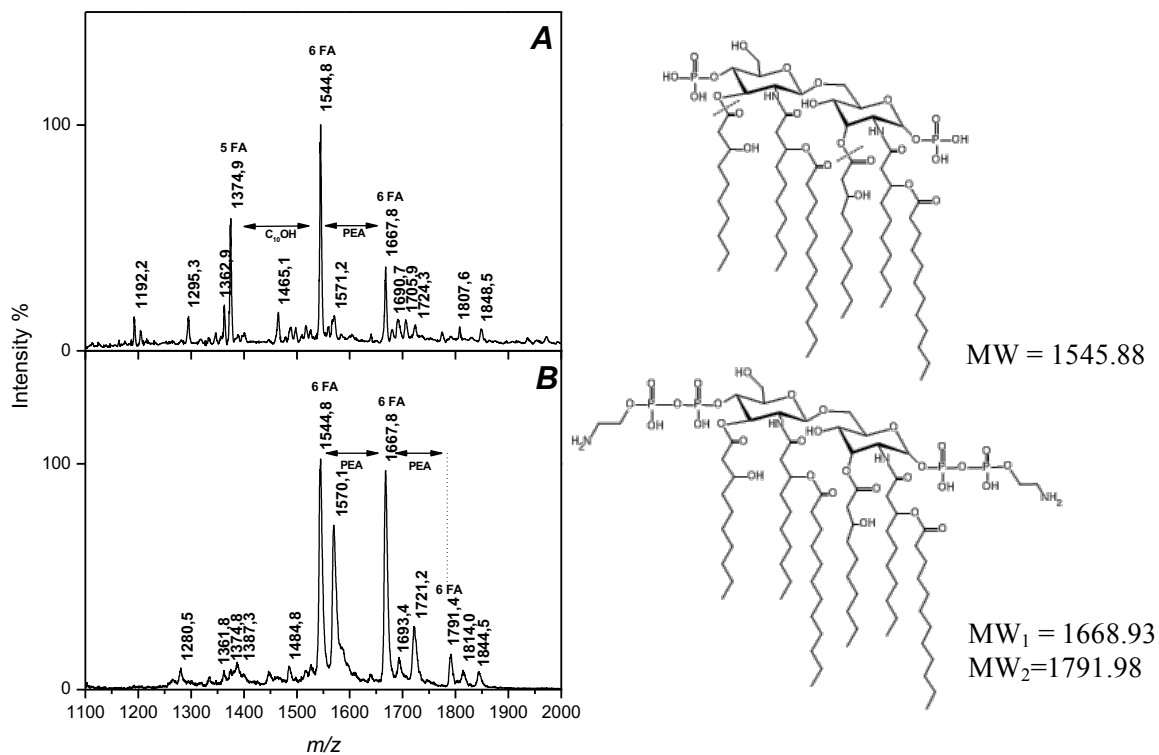
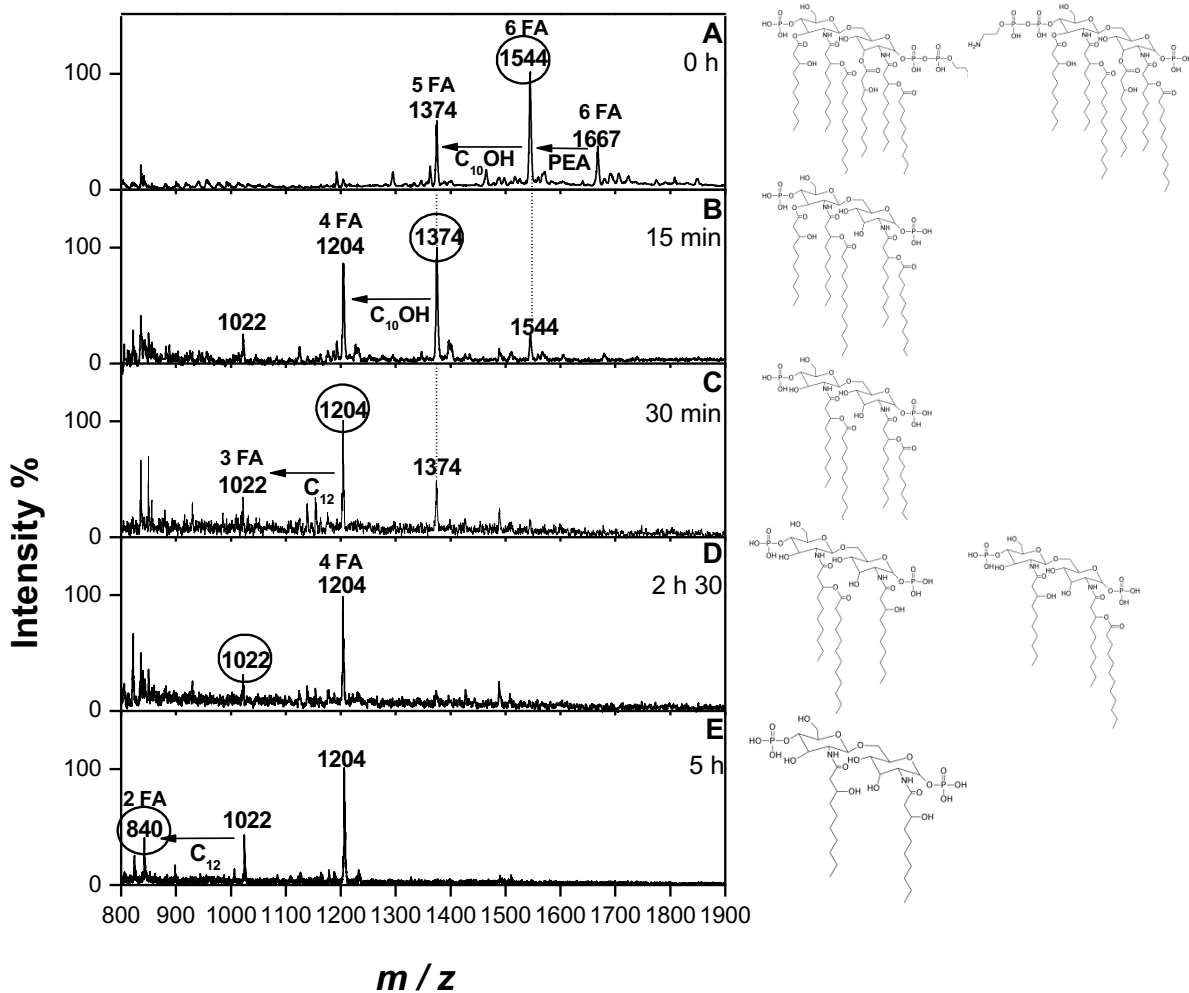


Figure 1. Negative-ion MALDI-TOF mass spectrometry of the lipid A moieties of the two *Vitreoscilla filiformis* LPS samples obtained after SDS promoted pH 4.5 hydrolysis.

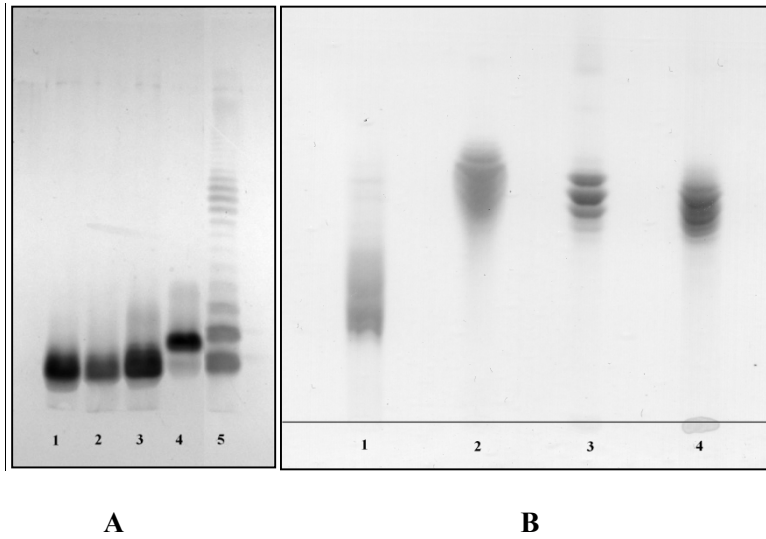
A) *Vitreoscilla filiformis* lipid A isolated from the pellet sample (V.f5-6); B) *Vitreoscilla filiformis* lipid A isolated from the biomass sample (V.f6+2PEA).

**Figure 2.**



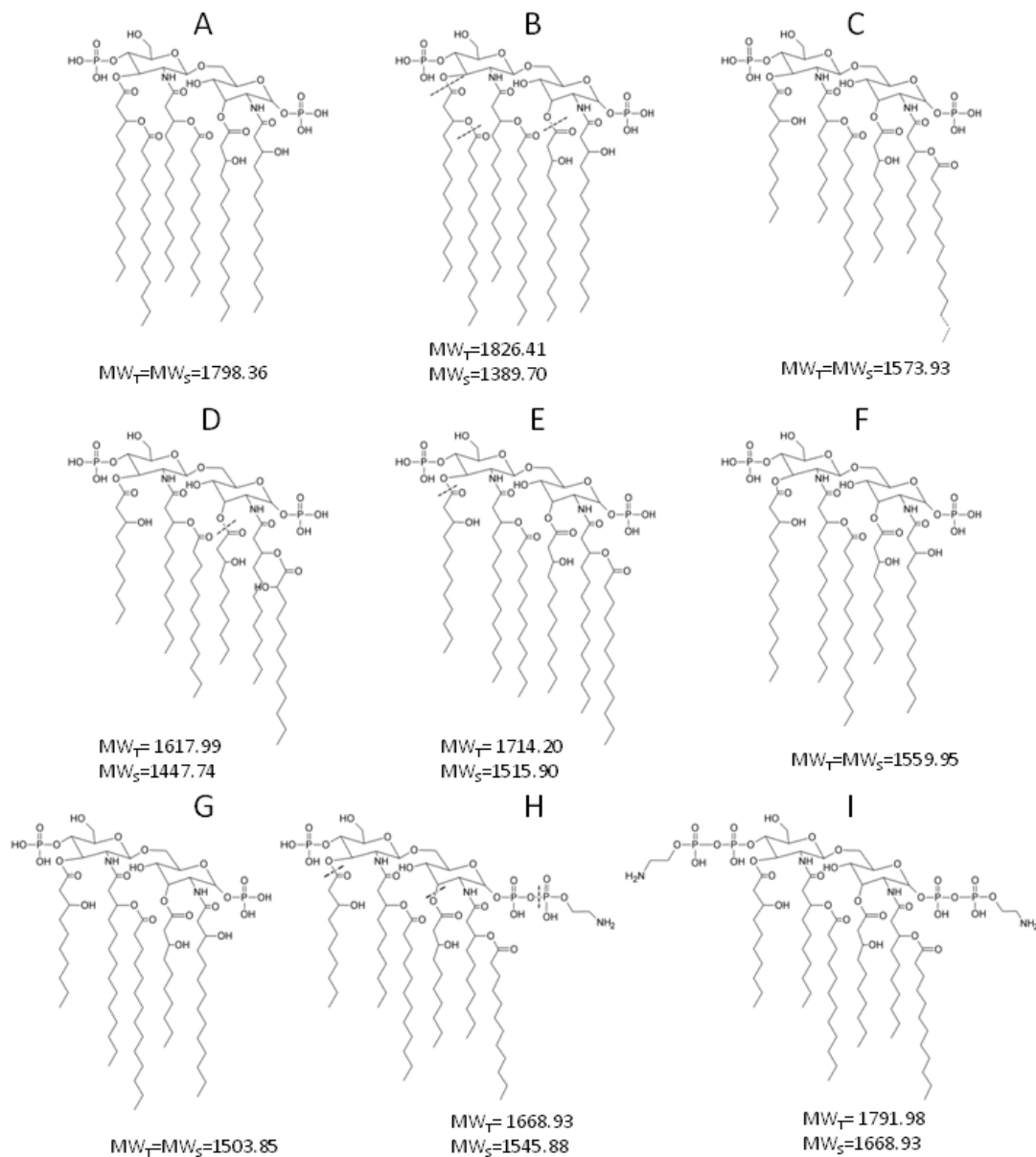
**Figure 2. Monitoring of the fatty acid release from the lipid A, by negative-ion MALDI-TOF mass spectrometry during alkaline hydrolysis, and corresponding structures. Example of *V.f5-6*. A) Before hydrolysis, C) D) E) respectively 15 min, 30 min, 2h30, 5h after hydrolysis. The structures presented in this Figure correspond to the marked masses appearing in the spectra.**

**Figure 3.**



**Figure 3. Analyses of purified LPS from the two *Vitreoscilla filiformis* samples compared to LPS standards by SDS-PAGE (A) and HPTLC (B).** (A) 1- *Escherichia coli* J5 LPS, 2- *Vitreoscilla filiformis* V.f5-6 LPS, 3- *Vitreoscilla filiformis* V.f6+2PEA LPS, 4- *Bordetella pertussis* 1414 LPS, 5- *Pseudomonas aeruginosa* serotype O6 LPS. 0.1  $\mu\text{g}$  of each LPS were loaded per well for the SDS-PAGE electrophoresis. (B) 1-*Bordetella pertussis* 1414 LPS, 2-*Escherichia coli* J5, 3-*Vitreoscilla filiformis* V.f5-6, 4-*Vitreoscilla filiformis* V.f6+2PEA. 20  $\mu\text{g}$  were deposited for HPTLC migration.

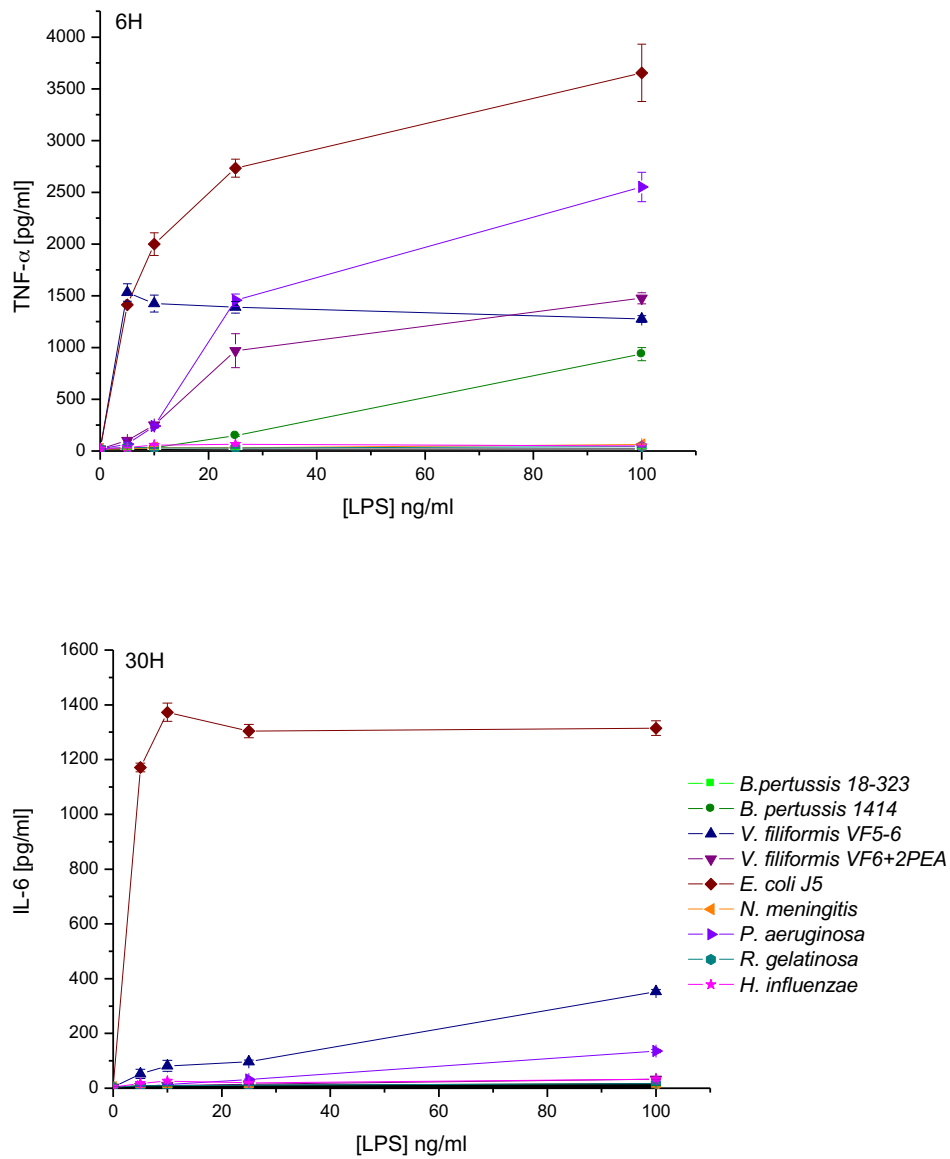
**Figure 4.**



**Figure 4. Lipid A structures of the major molecular species present in the purified LPS samples.**

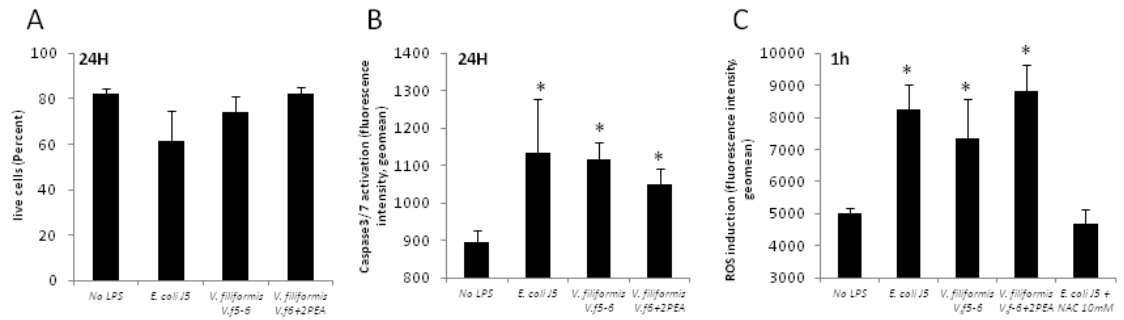
The structures presented with the corresponding MW<sub>T</sub> given masses correspond to published data for all LPS. The dotted lines indicate elements missing in the structures for each LPS sample used in this paper and corresponding to MW<sub>S</sub>. A) *E. coli* J5; B) *H. influenzae*; C) *R. gelatinosa*; D) *P. aeruginosa*; E) *N. meningitidis*; F) *B. pertussis* 1414; G) *B. pertussis* 18-323; H) *Vitreoscilla filiformis* V.f5-6; I) *Vitreoscilla filiformis* V.f6+2PEA.

**Figure 5.**



**Figure 5. THP-1 cells pro-inflammatory response to LPS stimulation.** IL-6 and TNF- $\alpha$  production following LPS dose response stimulation on THP-1 cells. The results presented on the figure are representative of three independent experiments, and were realized in triplicate. Results are expressed as means  $\pm$  SEM.

**Figure 6.**



**Figure 6. ROS production and caspase 3/7 activation induced by LPS stimulation.** (A) Cell viability and (B) Caspase 3/7 activation was assessed after 24 hours THP-1 stimulation. (C) ROS production by THP-1 cells after 1 hour stimulation. N-acetyl-cysteine was used to inhibit ROS production in *E.coli* J5 stimulation. \*p-value <0.05 to “no LPS”.

**2) Article n°4: Structural and biological characteristics of *Vitreoscilla filiformis* lipids A: Use of mass spectrometry to highlight structural discrepancies**

Aude Breton<sup>1,2</sup>, Alexey Novikov<sup>2</sup>, Richard Martin<sup>3</sup>, Pierre Tissieres<sup>1,4</sup> and Martine Caroff<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France*

<sup>2</sup>*LPS-BioSciences, Bât. 409, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France*

<sup>3</sup>*L'Oréal, Centre de Recherches Biotechnologiques, 37390 Tours, France*

<sup>4</sup>*Pediatric and Neonatal Intensive Care, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France*

\* Corresponding author

Tel. +33 1 69 15 71 91

E-mail: martine.caroff@u-psud.fr

Running title: *Vitreoscilla filiformis*, lipid A structures and activities

Submitted at Journal of Lipid Research – Online - Janvier 2017.

### **3) Résultats complémentaires**

Les expériences nécessaires à la mise au point des résultats sont détaillées ci-après. Elles n'ont pas été reprises dans l'article, mais nous semblent d'intérêt.

#### **a) Analyse structurale des LPS standards**

Des LPS standards ont été extraits et purifiés ou re-purifiés à partir de LPS et de bactéries disponibles dans le laboratoire. Ces derniers ont été sélectionnés pour leurs structures de lipides A décrites dans la littérature et intéressantes à comparer avec celles des lipides A de *V. filiformis*. Les LPS utilisés sont ceux de : *Escherichia coli* J5 ; *Bordetella pertussis* 1414 ; *Bordetella pertussis* 18-323 ; *Rhodopseudomonas gelatinosa* ; *Haemophilus influenzae* EAGAN ; *Neisseria meningitidis* et *Pseudomonas aeruginosa*. A part, les LPS de *P. aeruginosa*, ces LPS sont courts et de tailles proches de ceux des LPS de *V. filiformis*. Certains ont des acides gras (AG) courts tout comme *V. filiformis*. C'est le cas des LPS de *R. gelatinosa*, des LPS de *B. pertussis* 18-323 et des LPS longs de *P. aeruginosa*. Enfin les lipides A de *R. gelatinosa*, *N. meningitidis* et *P. aeruginosa* ont une distribution d'AG symétrique comme ceux de *V. filiformis*.

Comme décrit dans le chapitre de livre inséré à la fin du « matériels et méthodes », nous ne pouvons ne pas nous référer à la littérature pour connaître une structure de lipide A. Ces dernières sont très variables en fonction des conditions de culture. Ceci entraîne généralement des incompréhensions dans la compréhension de data présentées par différentes équipes. Dans ce chapitre, les analyses par MS MALDI-TOF ont aussi montré des différences de structures de nos échantillons par rapport à la littérature (Figure 37). La déphosphorylation (-80u) est observée lors du traitement TEA-CA mais n'est pas présente sur les spectres des LPS entiers. La position de la perte d'un acide gras qui n'est pas directement appréciable, comme pour le cas des acides gras symétriques par exemple, a été déterminée par fragmentation en mode positif des LPS. On observe



les pics correspondant à la GlcNII avec ses acides gras. En fonction de l'absence ou de la présence de pics aux masses ciblées, nous avons déterminé la position l'acide gras perdu.

Pour *E. coli* J5, la forme hexa-acylée est dominante, bien que des LPS penta- et tetra-acylés soient présents en mélange. Ces LPS donnent une réponse importante en termes de cytokines après stimulation des cellules et peuvent être utilisés comme standard fortement inducteur. Pour *B. pertussis* 1414, les formes majoritaires sont les LPS penta-acylés, mais des LPS tetra-acylés sont également présents dans l'échantillon.

Pour *P. aeruginosa* les formes à 5 AG sont plus représentées que celles à 6 AG. Néanmoins, les deux possèdent une hétérogénéité au niveau de la présence de la fonction hydroxyle sur l'AG positionné en C2 de la GlcN I.

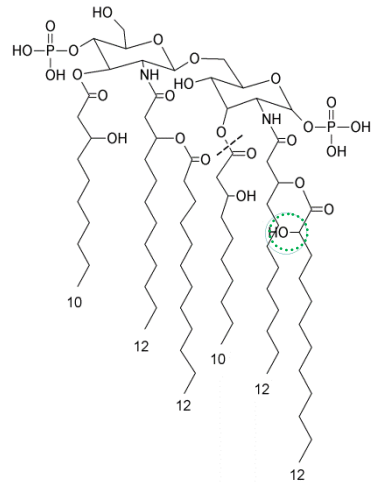
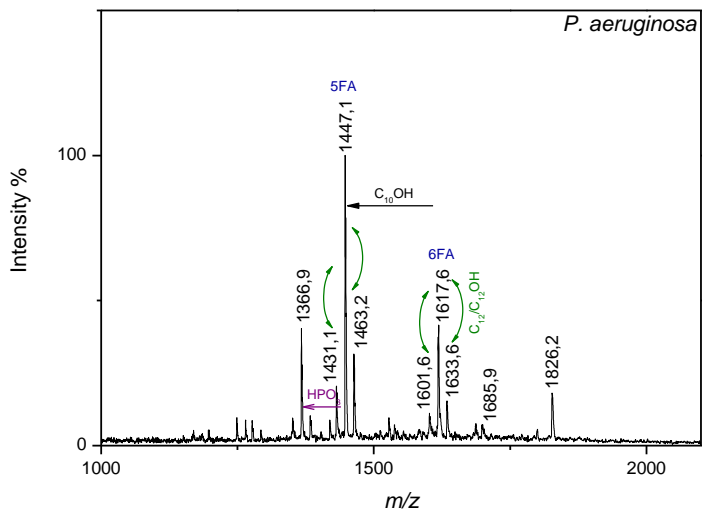
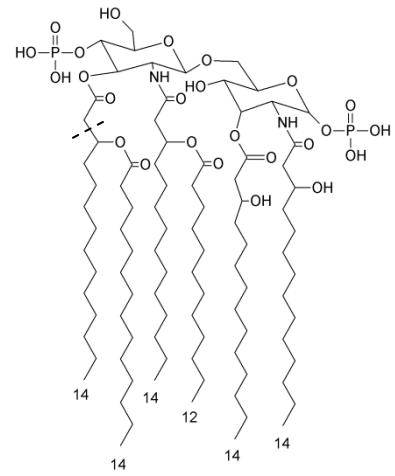
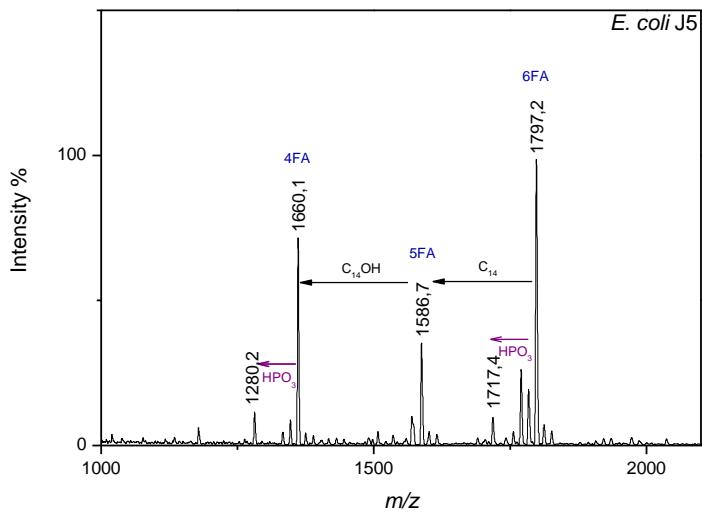
Pour *B. Pertussis* 18-323, l'échantillon utilisé est le même que décrit dans les publication de l'équipe (Shah et al. 2013). Il est penta-acylé avec un 10 :0(3-OH) en C3' et non un 14 :0(3-OH) comme c'est le cas pour *B. pertussis* 1414.

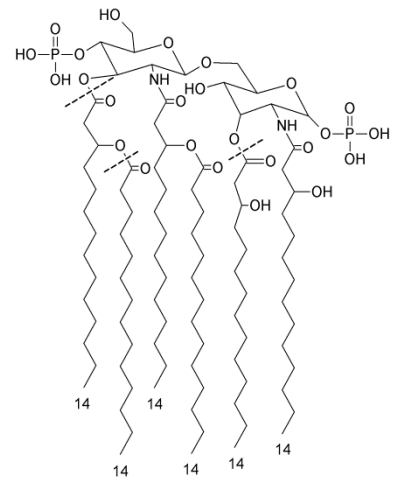
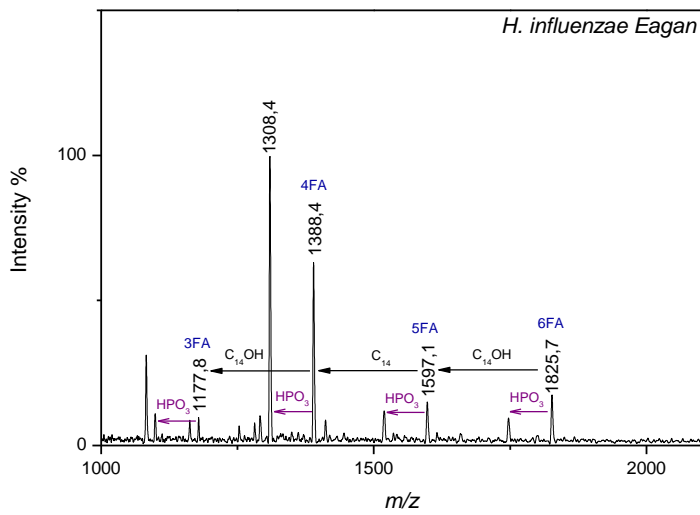
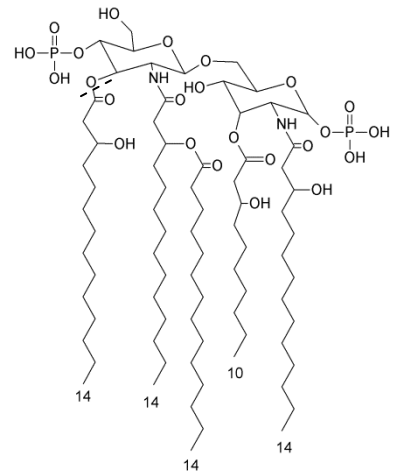
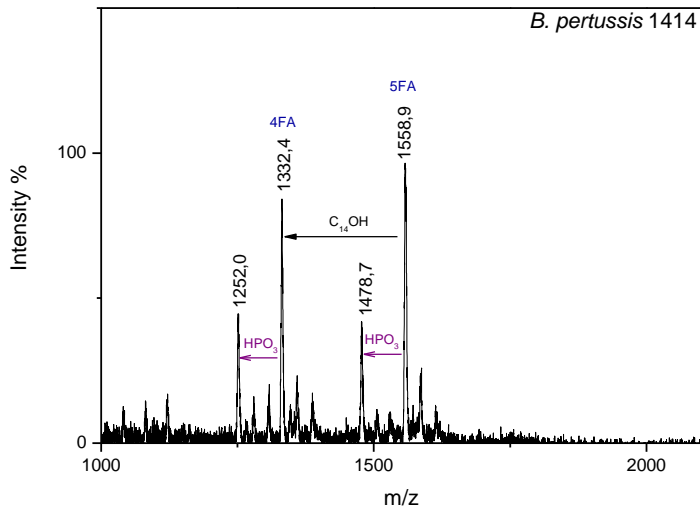
Pour *H. influenzae* Eagan, il y a très peu de LPS hexa-acylés, les formes à 3, 4, et 5 AG sont majoritairement représentées avec une majorité de molécules tetra-acylés.

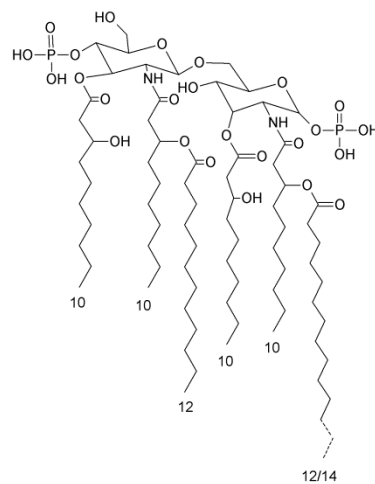
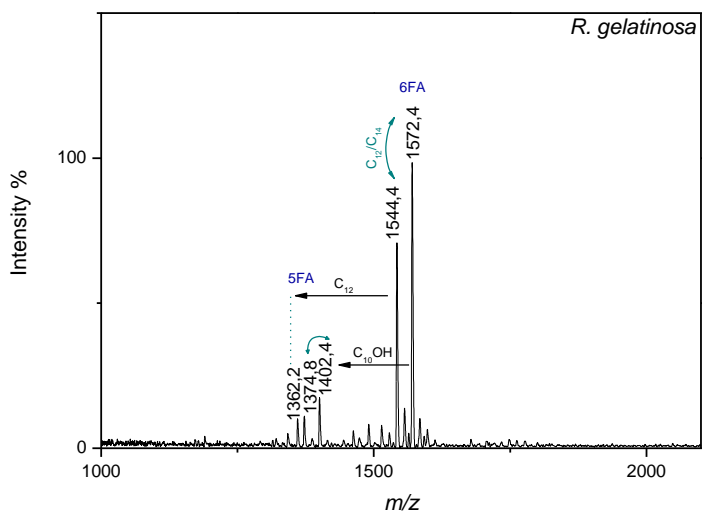
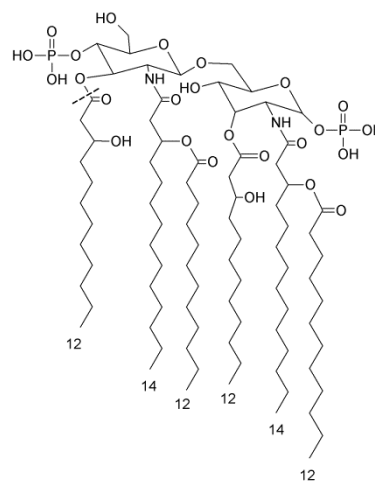
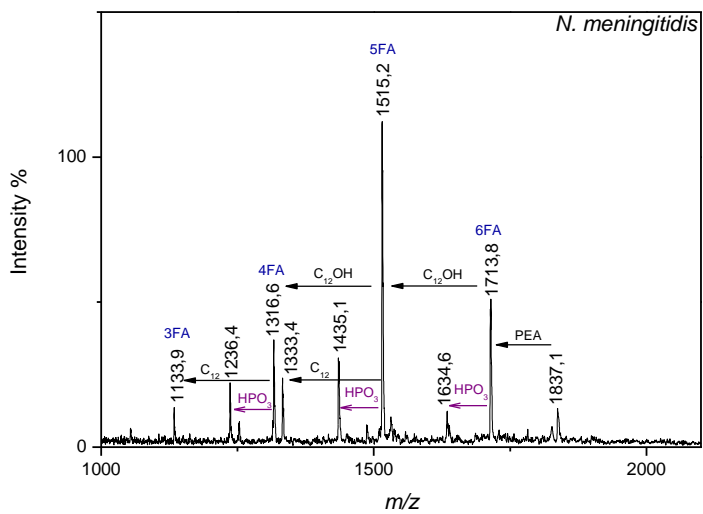
Pour *N. meningitis*, nous détectons une substitution avec de la PEA comme décrit précédemment (Cox et al. 2003) mais seulement pour les formes hexa-acylés et en très faible quantité. Des LPS tri-, tetra- et penta-acylés sont présentes mais les espèces moléculaires majoritaires comportent 5 AG et ne sont pas substituées par la PEA.

Pour *R. gelatinosa*, les LPS hexa-acylés sont quasiment les seuls présents dans l'échantillon.

Les résultats de ces analyses montrent à quel point les contrôles des structures des échantillons utilisés en biologie sont incontournables et trop souvent négligés.





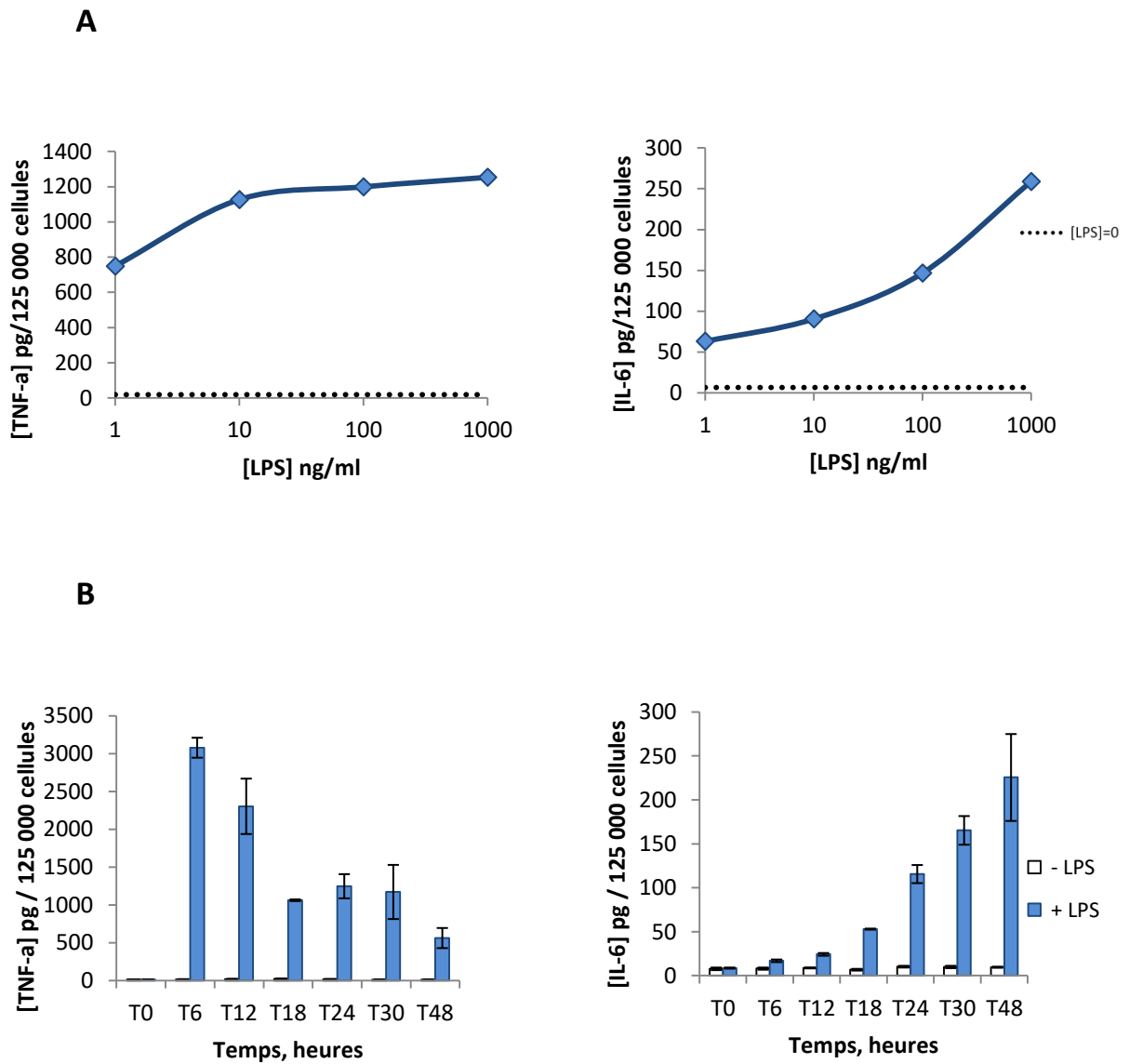


**Figure 37 : Spectres MALDI-TOF en mode linéaire négatif des lipides A obtenus après hydrolyse TEA-CA des LPS.**  
 FA-Acides Gras ; PEA-PhosphoEthanolAmine ; C<sub>12</sub>C<sub>14</sub>-Variation de la longueur d'une chaîne d'acide gras entre 12 et 14 C ; C<sub>12</sub>/C<sub>12</sub>OH-Variation de la substitution par un -OH d'une chaîne d'acide gras à 12 C.

## ***b) Dosages de deux cytokines pro-inflammatoires : TNF- $\alpha$ et IL-6***

La lignée myélomonocytaire THP-1, est couramment utilisée comme modèle pour étudier les réponses immunes des monocytes (ou des macrophages dérivés des monocytes) car elle possède de grandes similarités avec les monocytes des cellules mononucléées isolées du sang périphérique (PBMC). Ces cellules expriment les PRR comme le complexe MD-2 : TLR4. Elles sont capables de proliférer pour éliminer les pathogènes, de produire des cytokines et chemokines pro-inflammatoires pour recruter des effecteurs et des cytokines anti-inflammatoires quand l'inflammation est sous contrôle, et de phagocyter les pathogènes (macrophages). Comparées aux cellules *ex vivo*, les lignées cellulaires ne souffrent pas de la variabilité inter-donneur et elles sont de bons modèles d'étude des voies de signalisations cellulaires, des mécanismes et des fonctions cellulaires. Elles sont également plus aisées à cultiver que les PBMC (temps de doublement plus important, stabilité pendant 25 passages, stockage dans l'azote liquide pour plusieurs années) (Chanput et al. 2014).

Nous avons choisi de tester la sécrétion de deux cytokines pro-inflammatoires après stimulation par différents LPS standards. Une expérience préliminaire de dose-réponse avec les LPS standards de *E. coli J5* (produits par extraction à partir du lysat bactérien - chapitre I) a été mise en place. Ces LPS sont optimaux pour l'activation de la voie MD-2 :TLR4 (Park et al. 2009b). Le but est de connaître dans quelle gamme de concentration en LPS nous pouvons stimuler les cellules et obtenir les réponses en TNF- $\alpha$  et IL-6 (Figure 38A). Avec notre modèle, nous obtenons une sécrétion significativement différente par rapport à celle des cellules non-stimulées pour les deux cytokines après 18h de stimulation dès 1 ng / ml. Un plateau est atteint à 10 ng / ml pour la sécrétion du TNF- $\alpha$  et est supérieure à 1000 ng / ml pour l'IL-6. Une expérience de cinétique a été ensuite réalisée afin de connaître les temps optimaux de dosage des deux cytokines d'intérêt dans notre modèle avec 1 ng /ml de LPS (Figure 38B). La réponse en TNF- $\alpha$  est optimale à 6h de stimulation et celle de l'IL-6 à 30h. Au-delà de 30 heures dans ces conditions, les cellules pourraient être altérées et mourir.



**Figure 38 : Expériences préliminaires de dosage du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 après stimulation des cellules THP-1 avec les LPS d'*E. coli* J5.**

A) Dose-réponse après 18h de stimulation ; B) Cinétique après stimulation avec 1 ng/ml. Dosage sur les surnageants de culture par ELISA.

Nous avons donc choisi de représenter, après stimulation, les sécrétions précoces et tardives respectivement par le TNF- $\alpha$  à 6h et l'IL-6 à 30h. Nous avons réalisé des doses-réponses avec chacun des différents LPS standards.

### ***c) Dosages de la production de ROS et de l'activation des caspases 3/7.***

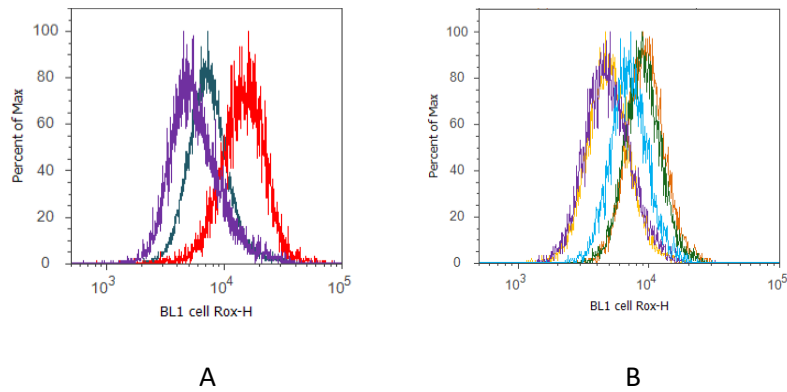
#### ***Production de ROS***

D'après la littérature, la production de ROS est très rapide (de l'ordre de quelques minutes) et dose-dépendante aux LPS (Ryan et al. 2004). Nos premiers tests ont été effectués en incubant 100 ng/ml de LPS d'*E. coli* J5 pendant 0.5, 1, 2, 12, 24 et 48 heures. Les résultats nous ont montré que les ROS sont induits par la stimulation des LPS sur des temps courts dès 30 minutes et qu'un plateau est atteint dès 1h. Plusieurs contrôles ont été mis en place :

- Le Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) est décrit comme inducteur de ROS chez les THP-1 (Uy et al. 2011). Nous l'avons donc utilisé comme contrôle positif de deux façons. D'abord en l'incubant à 100 ng/ml pendant 5-10 minutes avant la mesure de la production de ROS (mesure très rapide), puis en l'incubant 3 heures et en changeant ensuite le milieu pour mesurer la production de ROS 21 heures après. Dès 5 minutes d'incubation du PMA avec les cellules, nous observons une production de ROS significativement différente de celles des cellules non-stimulées (Figure 39). Ce contrôle nous témoigne donc une bonne fonctionnalité de notre système de mesure.

*N.B* : les cellules traitées avec du PMA pendant 3 heures acquièrent progressivement un phénotype adhérent. Elles se différencient en macrophages.

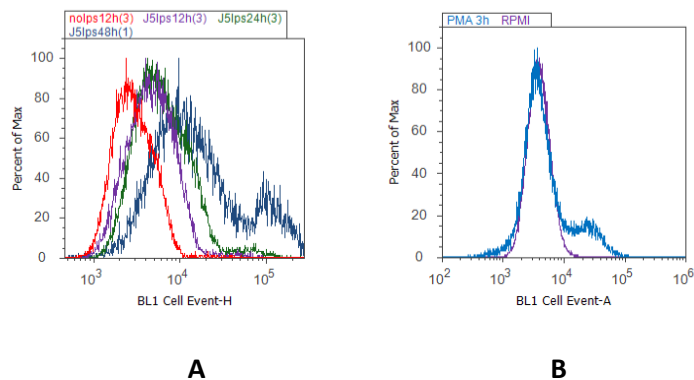
- La N-Acétyl-Cystéine (NAC), qui est un antioxydant, permet de neutraliser la production de ROS (Manuel CellROX®). Des incubations simultanées de NAC 1 mM ou 4 mM avec les LPS ont été testées, mais la NAC n'a eu aucun effet. La NAC a ensuite été incubée 1, 2, et 4 heures avant l'ajout des LPS : un petit effet de diminution des ROS mesurés a été observé sans différence en fonction de la durée de l'ajout de la NAC précédent celui des LPS. Nous avons ensuite testé une incubation de NAC 10 mM pendant 1 heure avant l'ajout des LPS. Cette concentration nous a permis d'observer une diminution drastique de la quantité de ROS détectés. Ce contrôle ajouté 1 heure avant les LPS et à 10 mM permet de neutraliser la production de ROS par les LPS de *E. coli* J5 dans nos conditions (Figure 39).



**Figure 39 : Contrôles des mesures en cytométrie en flux de l'induction de ROS.**

- A. Mesure de l'induction de ROS après incubation des cellules THP-1 avec du PMA  
 En violet : cellules non-stimulées  
 En vert : cellules incubées avec du PMA pendant 5 minutes avant le dosage des ROS  
 En rouge : cellules stimulées pendant 24h avec les LPS d'*E. coli* J5
- B. Effet de la NAC sur la production de ROS induite par la stimulation avec les LPS d'*E. coli* J5.  
 En violet : cellules non-stimulées  
 En vert : cellules stimulées pendant 1h avec les LPS d'*E. coli* J5  
 En jaune : cellules stimulées 1h avec 10 mM de NAC puis 1h avec les LPS d'*E. coli* J5  
 En bleu clair : cellules stimulées pendant 24h avec les LPS de *V. f 5-6*  
 En orange : cellules stimulées pendant 24h avec les LPS de *V. f 6+2PEA*

### Activation des caspases 3/7



**Figure 40 : A) Activation des caspases 3/7 après 12h, 24h et 48h de stimulation avec les LPS de *E. coli* J5 ; B) Activation des caspases 3/7 après 3h de stimulation avec du PMA.**

- A. En rouge : cellules non-stimulées  
 En violet : cellules stimulées pendant 12h avec les LPS d'*E. coli* J5  
 En vert : cellules stimulées pendant 24h avec les LPS d'*E. coli* J5  
 En bleu : cellules stimulées pendant 48h avec les LPS d'*E. coli* J5
- B. En violet : cellules non-stimulées  
 En bleu : cellules stimulées pendant 3h avec du PMA

D'après la littérature, l'activation des caspases peut être mesurée dès 1 heure et demi après l'infection de macrophages par les bactéries *E. coli* (Albee et al. 2007). Des premiers tests ont été effectués en incubant 100 ng/ml de LPS d'*E. coli* J5 pendant 12, 24 et 48 heures (Figure 40). Les résultats nous ont montré que les caspases 3/7 sont activées dès 12h. A 48 heures, les cellules



commencent à subir un stress cellulaire (disponibilité du milieu), c'est pourquoi nous avons déterminé un temps d'incubation des LPS de 24 heures. Un contrôle a été réalisé avec du PMA incubé pendant 3 heures (Oliviero et al. 2012).

#### **4) Discussion et conclusion**

Nous avons montré que la variation de caractéristiques structurales entre nos LPS standards et les structures décrites dans la littérature peut avoir des effets importants en termes d'activités biologiques. Ces LPS standards ont été choisis en fonction de leur structure décrite dans la littérature car elles sont proches les unes des autres. Cependant après analyse structurale, dans la plupart des cas, nous n'observons pas les masses correspondant aux structures attendues. Sans ce travail préalable d'analyse nous ne pourrions pas expliquer les données en termes de cytokines. Nous avons mis en évidence, l'intérêt de l'utilisation de la MS pour étudier la diversité des structures des LPS pour une même bactérie.

Il est clairement décrit que le nombre, la longueur et la position des acides gras jouent un rôle dans la réponse aux LPS et leur liaison au complexe MD-2 :TLR4.

- Hormis pour *R. gelatinosa*, les échantillons de LPS possédant majoritairement des espèces moléculaires hexa- et penta-acylées, et sans aucune espèce tetra- ou tri-acylée, sont ceux qui induisent des réponses en TNF- $\alpha$  et IL-6 (*E. coli* J5, *P. aeruginosa*, *V. filiformis*). Les LPS de *B. pertussis* 1414, penta- et tetra-acylés, n'induisent qu'une faible réponse. Ceci souligne l'importance des activités induites par la liaison des LPS hexa-acylés au récepteur MD-2 :TLR4. Les LPS comportant peu ou pas d'espèces hexa-acylées et des formes tri- ou tetra-acylées n'induisent pas de réponse en cytokines (*N. meningitidis*, *H. Influenzae*). Les espèces sous-acylées (3 et 4 AG) pourraient jouer un rôle antagoniste et ainsi empêcher la liaison des LPS hexa-acylés au récepteur, ce qui justifierait leur non-réponse.

- La position des AG est aussi importante, on remarque que la forme penta-acylées des LPS de *P. aeruginosa* a conservé l'AG porté par le C3', alors que ce n'est pas le cas pour les LPS penta-acylés de *N. meningitidis*. De la même façon, c'est ce carbone qui ne porte pas la même chaîne d'acide gras entre *B. pertussis* 1414 (C14) et *B. pertussis* 18-323 (C10). La chaîne d'acide gras portée par ce carbone C3' pourrait être un déterminant important dans l'activité des LPS.
- En ce qui concerne la longueur des acides gras, l'échantillon *P. aeruginosa* est le seul possédant des LPS hexa-acylés mélangés à des LPS penta-acylés. Ses acides gras sont plus courts que ceux des LPS d'*E. coli*, les LPS de *P. aeruginosa* présentent donc des activités inflammatoires moindres. Les LPS de *R. gelatinosa* sont hexa-acylés mais ils possèdent des AG à chaînes courtes (C10 et C12). Les lipides A possédant ces longueurs sont reconnues pour être de faibles inducteurs. Il est important de souligner qu'une portion des LPS de *R. gelatinosa* présente exactement la même structure de lipide A que les LPS V.f5-6. D'autres caractéristiques, comme la présence d'une région PS différente entre les deux échantillons de LPS, ou des substitutions ou déacylations différentes dans chacun des échantillons, impactent la reconnaissance des LPS par le complexe MD-2 :TLR4.
- Pour les LPS de *B. pertussis* 18-323, reconnus pour être des antagonistes, nous n'observons pas de réponse en cytokines pro-inflammatoires sans surprise, et ceci contrairement aux LPS de *B. pertussis* 1414 qui ne sont pas antagonistes. Les LPS de *V. filiformis*, malgré leurs chaînes courtes ne possèdent pas d'activité antagoniste.

Quand on observe les LPS standards, nous constatons dans la plupart des cas que ce n'est pas la structure la plus acylée qui est prépondérante dans l'échantillon. Ces LPS hypo-acylés, sont dépourvus d'activité inflammatoire et il serait intéressant d'étudier leurs effets antagonistes. Si c'est le cas, ces molécules pourraient être impliquées dans le développement d'antagonistes et de la compréhension de ces mécanismes.

Dans cet article, nous avons redémontré la structure des lipides A de deux lots de *V. filiformis*. Ils possèdent des LPS aux acides gras courts et les LPS font partie des principes actifs du lysat de *V. filiformis* utilisé contre la dermatite atopique (Martin 2005).

Nous avons remarqué que l'origine de l'échantillon à extraire (biomasse totale ou culot bactérien de *V. filiformis*) joue sur la structure des LPS extraits. Les LPS substitués par des PEA sont principalement retrouvés dans la biomasse totale. Ces groupements permettent une meilleure solubilisation des LPS qui peuvent se retrouver davantage dans le surnageant que dans le culot lors de la centrifugation de la culture, ce qui explique la différence entre les lots. Par ailleurs, ces groupements empêchent leur agrégation car les cations divalents ne peuvent plus interagir entre les groupements phosphates de deux molécules.

Nous avons aussi étudié différentes activités biologiques. Quand nous comparons les activités TNF- $\alpha$  et IL-6 des échantillons de LPS de *V. filiformis* nous observons une différence majeure : une dose-réponse plus faible de TNF- $\alpha$  et une production absente d'IL-6 en réponse aux stimulations avec les LPS V.f6+2PEA comparée aux LPS V.f5-6. Ces résultats suggèrent que les groupements PEA modifient l'activation du complexe MD-2:TLR4. Ces productions sont plus faibles comparées aux stimulations avec les LPS d'*E. coli*, mais non-négligeables. Ceci explique la capacité des LPS à contribuer aux effets décrits sur la peau en induisant une réponse immunitaire innée nécessaire à l'activation de la réponse immunitaire adaptative. La sécrétion modérée de cytokines est en accord avec la structure décrite de LPS à 6 AG courts.

De plus, la production de ROS, la viabilité cellulaire et l'induction de l'apoptose ont été testées après stimulation avec les LPS d'*E. coli* et de *V. filiformis*. Aucune différence significative n'a été observée. La production de ROS est un mécanisme essentiel pour éliminer les pathogènes intracellulaires par les phagocytes et pour l'activation de la réponse immunitaire innée par les TLR et NF $\kappa$ B. Nous observons une production de ROS équivalente avec les LPS d'*E. coli* J5 et les LPS de *V. filiformis*. Pour *V. filiformis*, la production de ROS est décrite comme compatible avec l'activité anti-

oxydante induite par le lysat sur les fibroblastes et les kératinocytes (Mahe et al. 2006). Cette production est donc régulée. De plus la production de ROS est nécessaire à l'activation de NFκB (Park et al. 2004). Les caspases sont connues pour réguler la viabilité cellulaire et l'apoptose. La viabilité cellulaire n'est pas affectée par le traitement avec les LPS. Différents rôles bénéfiques pourraient résulter de cette activation des caspases comme c'est le cas pour d'autres lignées cellulaires. Plusieurs études ont montré les fonctions non-apoptotiques importantes des caspases dans l'inflammation, la survie, la prolifération, la différenciation cellulaire et l'activation de NFκB (Lamkanfi et al. 2007; Erener et al. 2012). Il serait intéressant de tester l'effet de la stimulation par les LPS de *V. filiformis* sur la prolifération cellulaire. Il a également été décrit que la stimulation des monocytes par les LPS prévenaient l'apoptose (Mangan et al. 1991). Il est aussi montré que les LPS n'activent pas les caspases seuls, mais lorsqu'ils sont utilisés avec d'autres molécules. Dans ce cas, ils activent les caspases-3 et l'apoptose via le TLR4 (Harrison et al. 2005; Suzuki et al. 2004). Cette manipulation confirme l'effet non-apoptotique des LPS seuls sur les monocytes.

Ces résultats sont à associer avec les effets connus des LPS de *V. filiformis* sur la peau (induction des molécules de co-stimulation, production de peptides antimicrobiens) et avec la réponse limitée en cytokines pro-inflammatoires.

Nos résultats, sont en accord avec les études précédentes. Effectivement, les LPS induisent une sécrétion modérée de cytokines pro-inflammatoires, une activation des caspases 3/7 et la production de ROS. Ces activités prennent place comme des mécanismes de défense pour améliorer la réponse immune et lutter contre les pathogènes.

La structure de ces LPS bénéfiques pour des applications dermatologiques étant définie, il serait intéressant de rechercher des LPS de structures proches afin d'étudier s'ils ont les mêmes propriétés. Ainsi, on pourrait éventuellement établir des règles qui définissent la structure de LPS d'intérêt pour leurs effets bénéfiques et dépourvus d'effets néfastes au niveau de la peau.

Les activités bénéfiques de ces LPS sont exploitées au sein d'un lysat bactérien. Ces bactéries non-pathogènes sont cultivées aisément pour produire ce lysat en grandes quantités et l'incorporer à des préparations cosmétiques. Mais, lorsque des LPS purs doivent être isolés pour des applications thérapeutiques, il est impératif de mettre en place des macro-méthodes d'extraction.

## ***V- Conclusion et Perspectives***

Les LPS ont été découverts du fait de leurs effets toxiques et pyrogènes lors des infections bactériennes. Depuis, leurs activités sont étudiées aussi bien pour comprendre et combattre le fonctionnement de leurs effets néfastes que pour exploiter leurs activités bénéfiques.

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'utilisation des activités immuno-stimulantes des LPS chez l'homme. La connaissance de la structure des LPS étant indispensable pour comprendre leurs activités biologiques, nous avons développé deux nouvelles méthodes d'analyse structurale. Ces méthodes permettent d'étudier les structures des LPS sans les extraire et ouvrent les portes au développement de nouveaux tests d'identification bactérienne. Les LPS présentant des structures conférant des avantages aux bactéries pathogènes correspondantes ont été sélectionnés au cours de l'évolution. Ce sont des gènes induisant des modifications structurales avantageuses en réponse à des stimuli environnementaux qui ont été conservés. Ces modifications aident les bactéries à échapper à la reconnaissance du système immunitaire ou amplifient leur virulence. Leurs études procurent des informations importantes sur l'évolution des bactéries à Gram négatif et sur les moyens de les combattre.

Pour exploiter les activités des LPS dans des applications thérapeutiques, nous avons étudié la compatibilité de leur production à l'échelle industrielle et spécialement dans le cadre de la production de composés vaccinaux. Des tests évaluant la détoxification et l'efficacité de plusieurs candidats composés de LPS-modifiés chimiquement, dans le but d'être développés comme adjuvants de vaccins, ont été présentés. La caractérisation de leur structure est indissociable de la compréhension de leur détoxification. De plus, les structures des régions biologiquement actives LPS qualifiés de « non-toxiques » au niveau cutané et présents dans des crèmes dermatologiques ont été élucidées dans le but de mieux comprendre leurs activités bénéfiques sur la peau.

- Les compétences du laboratoire académique « Endotoxines, structures et activités » ont permis le développement des méthodes d'analyses structurales des LPS et les travaux sur les relations structures-activités de LPS naturellement peu toxiques.
- Les expertises de la société LPS-BioSciences ont permis les travaux de recherche portant sur l'amélioration de l'extraction des LPS à l'échelle industrielle, sur la détoxification chimique et les études des activités biologiques de LPS-modifiés chimiquement.

Pour comprendre leurs mécanismes d'action ou sélectionner des LPS d'intérêt, des techniques d'études structurales et biologiques sont en continuel développement. Les outils techniques évoluent et ont désormais des sensibilités de plus en plus fines qu'il faut exploiter. Cette nécessité de caractériser systématiquement la structure des LPS de bactéries employées vient du fait qu'elles sont variables d'une bactérie à l'autre et même d'une culture à l'autre. La recherche concernant les LPS est en constante évolution et la société LPS-BioSciences est confrontée à la résolution de nombreux problèmes concernant leurs applications médicales.

Les enzymes catalysant les étapes de biosynthèse sont exprimées différemment et les molécules de LPS peuvent subir des modifications post-traductionnelles en réponses à des conditions environnementales (Raetz et al. 2007). Le contrôle de la structure des molécules utilisées est nécessaire, même entre deux lots de LPS provenant des mêmes bactéries. Il n'est pas possible de comparer des activités biologiques des LPS en se basant sur la structure décrite dans la littérature, car les différentes équipes ne travaillent pas sur les mêmes lots de LPS. Il en est de même pour les LPS commerciaux, ils ne sont parfois pas composés des mêmes espèces moléculaires malgré le fait qu'ils soient extraits des mêmes bactéries (Karibian et al. 1993). Il faut donc s'assurer de leur composition afin de garantir la reproductibilité et la compréhension des manipulations immunologiques.

Nous avons illustré ces propos, dans la publication insérée à la fin de l'introduction, avec l'étude structurale de trois lots de LPS commerciaux de *S. Minnesota Re595*, et dans le chapitre II, avec l'utilisation de standards de LPS ne présentant pas toujours la structure décrite dans la littérature.

Mais, c'est aussi le cas des LPS d'*E. coli* O157:H7 dans le chapitre III qui sont très majoritairement tetra-acylés alors que des LPS hexa-acylés étaient attendus. De plus lors de ces travaux, nous avons été confrontés plusieurs fois à des variations de structures de LPS en fonction des conditions de culture : c'est le cas pour les deux échantillons de LPS d'*E. coli* J5 utilisés dans le chapitre IV et pour les LPS de *V. filiformis* qui se ségrègent lors de la récupération de la culture dans le chapitre II.

Enfin, dans toutes les manipulations immunologiques utilisant des LPS, il est nécessaire de s'assurer que leur degré de pureté est acceptable et comparable pour tirer des conclusions pertinentes. Les LPS peuvent être co-extraits avec des contaminants, et les LPS commerciaux peuvent aussi en contenir (Tirsoaga et al. 2007). Leur présence fausse les résultats si elle n'est pas prise en compte. Les contaminants, prennent soit la place des LPS ce qui implique que l'on surestime leur quantité dans un échantillon, soit ils sont des éléments biologiquement actifs comme les lipoprotéines qui activent la voie TLR2 et engendrent la production de cytokines pro-inflammatoires comme les LPS lorsqu'ils activent le TLR4 (Manthey & Vogel 1994). De nombreux travaux ont conclu à l'activation du TLR-2 par les LPS par méconnaissance des techniques de purification et d'analyse de ces derniers, ces travaux correspondent à une perte considérable en temps et en argent et à des conclusions erronées.

Les lipopolysaccharides sont des molécules ancrées dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Ces trois éléments ont été exploités pour répondre aux objectifs de caractérisation, d'extraction et de détoxification des endotoxines pour des applications chez l'homme.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons développé deux micro-méthodes rapides d'études structurales, par spectrométrie de masse MALDI-TOF, des LPS directement sur des lysats bactériens. Plusieurs méthodes sont déjà à disposition pour l'analyse structurale des LPS extraits. D'autres permettent l'analyse rapide des lipides A sur les bactéries (El Hamidi et al. 2005; Larrouy-Maumus et al. 2016). Cependant ce n'est pas le cas pour les LPS et les PS. Les LPS sont essentiellement analysés quand ils ont été extraits bien qu'une technique d'analyse par MS, après



dépôt des bactéries sur CCM et migration des LPS mise au point dans l'équipe, soit disponible (Therisod et al. 2001). Généralement, les régions PS sont analysés lorsque les LPS ont été préalablement extraits puis clivés. Ces étapes requièrent du temps. Nous avons donc développé une méthode d'analyse des LPS entiers directement sur les lysats bactériens, sans extraction et sans traitement chimique. Une deuxième méthode vient la compléter, il s'agit de l'hydrolyse des lysats bactériens. Ceci permet d'analyser les régions PS et lipides A avec de plus de précision. Nos méthodes s'appuient donc sur la production de produits bactériens par lyse des bactéries. L'optimisation de la production de ces échantillons a été effectuée en lysant les bactéries simplement par choc osmotique. Nous avons obtenu de ces échantillons des spectres de masse des membranes sur lesquels les LPS sont identifiables pour les 3 modèles testés : *B. pertussis*, *B. holmesii* et *E. coli* J5. Cette méthode avait déjà été appliquée auparavant avec les souches *B. pertussis* et *E. coli* C600 en donnant de bons résultats. Cependant elle n'a pas encore fait ses preuves sur les LPS longs et elle manquait de statistiques. En hydrolysant les lysats bactériens avec un mélange de triéthylamine-citrate, nous avons obtenu les spectres des lipides A et des PS pour les 3 modèles testés de souches aux LPS courts : *E. coli* J5, *B. pertussis*, *B. holmesii*, ainsi que pour le modèle de la souche aux LPS longs testée : *E. coli* O157:H7.

Ces méthodes peuvent être utilisées pour discriminer rapidement la structure des LPS issus de différentes cultures, par exemple pour sélectionner des conditions de culture correspondant à la structure de LPS sélectionnée. Cette méthode, qui n'était pas prête pour ces cas particuliers, aurait pu être appliquée à l'analyse des LPS des deux cultures différentes d'*E. coli* J5 du chapitre IV, l'une a été cultivée dans du milieu LB, l'autre dans du milieu TSB. Elle aurait aussi pu être appliquée aux bactéries *V. filiformis* récoltées avant ou après centrifugation (Cf. chapitre II). Cette multitude d'exemples souligne l'importance d'une telle méthode.

Dans le futur, ces méthodes peuvent être développées pour l'identification rapide d'espèce bactérienne. Elles présentent des avantages d'identification rapide de bactéries, grâce à leur LPS, et elle permettrait d'étudier et de suivre l'évolution dans le temps et dans l'espace de pathogènes par

exemple. Pour identifier des espèces bactériennes directement au sein de prélèvements cliniques (sécrétions bronchiques, aspirations pulmonaires), un développement spécifique doit être effectué au niveau de la sensibilité. La récupération de bactéries pathogènes à partir d'échantillons cliniques puis leur lyse doivent être adaptées à d'infimes quantités.

Ces deux méthodes sont donc de nouveaux outils de caractérisation structurale des LPS et d'identification bactérienne.

De futures analyses seront réalisées dans le cadre de la collaboration avec les Physiciens de l'Institut Nucléaire d'Orsay pour étudier directement les constituants membranaires bactériens, dont les LPS, directement à partir des bactéries.

Ensuite, dans l'objectif d'exploiter des LPS aux structures conférant des activités immuno-stimulantes bénéfiques, deux stratégies sont possibles.

- Premièrement, il est possible d'employer des LPS actifs et naturellement peu ou pas toxiques.
- Deuxièmement, les LPS peuvent être modifiés afin de les détoxifier.

C'est à travers l'utilisation de lysats bactériens, que nous avons approfondi les relations structure-activité de LPS naturellement non-toxiques et bénéfiques au niveau cutané (Gueniche et al. 2008). Ces lysats produits à partir des bactéries non-pathogènes *V. filiformis* sont des composés de crèmes dermatologiques et cosmétiques. Ils ont montré des activités antioxydantes et antimicrobiennes aidant au traitement de la dermatite atopique. Les LPS sont responsables de la sécrétion des peptides antimicrobiens par les kératinocytes, mais aussi du renforcement de la réponse immunitaire induite par les cellules dendritiques cutanées en sur-exprimant les molécules de co-stimulation (B7-1, B7-2) et en stimulant la phagocytose (Martin 2005). Le lysat bactérien induit de fortes activités antioxydantes superficielles par les kératinocytes et les fibroblastes qui protègent la peau contre le vieillissement cellulaire.

Nous avons décrit la structure de leurs lipides A. Ils sont composés de chaînes d'acides gras courts à 10 et 12 carbones et les phosphates peuvent être substitués par des groupements PEA. Ces LPS aux chaînes courtes ne sont pas antagonistes. En termes d'activité des cytokines, nous avons montré qu'ils induisaient une production modérée d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  par les cellules monocytaires THP-1 comparée aux LPS d'*E. coli*. Nous avons aussi montré qu'ils induisaient une production de ROS dans ce modèle cellulaire. Ces deux productions, de ROS et de cytokines, induites par les LPS sont nécessaires pour activer le système immunitaire inné et se défendre contre les pathogènes. Aussi, ils activent les caspases 3/7 mais n'ont pas d'effet sur la viabilité cellulaire des THP-1, tout comme les LPS d'*E. coli*. Mais contrairement aux LPS de *V. filiformis*, ceux d'*E. coli* J5 ne présentent aucune activité bénéfique sur la peau. Ces résultats complètent les rôles connus de ces LPS dans l'activation du système immunitaire cutané.

Ce chapitre a aussi permis de discuter des relations structure-activité des LPS. Le nombre d'acide gras, leur position, leur longueur et la présence de substituants sur les groupements phosphate modulent la réponse aux LPS. Nous avons mis en évidence l'absence de réponse en cytokines pro-inflammatoires lorsque les cellules étaient stimulées avec des échantillons contenant des espèces tri et tetra-acylées. Ces espèces moléculaires pourraient avoir des rôles antagonistes et empêcher la liaison des LPS hexa-acylées du mélange au récepteur MD-2 :TLR4. Les échantillons de LPS possédant majoritairement des espèces moléculaires hexa- et penta-acylées, et sans aucune espèce tetra- ou tri-acylée, sont ceux qui induisent des réponses en TNF- $\alpha$  et IL-6. Les échantillons de LPS seulement, penta- et tetra-acylés, n'induisent qu'une faible réponse. Ceci souligne l'importance des activités induites par la liaison des LPS hexa-acylés au récepteur MD-2 :TLR4. La position des AG est aussi importante, nous avons remarqué que l'absence ou la présence d'une chaîne d'AG courte en C3' influait sur l'activité des LPS. Cette chaîne d'acide gras pourrait être un déterminant important dans l'activité des LPS. En ce qui concerne la longueur des acides gras, les LPS possédant des AG plus courts induisent une plus faible sécrétion de cytokines. Nous avons aussi mis en évidence que d'autres caractéristiques, comme la présence d'une région PS différente ou des substitutions ou

déacylations différentes entre deux échantillons de LPS aux lipides A similaires impactaient la reconnaissance des LPS par le MD-2 :TLR4. Ces études font ressortir que chaque échantillon de LPS extrait est composé d'un mélange d'espèces moléculaires possédant ses propres effets sur l'activation des récepteurs MD-2 :TLR4. Bien que les activités semblent suivre des règles générales comme « l'activation du récepteur diminue avec le nombre d'acides gras portés par le lipide A ou leur longueur » (Maeshima & Fernandez 2013), chaque échantillon de LPS est un cas particulier à étudier.

La deuxième alternative pour exploiter les activités bénéfiques et immuno-stimulantes des LPS est de les détoxifier. C'est via la détoxification chimique de LPS purifiés et sélectionnés que nous nous sommes intéressés au développement d'adjuvants de vaccins dérivés de LPS dans le chapitre IV. Il existe déjà un adjuvant dérivé des LPS de *S. Minnesota*, le MPL<sup>®</sup>, qui a fait ses preuves et qui est commercialisé au sein de vaccins (GSK). Cette molécule conserve ses propriétés immuno-stimulantes mais elle possède une toxicité et une pyrogénicité réduites comparées aux LPS non-modifiés de *S. Minnesota*.

Des candidats composés de LPS-modifiés, détoxifiés par traitement chimique, ont été développés par la société LPS-BioSciences. Afin de valider la possibilité de les utiliser comme adjuvants de vaccins, différents tests d'évaluation de la non-pyrogénicité et de l'efficacité de ceux-ci ont été discutés et réalisés dans l'objectif de faire une preuve de concept préclinique. Nous avons comparé les activités des candidats au MPLA, un dérivé de LPS disponible dans le commerce et qui se rapproche du MPL<sup>®</sup>, ainsi qu'à d'autres témoins comme l'aluminium ou des LPS non-modifiés.

La structure et la composition des candidats adjuvant traités chimiquement doivent être connues, c'est pourquoi la caractérisation structurale de chacun des échantillons de LPS-modifiés a été établie par MS MALDI-TOF. La vérification de leur pureté a aussi été effectuée en analysant le contenu en lipoprotéines, en acides nucléiques et en acides aminés des échantillons. En effet, ces composés peuvent troubler l'analyse des résultats induits par les LPS. Egalement, leur état d'agrégation a été évalué, car celle-ci joue sur l'activité des LPS et du MPL<sup>®</sup> en solution.

Des tests permettant la compréhension de leur mécanisme d'action par l'évaluation de la balance Th1/Th2 ont aussi été mis en œuvre. Les LPS sont connus pour orienter la réponse immunitaire vers la voie Th1, et c'est le type d'adjuvant actuellement demandé pour le développement de nouveaux vaccins.

L'évaluation de la diminution de pyrogénicité des composés modifiés a été testée chez le lapin et par dosages *in vitro* de cytokines pro-inflammatoires. La preuve de leur innocuité par rapport aux molécules mères de LPS est incontournable avant de réaliser des vaccins.

Enfin, l'efficacité de leur activité adjuvante a été étudiée lors de tests d'immunisations de souris et de dosages d'anticorps. Ces tests ont pour objectifs de montrer l'efficacité des LPS-modifiés à induire une réponse immunitaire malgré les modifications chimiques qui ont été réalisées.

Ensemble, ces tests combinent l'étude de la toxicité et de l'efficacité des différents LPS-modifiés pour les comparer. A travers ce plan de validation, il est possible d'étudier les caractéristiques structurales des différents candidats de LPS modifiés et leurs effets sur leur pouvoir adjuvant et leur activité pyrogène. Au cours de ce chapitre, la détoxification des LPS a été étudiée.

A titre d'illustration, deux échantillons de LPS non-modifiés extraits à partir de bactéries *E. coli* J5 cultivées dans deux milieux de culture différents ont aussi été étudiés. L'un est majoritairement constitué de LPS tetra-acylés tandis que l'autre est davantage composé de LPS hexa-acylés. Nous avons observé que ce n'est pas l'acylation mais l'état d'agrégation qui jouait un rôle prépondérant dans les réponses au test LAL. Au contraire, l'acylation est principalement responsable de l'activation du MD-2 : TRL4 et de ces effets (sécrétion de cytokines pro-inflammatoires).

Enfin, notamment dans le cadre de la production d'adjuvants de vaccins ou d'autres dérivés de LPS à visée médicale, l'extraction des LPS, est un processus clé. La préparation des LPS en grandes quantités peut aussi être exploitée dans le cadre de la production d'antigènes de vaccins. De nombreux antigènes de vaccins conjuguant l'antigène-O à une protéine porteuse sont proposés contre plusieurs pathogènes humains comme les Salmonelles, les Shigelles, ou *E. coli* (Micoli et al. 2013). Nous avons démontré la compatibilité du processus d'extraction de LPS-BioSciences avec

l'échelle industrielle et la réglementation des vaccins. Toutes les étapes et tous les réactifs utilisés sont adaptables aux bonnes pratiques de fabrication. Toutefois, les traces des solvants résiduels doivent être mesurées pour s'assurer de la sécurité des produits finis.

Dans le but de réaliser une extraction à grande échelle, une étude de l'amélioration de la méthode d'extraction a été proposée. Celle-ci comprend la production de bactéries lysées à partir de grandes quantités de bactéries. Ainsi, les volumes de solvants à manipuler sont réduits. Son application avait déjà été approuvée et utilisée pour certaines souches de bactéries possédant des LPS courts. Nous l'avons adaptée sur des grandes quantités de LPS difficilement purifiables, ceux d'*E.coli* O157 H7. La production de bactéries lysées a engendré l'obtention d'un gel riche en LPS. Celui-ci a pu être étudié et a permis l'extraction et la purification d'une fraction concentrée en LPS et relativement propre (4 fois moins contaminées que les fractions obtenues lors d'une extraction classique sur bactéries entières). Lors de l'extraction des LPS, nous pouvons nous attendre à différents comportements (solubilité) et le développement de nouvelles méthodes d'extraction et de purification est nécessaire. Dans notre cas, la production d'un gel permettant l'extraction de LPS très solubles et moins contaminés, est peut être une solution pour l'extraction des LPS de ces bactéries. Les étapes suivantes de purification habituellement utilisées sont à reconsidérer car elles ne sont pas applicables à cette souche. D'autres enzymes comme les pronases ou des enzymes plus actives, et des précipitations utilisant des solvants pour isoler les LPS sont des pistes à envisager.

- ⇒ Dans le cadre de l'extraction, la caractérisation, et la détoxification de LPS pour des applications chez l'homme nous avons : Développé des méthodes d'analyse structurale et d'identification rapides des bactéries ;
- ⇒ Caractérisé les relations structure-activité de plusieurs LPS naturels ;
- ⇒ Étudié la faisabilité de l'extraction, selon la méthode de LPS-BioSciences, à l'échelle industrielle dans le but de produire des LPS à visée médicale ;
- ⇒ Constitué un plan de validation préclinique de LPS détoxifiés et analysé leurs activités pyrogènes et adjuvantes en fonction de leurs structures modifiées.

## ***VI- Publications et Communications***

### ***Publications :***

- Alexey Novikov, Aude Breton, and Martine Caroff. Micromethods for isolation and structural characterization of lipid A, and polysaccharide regions of bacterial lipopolysaccharides. Springer protocols, Methods in Molecular biology: Microbial Toxins, Methods and Protocols, Editors: Holst, Otto (Ed.). 2017 ***In press***.
- Aude Breton, Alexey Novikov, Richard Martin, Pierre Tissières, Martine Caroff. Structural and biological characteristics of *Vitreoscilla filiformis* lipids A. Journal of lipid research. January 2017.
- Alexey Novikov, Aude Breton, Michele Pautrat, Mireille Fallavier, Serge Della-Negra and Martine Caroff. LPS Characteristic obtained by compared innovative and classical Mass-Spectrometry methods. 2017. ***In preparation***.
- Aude Breton, Alexey Novikov, Stephanie Le Moullec, and Martine Caroff. Micromethods for lipopolysaccharides structural characterization applied to Gram-negative bacterial membranes. 2017. ***In preparation***.

### ***Communications orales :***

- “Little details make all the difference... for endotoxins too!” – I2BC Day (Gif-sur-Yvette, France) – May 26, 2015.
- “Looking for bacterial fingerprints” – Workshop Iglex Andromède (Orsay, France) – June 23, 2016.

### ***Communications par affiches :***

- “All LPS are not Endotoxins: Structure to activity relationships” - **best poster award** Doctoral School Day (Versailles, France) - March 9, 2016.
- “The thousand and one lipopolysaccharides: fact and fiction about “THE LPS” as shown by their structures and activities” - Young Researchers in life Science Congress (Pasteur Institute, Paris) - May 18, 2016.
- “*Vitreoscilla filiformis* lipopolysaccharides: Structure to activity relationships” – International Endotoxin and Innate Immunity Society Congress (Hamburg, Germany) – September 24, 2016. **Travel grant Gioannini Women in Science**.
- “Hold in mind that your diet is their growth medium...” – International Endotoxin and Innate Immunity Society Congress (Hamburg, Germany) – September 24, 2016. ANR LPS-**MD-SF**.

## VII- Références bibliographiques

- Van der Aar, A.M.G. et al., 2007. Loss of TLR2, TLR4, and TLR5 on Langerhans cells abolishes bacterial recognition. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(4), pp.1986–90.
- Akira, S., 2003. Mammalian Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*, 15(1), pp.5–11.
- Albee, L., Shi, B. & Perlman, H., 2007. Aspartic protease and caspase 3/7 activation are central for macrophage apoptosis following infection with *Escherichia coli*. *Journal of leukocyte biology*, 81(1), pp.229–237.
- Alexander, C. & Rietschel, E.T., 2001. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *Journal of endotoxin research*, 7(3), pp.167–202.
- Alving, C., 1992. Lipid A and liposomes containing lipid A as adjuvant for vaccines. In J. L. Ryan & D. C. Morrison, eds. *Bacterial endotoxic lipopolysaccharides Volume II: Immunopharmacology and Physiopathology*. pp. 429–443.
- Alving, C.R., 1993. Lipopolysaccharide, lipid A, and liposomes containing lipid A as immunologic adjuvants. *Immunobiology*, 187(3–5), pp.430–446.
- Amano, K., Ribi, E. & Cantrell, J.L., 1983. Structural Antitumor Requirements and Toxic of Endotoxic Activity Glycolipid for. *Biochem, J*, 93(5), pp.1391–1399.
- Amor, K. et al., 2000. Distribution of core oligosaccharide types in lipopolysaccharides from *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 68(3), pp.1116–1124.
- Aspinall, G.O. et al., 1995. Lipopolysaccharides from *Helicobacter pylori*. *Progress in clinical and biological research*, 392, pp.93–101.
- Ausiello, C.M. & Cassone, A., 2014. Acellular pertussis vaccines and pertussis resurgence: revise or replace? *mBio*, 5(3), pp.e01339-14.
- Awate, S., Babiuk, L.A. & Mutwiri, G., 2013. Mechanisms of action of adjuvants. *Frontiers in Immunology*, 4(MAY), pp.1–10.
- Ayme, G. et al., 1980. Biological activities of fragments derived from *Bordetella pertussis* endotoxin: Isolation of a nontoxic, Shartzman-negative lipid A possessing high adjuvant properties. *Infection and Immunity*, 27(3), pp.739–745.
- Bardan, A., Nizet, V. & Gallo, R.L., 2004. Antimicrobial peptides and the skin. *Expert Opin. Biol. Ther*, 4(4).
- Barton, G.M. & Kagan, J.C., 2009. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nature reviews. Immunology*, 9(8), pp.535–42.
- Based on Handbook of Pharmaceutical Salts, 2005. Electronic Supplementary Material - Supplementary material - list of pharmaceutically acceptable acids. *CrystEngComm*, (Based on Handbook of Pharmaceutical Salts, excluding polymers . P. H. Stahl and C. G. Wermuth, editors, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, Weinheim/Zürich:Wiley-VCH/VHCA, 2002).



- Bell, E.A. et al., 2015. Potentially biogenic carbon preserved in a 4.1 billion-year-old zircon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(47), pp.14518–21.
- Berg, R.D., 1999. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Advances in experimental medicine and biology*, 473, pp.11–30.
- Beutler, B., 2000. Tlr4: Central component of the sole mammalian LPS sensor. *Current Opinion in Immunology*, 12(1), pp.20–26.
- Bhattacharyya, S., Dudeja, P.K. & Tobacman, J.K., 2008. Lipopolysaccharide activates NF- $\kappa$ B by TLR4-Bcl10-dependent and independent pathways in colonic epithelial cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295(4).
- Billroth, T., 1862. Observations on fever caused by wounds and accidental wound diseases. *Arch Klin chir*, (2), pp.578–667.
- Biswas, S.K. et al., 2007. Role for MyD88-Independent, TRIF Pathway in Lipid A/TLR4-Induced Endotoxin Tolerance. *The Journal of Immunology*, 179(6), pp.4083–4092.
- Al Bitar Nehmé, S., 2014. Les endotoxines du genre Bordetella : structure, évolution et impact sur la virulence bactérienne. <http://www.theses.fr>.
- Bladen, H.A. & Mergenhagen, S.E., 1964. Ultrastructure of Veillonella and morphological correlation of an outer membrane with particles associated with endotoxic activity. *Journal of bacteriology*, 88(5), pp.1482–92.
- Boon Hinckley, M. et al., 2005. A Leptospira interrogans enzyme with similarity to yeast Ste14p that methylates the 1-phosphate group of lipid A. *The Journal of biological chemistry*, 280(34), pp.30214–24.
- Bowen, W.S. et al., 2012. Selective TRIF-Dependent Signaling by a Synthetic Toll-Like Receptor 4 Agonist. *Science Signaling*, 5(211), p.ra13-ra13.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), pp.248–254.
- Brandenburg, K. & Seydel, U., 2009. Conformation and supramolecular structure of lipid A. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 667, pp.25–38.
- Brandenburg, K. & Seydel, U., 1990. Investigation into the fluidity of lipopolysaccharide and free lipid A membrane systems by Fourier-transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *European journal of biochemistry*, 191(1), pp.229–36.
- Brazolot Millan, C.L. et al., 1998. CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. *Immunology October*, 95(23), pp.15553–15558.
- Brewer, J.M. et al., 1998. Lipid vesicle size determines the Th1 or Th2 response to entrapped antigen. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(8), pp.4000–7.

- Brito, L.A., Malyala, P. & O'Hagan, D.T., 2013. Vaccine adjuvant formulations: A pharmaceutical perspective. *Seminars in Immunology*, 25(2), pp.130–145.
- Buchner, H., 1890. Die chemische Reizbarkeit der Leukocyten und deren Beziehung zur Entzündung. *Berliner Klin Wochenschr*, 27, pp.1084–1089.
- Buttenschoen, K. & Radermacher, P., 2010. Endotoxin elimination in sepsis : physiology and therapeutic application. , pp.597–605.
- Camus, G. et al., 1997. Mild endotoxaemia and the inflammatory response induced by a marathon race. *Clinical science (London, England : 1979)*, 92(4), pp.415–22.
- Cani, P.D. et al., 2008. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes*, 57(6).
- Carlson, B.C. et al., 2000. The endogenous adjuvant squalene can induce a chronic T-cell-mediated arthritis in rats. *The American journal of pathology*, 156(6), pp.2057–65.
- Caroff, M. et al., 1991. Analysis of unmodified endotoxin preparations by 252Cf plasma desorption mass spectrometry: Determination of molecular masses of the constituent native lipopolysaccharides. *Journal of Biological Chemistry*, 266(28), pp.18543–18547.
- Caroff, M. et al., 1984. Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3. *Infection and immunity*, 46(2), pp.384–8.
- Caroff, M. et al., 1986. Inability of pyrogenic, purified *Bordetella pertussis* lipid A to induce interleukin-1 release by human monocytes. *Infection and Immunity*, 54(2), pp.465–471.
- Caroff, M., 2004. Novel method for isolating endotoxins. WO Patent 2004/062690 A1.
- Caroff, M., 1982. *Relation Structure-activité du lipide A de Bordetella pertussis*. Doctorat ès Sciences. Université Paris-sud.
- Caroff, M. et al., 2002. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect*, 4(9), pp.915–926.
- Caroff, M. et al., 1994. Structural characterization of the lipid A of *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. *J Bacteriol*, 176(16), pp.5156–5159.
- Caroff, M. & Karibian, D., 1990. Several uses for isobutyric acid-ammonium hydroxide solvent in endotoxin analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), pp.1957–1959.
- Caroff, M. & Karibian, D., 2003. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res*, 338(23), pp.2431–2447.
- Caroff, M. & Novikov, A., 2011. Micromethods for lipid A isolation and structural characterization. In O. Holst, ed. *Methods in molecular biology Microbial Toxins*. Springer protocols. pp. 135–146.
- Caroff, M., Tacke, A. & Szabo, L., 1988. Detergent-accelerated hydrolysis of bacterial endotoxins and determination of the

- anomeric configuration of the glycosyl phosphate present in the “isolated lipid A” fragment of the Bordetella pertussis endotoxin. *Carbohydr Res*, 175(2), pp.273–282.
- Caroff, M., Tacken, A. & Szabó, L., 1988. Detergent-accelerated hydrolysis of bacterial endotoxins and determination of the anomeric configuration of the glycosyl phosphate present in the “Isolated lipid A” fragment of the Bordetella pertussis endotoxin. *Carbohydrate Research*, 175(2), pp.273–282.
- Carswell, E.A. et al., 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(9), pp.3666–70.
- Casella, C.R. & Mitchell, T.C., 2013. Inefficient TLR4/MD-2 Heterotetramerization by Monophosphoryl Lipid A. *PLoS ONE*, 8(4).
- Cavaillon, J.-M. et al., 2003. Endotoxin tolerance: is there a clinical relevance? *Journal of Endotoxin Research*, 9(2), pp.101–107.
- Cavaillon, J.-M., 2009. HISTORY OF LPS. Available at: <http://www.lpsbiosciences.com/index.php/news-blog-3/lps-history>.
- Centanni, E. & Bruschetti, A., 1894. Untersuchungen über das Infektionsfieber. *Dtsch Med Wochenschr*, (12), pp.270–272.
- Chafchaoui-Moussaoui, I. et al., 2011. A new rapid and micro-scale hydrolysis, using triethylamine citrate, for lipopolysaccharide characterization by mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(14), pp.2043–2048.
- Chanput, W., Mes, J.J. & Wichers, H.J., 2014. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, 23(1), pp.37–45.
- Chen, C.H. et al., 1973. Heterogeneity and Biological Activity of Endotoxic Glycolipid from Salmonella minnesota R595. *Journal of Infectious Diseases*, 128(Supplement 1), pp.S43–S51.
- Chilton, P.M. et al., 2013. Adjuvant activity of naturally occurring monophosphoryl lipopolysaccharide preparations from mucosa-associated bacteria. *Infection and Immunity*, 81(9), pp.3317–3325.
- Ciornei, C.D. et al., 2010. Biofilm-forming Pseudomonas aeruginosa bacteria undergo lipopolysaccharide structural modifications and induce enhanced inflammatory cytokine response in human monocytes. *Innate Immun*, 16(5), pp.288–301.
- Clamp, J.R. & Hough, L., 1965. THE PERIODATE OXIDATION OF AMINO ACIDS WITH REFERENCE TO STUDIES ON GLYCOPROTEINS. *The Biochemical journal*, 94(1), pp.17–24.
- Coats, S.R. et al., 2011. The lipid a phosphate position determines differential host toll-like receptor 4 responses to phylogenetically related symbiotic and pathogenic bacteria. *Infection and Immunity*, 79(1), pp.203–210.
- Coler, R.N. et al., 2011. Development and characterization of synthetic glucopyranosyl lipid adjuvant system as a vaccine adjuvant. *PLoS ONE*, 6(1), pp.1–12.

- Coler, R.N. et al., 2015. From mouse to man: safety, immunogenicity and efficacy of a candidate leishmaniasis vaccine LEISH-F3+GLA-SE. *Clinical & Translational Immunology*, 4(4), p.e35.
- Coley, W.B., 1910. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus). *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 3(Surg Sect), pp.1–48.
- Conseil de l'Académie nationale, P., 2016. *Académie nationale de Pharmacie « Les adjuvants aluminiques : le point en 2016 »*,
- Cox, A.D. et al., 2003. Phosphorylation of the lipid A region of meningococcal lipopolysaccharide: Identification of a family of transferases that add phosphoethanolamine to lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*, 185(11), pp.3270–3277.
- Cruickshank, R., 1927. The Weil-Felix Reaction in Typhus Fever. *The Journal of hygiene*, 27(1), pp.64–9.
- Darveau, R. & Hancock, R.E.W., 1983. Procedure for Isolation of Bacterial Lipopolysaccharides from Both Smooth and Rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 155(2), pp.831–838.
- Darveau, R.P. & Hancock, R.E.W., 1983. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. *Journal of Bacteriology*, 155(2), pp.831–838.
- Diamond, C.E. et al., 2015. Novel perspectives on non-canonical inflammasome activation. *ImmunoTargets and therapy*, 4, pp.131–41.
- Didierlaurent, A.M. et al., 2009. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(10), pp.6186–97.
- Dragsted, D.M., 2004. Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* under routine laboratory conditions. *Journal of Medical Microbiology*, 53(8), pp.749–754.
- Drifte, G. et al., 2013. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Critical care medicine*, 41(3), pp.820–832.
- Duclaux, E., 1888. *Annales de l'Institut Pasteur : journal de microbiologie / publiées sous le patronage de M. Pasteur*.
- Dunn-Siegrist, I. et al., 2012. Toll-like receptor activation of human cells by synthetic triacylated lipid A-like molecules. *Journal of Biological Chemistry*, 287(20), pp.16121–16131.
- Dunyach-Remy, C., Sotto, A. & Lavigne, J.-P., 2015. Le microbiote cutané : étude de la diversité microbienne et de son rôle dans la pathogénicité. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2015(469), pp.51–58.
- Embry, C.A. et al., 2011. Mechanism of Impaired NLRP3 Inflammasome Priming by Monophosphoryl Lipid A. *Sci. Signal.*, 4(171), p.ra28-.
- Erener, S. et al., 2012. Inflammasome-Activated Caspase 7 Cleaves PARP1 to Enhance the Expression of a Subset of NF-κB

- Target Genes. *Molecular Cell*, 46(2), pp.200–211.
- Evans, J.T. et al., 2003. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi.529. *Expert review of vaccines*, 2(2), pp.219–29.
- Feist, W. et al., 1989. Induction of tumor necrosis factor-alpha release by lipopolysaccharide and defined lipopolysaccharide partial structures. *Immunobiology*, 179(4–5), pp.293–307.
- Field, A.M., Rowatt, E. & Williamst, R.J.P., 1989. The interaction of cations with lipopolysaccharide from *Escherichia coli* C as shown by measurement of binding constants and aggregation reactions. , 263, pp.695–702.
- Finkelman, F.D. et al., 1990. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annual review of immunology*, 8, pp.303–33.
- Forsberg, L.S. & Carlson, R.W., 1998. The structures of the lipopolysaccharides from *Rhizobium etli* strains CE358 and CE359. The complete structure of the core region of *R. etli* lipopolysaccharides. *The Journal of biological chemistry*, 273(5), pp.2747–57.
- Fox, C.B. et al., 2010. Endotoxins: Structure, Function and Recognition. , 53, pp.303–321.
- Franchi, L. & Núñez, G., 2008. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity. *European journal of immunology*, 38(8), pp.2085–9.
- Fujihara, M. et al., 2003. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: Roles of the receptor complex. *Pharmacology and Therapeutics*, 100(2), pp.171–194.
- Fujimoto, Y. et al., 2005. Synthesis of lipid A and its analogues for investigation of the structural basis for their bioactivity. *Journal of endotoxin research*, 11(6), pp.341–347.
- Futoma-koloch, B., 2016. Bacterial Lipopolysaccharide-Dependent Complement Evasion. , (May), pp.8–10.
- Galanos, C. et al., 1972. Biological Activities of Lipid A Complexed with Bovine-Serum Albumin. *European Journal of Biochemistry*, 31(2), pp.230–233.
- Galanos, C., Lüderitz, O. & Westphal, O., 1969. A new method for the extraction of *R* lipopolysaccharides. *European journal of biochemistry / FEBS*, 9, pp.245–249.
- Garçon, N., 2010. Preclinical Development of AS04. In G. Davies, ed. *Vaccine Adjuvants: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 15–27.
- Garçon, N. et al., 2016. Vaccine development: From concept to early clinical testing. *Vaccine*, 34(52), pp.6655–6664.
- Garçon, N., Van Mechelen, M. & Wettendorff, M., 2006. Development and evaluation of AS04, a novel and improved adjuvant system containing MPL and aluminum salt. In *Immunopotentiators in Modern Vaccines*. Elsevier, pp. 161–177.
- Geurtsen, J. et al., 2007. Consequences of the expression of lipopolysaccharide-modifying enzymes for the efficacy and

- reactogenicity of whole-cell pertussis vaccines. *Microbes and Infection*, 9(9), pp.1096–1103.
- Giannini, S.L. et al., 2006. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine*, 24(33–34), pp.5937–5949.
- Gioannini, T.L. et al., 2004. Isolation of an endotoxin-MD-2 complex that produces Toll-like receptor 4-dependent cell activation at picomolar concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(12), pp.4186–91.
- Gioannini, T.L. et al., 2003. Regulation of interactions of endotoxin with host cells. *Journal of endotoxin research*, 9(6), pp.401–408.
- Girard, R. et al., 2003. Lipopolysaccharides from Legionella and Rhizobium stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2. *J. Cell Sci*, 116(Pt 2), pp.293–302.
- Glenny, A.T. et al., 1926. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J Pathol Bacteriol*, 29, pp.38–39.
- Golenbock, D.T. et al., 1991. Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 266(29), pp.19490–19498.
- Grabowicz, M. et al., 2014. A mutant Escherichia coli that attaches peptidoglycan to lipopolysaccharide and displays cell wall on its surface. *eLife*, 4, p.e05334.
- Gram, H.C., 1884. Gram staining. *Fortschritte der Medicin*, 2, pp.185–189.
- Grimont, P.A.D. & Weill, F.-X., 2007. *WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella 9th edition*, Paris.
- Gueniche, A. et al., 2008. Effects of nonpathogenic gram-negative bacterium *Vitreoscilla filiformis* lysate on atopic dermatitis: A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *British Journal of Dermatology*, 159(6), pp.1357–1363.
- Guéniche, A. et al., 2006. Improvement of atopic dermatitis skin symptoms by *Vitreoscilla filiformis* bacterial extract. *European Journal of Dermatology*, 16(4), pp.380–384.
- Gueniche, A. & Breton, L., 2004. Utilisation d'une fraction de lipopolysaccharides de bactérie filamenteuse non-fructifiante non-photosynthétique comme agent immunorégulateur cutané. FR Patent 2879461.
- Guillott, L. et al., 2004. Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: Evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. *Journal of Biological Chemistry*, 279(4), pp.2712–2718.
- Haeffner-cavaillon, N., 1989. Dissociation of Cell-Associated Interleukin-1 (IL-1). , 57(3), pp.791–797.
- Haeffner-Cavaillon, N., Caroff, M. & Cavaillon, J.M., 1989. Interleukin-1 induction by lipopolysaccharides: Structural requirements of the 3-deoxy-d-manno-2-octulosonic acid (KDO). *Molecular Immunology*, 26(5), pp.485–494.

- Hagar, J.A. et al., 2013. Cytoplasmic LPS Activates Caspase-11: Implications in TLR4-Independent Endotoxic Shock. *Science*, 341(6151), pp.1250–1253.
- Hajjar, A.M. et al., 2002. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nature immunology*, 3(4), pp.354–359.
- Hakimi, J. et al., 2016. Screening Vaccine Formulation in Fresh human whole blood. In C. B. Fox, ed. *Vaccine Adjuvants: Methods and Protocols*. N.Y.
- Hakomori, S., 1964. A RAPID PERMETHYLATION OF GLYCOLIPID, AND POLYSACCHARIDE CATALYZED BY METHYLSULFINYL CARBANION IN DIMETHYL SULFOXIDE. *Journal of biochemistry*, 55, pp.205–8.
- Hall, C.L. & Munford, R.S., 1983. Enzymatic deacylation of the lipid A moiety of Salmonella typhimurium lipopolysaccharides by human neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80, pp.6671–6675.
- El Hamidi, A. et al., 2005. Microextraction of bacterial lipid A: easy and rapid method for mass spectrometric characterization. *J Lipid Res*, 46(8), pp.1773–1778.
- Han, J.E. et al., 2010. A nontoxic derivative of lipopolysaccharide increases immune responses to Gardasil® HPV vaccine in mice. *International Immunopharmacology*, 10(2), pp.169–176.
- Han, J.E. et al., 2014. Characterization of the structure and immunostimulatory activity of a vaccine adjuvant, de-O-acylated lipooligosaccharide. *PLoS ONE*, 9(1).
- Hanuszkiewicz, A. et al., 2008. Structural and immunochemical analysis of the lipopolysaccharide from Acinetobacter Iwoffii F78 located outside Chlamydiaceae with a Chlamydia-Specific lipopolysaccharide epitope. *Chemistry - A European Journal*, 14(33), pp.10251–10258.
- Harrison, L.M. et al., 2005. Comparative evaluation of apoptosis induced by Shiga toxin 1 and/or lipopolysaccharides in human monocytic and macrophage-like cells. *Microbial Pathogenesis*, 38(2–3), pp.63–76.
- Hartwell, J. & Shear, M.J., 1943. Nature of the hemor rhage-producing fraction from Serratia marcescens (Bac. prodigious) culture filtrate. *Journal of the National Cancer Institute*, 4, pp.107–122.
- Hata, T.R. & Gallo, R.L., 2008. Antimicrobial peptides, skin infections, and atopic dermatitis. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, 27(2), pp.144–50.
- Hauser, P., Voet, P., Slaoui, M., et al., 1994. US 5776468 A. Vaccine compositions containing 3-O deacylated monophosphoryl lipid A.
- Hauser, P., Voet, P., Moncef, S., et al., 1994. WO 94/21292 A1. Vaccine compositions containing 3-O deacylated monophosphoryl lipid a.
- Heine, H., Rietschel, E.T. & Ulmer, A.J., 2001. The biology of endotoxin. *Mol Biotechnol*, 19(3), pp.279–296.
- Hickman, J. & Ashwell, G., 1966. Isolation of a bacterial lipopolysaccharide from Xanthomonas campestris containing 3-

- acetamido-3, 6-dideoxy-D-galactose and D-rhamnose. *Journal of Biological Chemistry*, 241(6), p.1424.
- Hirschfeld, M. et al., 2000. Cutting Edge: Repurification of Lipopolysaccharide Eliminates Signaling Through Both Human and Murine Toll-Like Receptor 2. *The Journal of Immunology*, 165(2), pp.618–622.
- Hoebe, K. et al., 2003. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature*, 424(6950), pp.743–748.
- Hollaus, R. et al., 2015. Chemical synthesis of Burkholderia Lipid A modified with glycosyl phosphodiester-linked 4-amino-4-deoxy-B-L-arabinose and its immunomodulatory potential. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 21(10), pp.4102–4114.
- Holst, O. et al., 1993. Chemical structure of the lipid A of Escherichia coli J-5. *European Journal of Biochemistry*, 214(3), pp.695–701.
- Isobe, T. et al., 1999. Bordetella pertussis waaA encodes a monofunctional 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase that can complement an Escherichia coli waaA mutation. *Journal of bacteriology*, 181(8), pp.2648–51.
- Jacobs, D. & Morrison, D., 1975. Dissociation between mitogenicity and immunogenicity of TNP- lipopolysaccharide, a T-independent antigen. *Journal of Experimental Medicine*, 141(6).
- Jacobson, R.M., 2003. Vaccine safety. *Immunology and allergy clinics of North America*, 23(4), pp.589–603.
- Janeway, C.A., 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. pp. 1–13.
- Janusch, H. et al., 2002. Structural and biological characterization of highly purified hepta-acyl lipid A present in the lipopolysaccharide of the Salmonella enterica sv. Minnesota Re deep rough mutant strain R595. *Journal of endotoxin research*, 8(5), pp.343–56.
- Jeyaretnam, B. et al., 2002. Characterization of a novel lipid-A from Rhizobium species Sin-1. A unique lipid-A structure that is devoid of phosphate and has a glycosyl backbone consisting of glucosamine and 2-aminogluconic acid. *The Journal of biological chemistry*, 277(44), pp.41802–10.
- Jiang, Z. et al., 2005. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nature immunology*, 6(6), pp.565–570.
- John, C.M., Liu, M. & Jarvis, G.A., 2009. Natural phosphoryl and acyl variants of lipid A from Neisseria meningitidis strain 89I differentially induce tumor necrosis factor-alpha in human monocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 284(32), pp.21515–21525.
- Johnson, A.G., 1994. Molecular adjuvants and immunomodulators: new approaches to immunization. *Clinical microbiology reviews*, 7(3), pp.277–89.
- Karas, M. & Hillenkamp, F., 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical chemistry*, 60(20), pp.2299–301.



- Karibian, D. et al., 1991. 252Cf-plasma desorption mass spectrometry applied to the analysis of endotoxin Lipid A preparations. , pp.273–286.
- Karibian, D. et al., 1999. 252Cf-plasma desorption mass spectrometry of unmodified lipid A: fragmentation patterns and localization of fatty acids. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 13(22), pp.2252–2259.
- Karibian, D., Deprun, C. & Caroff, M., 1993. Comparison of lipids A of several Salmonella and Escherichia strains by 252Cf plasma desorption mass spectrometry. *J Bacteriol*, 175(10), pp.2988–2993.
- Kasai, N. & Nowotny, A., 1967. Endotoxic Glycolipid from a Heptoseless Mutant of Salmonella minnesota. *J. Bacteriol.*, 94(6), pp.1824–1836.
- Kawai, T. et al., 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, 11(1), pp.115–122.
- Kawai, T. & Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, 11(5), pp.373–84.
- Kawai T & Akira, S., 2005. Pathogen recognition with TLRs. *Curr Opin Immunol*, 17, pp.338–344.
- Kawana, N. et al., 2014. Molecular Network of NLRP3 Inflammasome Activation-Responsive Genes in a Human Monocyte Cell Line. *Austin J Clin Immunol. Austin J Clin Immunol*, 1(1), pp.1017–4.
- Kawasaki, K. et al., 2000. Mouse Toll-like Receptor 4 MD-2 Complex Mediates Lipopolysaccharide-mimetic Signal Transduction by Taxol. *Journal of Biological Chemistry*, 275(4), pp.2251–2254.
- Kawasaki, K., Ernst, R.K. & Miller, S.I., 2004. Deacylation and palmitoylation of lipid A by Salmonellae outer membrane enzymes modulate host signaling through Toll-like receptor 4. *Journal of endotoxin research*, 10(6), pp.439–44.
- Kawasaki, Y. et al., 2004. Evaluation of T helper-1/-2 balance on the basis of IgG subclasses and serum cytokines in children with glomerulonephritis. *American Journal of Kidney Diseases*, 44(1), pp.42–49.
- Kayagaki, N. et al., 2015. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*, 526(7575), pp.666–671.
- Kayagaki, N. et al., 2011. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*, 479(7371), pp.117–121.
- Kayagaki, N. et al., 2013. Noncanonical Inflammasome Activation by Intracellular LPS Independent of TLR4. *Science*, 341(6151), pp.1246–1249.
- Knirel, Y.A. et al., 2001. Structural analysis of the lipopolysaccharide core of a rough, cystic fibrosis isolate of Pseudomonas aeruginosa. *European journal of biochemistry*, 268(17), pp.4708–19.
- Knirel, Y.A. & Valvano, M.A., 2011. Bacterial Lipopolysaccharides: Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cells.
- Kohchi, C. et al., 2009. ROS and innate immunity. *Anticancer Research*, 29(3), pp.817–822.

- Kolmos, H.J., 2006. Panum's studies on "putrid poison" 1856. An early description of endotoxin. *Danish Medical Bulletin*, 53(4), pp.450–452.
- Kutuzova, G.D. et al., 2001. Diphosphoryl Lipid A from *Rhodobacter sphaeroides* Blocks the Binding and Internalization of Lipopolysaccharide in RAW 264.7 Cells. *The Journal of Immunology*, 167(1), pp.482–489.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–685.
- Lamkanfi, M. et al., 2007. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death and Differentiation Differ*, 14(1), pp.44–55.
- Larrouy-Maumus, G. et al., 2016. Direct detection of lipid A on intact Gram-negative bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 120, pp.68–71.
- Lee, S. & Nguyen, M.T., 2015. Recent Advances of Vaccine Adjuvants for Infectious Diseases. *IMMUNE NETWORK*, 15(2), pp.51–57.
- Lemaitre, B. et al., 1995. A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(21), pp.9465–9.
- Lerouge, I. & Vanderleyden, J., 2002. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant–microbe interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(1).
- Li, L. & Luo, R.G., 1998. Use of Ca<sup>2+</sup> to re-aggregate lipopolysaccharide (LPS) in hemoglobin solutions and the subsequent removal of endotoxin by ultrafiltration. *Biotechnology Techniques*, 12(2), pp.119–122.
- Liu, L., Roberts, A.A. & Ganz, T., 2003. By IL-1 signaling, monocyte-derived cells dramatically enhance the epidermal antimicrobial response to lipopolysaccharide. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(1), pp.575–80.
- Loppnow, H. et al., 1989. IL-1 induction-capacity of defined lipopolysaccharide partial structures. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 142(9), pp.3229–3238.
- Maeshima, N. & Fernandez, R.C., 2013. Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3(3), pp.1–13.
- Mahe, Y.F. et al., 2013. A new *Vitreoscilla filiformis* extract grown on spa water-enriched medium activates endogenous cutaneous antioxidant and antimicrobial defenses through a potential Toll-like receptor 2/protein kinase C, zeta transduction pathway. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 6, pp.191–196.
- Mahe, Y.F. et al., 2006. Induction of the skin endogenous protective mitochondrial MnSOD by *Vitreoscilla filiformis* extract. *International Journal of Cosmetic Science*, 28(4), pp.277–287.
- Mahe, Y.F. & Martin, R., 2008. Use of a *Vitreoscilla filiformis* lipopolysaccharide fraction as an agent for stimulating the synthesis of anti-microbial skin peptides. EP Patent 1974720(A1).

- Malyala, P. & Singh, M., 2008. Endotoxin limits in formulations for preclinical research. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(6), pp.2041–2044.
- Mancek-Keber, M. & Jerala, R., 2015. Postulates for validating TLR4 agonists. *European Journal of Immunology*, 45(2), pp.356–370.
- Mangan, D.F. et al., 1991. Lipopolysaccharide , tumor necrosis factor-alpha , and IL-1 beta prevent programmed cell death ( apoptosis ) in human peripheral blood monocytes . Information about subscribing to The Journal of Immunology is online at : PROGRAMMED CELL DEATH ( APOPTOSIS. *journal of immunology*, (146), pp.1541–1546.
- Manthey, C.L. & Vogel, S.N., 1994. Elimination of trace endotoxin protein from rough chemotype LPS. *Innate Immunity*, 1(2), pp.84–91.
- Marr, N. et al., 2008. Glucosamine found as a substituent of both phosphate groups in Bordetella lipid A backbones: role of a BvgAS-activated ArnT ortholog. *J Bacteriol*, 190(12), pp.4281–4290.
- Marr, N., Hajjar, A.M., et al., 2010. Substitution of the bordetella pertussis lipid a phosphate groups with glucosamine is required for robust nf- $\kappa$ b activation and release of proinflammatory cytokines in cells expressing human but not murine toll-like receptor 4-MD-2-CD14. *Infection and Immunity*, 78(5), pp.2060–2069.
- Marr, N., Novikov, A., et al., 2010. Variability in the lipooligosaccharide structure and endotoxicity among Bordetella pertussis strains. *The Journal of infectious diseases*, 202(12), pp.1897–906.
- Martin, R., 2005. Lipid A -type compound and composition containing It. US2005/0118118 (A1). , pp.1–10.
- Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J., 2002. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . *Molecular Cell*, 10(2), pp.417–426.
- Mata-Haro, V. et al., 2007. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5831), pp.1628–32.
- Mathison, J.C. et al., 1992. Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. A key component in macrophage recognition of gram-negative LPS. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 149(1), pp.200–6.
- Matsuura, M., 2013. Structural modifications of bacterial lipopolysaccharide that facilitate gram-negative bacteria evasion of host innate immunity. *Frontiers in Immunology*, 4(MAY), pp.1–9.
- McAleer, J.P. & Vella, A.T., 2008. Understanding how lipopolysaccharide impacts CD4 T-cell immunity. *Critical reviews in immunology*, 28(4), pp.281–99.
- McGirt, L.Y. & Beck, L.A., 2006. Innate immune defects in atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 202–208.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C.J., 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640), pp.394–397.

- Meyer, B.K. et al., 2007. Antimicrobial preservative use in parenteral products: Past and present. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(12), pp.3155–3167.
- Michael, F.S. et al., 2004. Structural analysis of the lipopolysaccharide derived core oligosaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, 5a and the genome strain 5b. *Carbohydrate Research*, 339(11), pp.1973–1984.
- Micoli, F. et al., 2013. A scalable method for O-antigen purification applied to various *Salmonella* serovars. *Analytical Biochemistry*, 434(1), pp.136–145.
- Mohan, T., Verma, P. & Nageswara Rao, D., 2013. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead. *Indian Journal of Medical Research*, 138(NOV), pp.779–795.
- Moran, A.P. et al., 1991. Chemical characterization of *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides containing N-acetylneuraminic acid and 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-glucose. *Journal of bacteriology*, 173(2), pp.618–26.
- Morrison, D.C. & Kline, L.F., 1977. Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 118, pp.362–368.
- Mulhradt, P.F. & Golecki, J.R., 1975. Asymmetrical Distribution and Artifactual Reorientation of Lipopolysaccharide in the Outer Membrane Bilayer of *Salmonella typhimurium*. *European Journal of Biochemistry*, 51(2), pp.343–352.
- Muller-Decker, K. et al., 2005. Inhibition of cell proliferation by bacterial lipopolysaccharides in TLR4-positive epithelial cells: Independence of nitric oxide and cytokine release. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(3), pp.553–561.
- Muroi, M. & Tanamoto, K. ichi, 2002. The polysaccharide portion plays an indispensable role in *Salmonella* lipopolysaccharide-induced activation of NF- $\kappa$ B through human toll-like receptor 4. *Infection and Immunity*, 70(11), pp.6043–6047.
- Myers, K.R. & Snyder, S., 2002. WO 2002078637 A2. Methods for the production of 3-o-deactivated-4'-monophosphoryl lipid a (3d-mla).
- Navarro, A. et al., 2003. Antibody responses to *Escherichia coli* O157 and other lipopolysaccharides in healthy children and adults. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 10(5), pp.797–801.
- Neidhardt, F.C. & Curtiss, R., 1996. *Escherichia coli and Salmonella : cellular and molecular biology*,
- Netea, M.G., Kullberg, B.J. & Van der Meer, J.W., 2000. Circulating cytokines as mediators of fever. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 31 Suppl 5, pp.S178–S184.
- Novikov, A. et al., 2013. Complete *Bordetella avium*, *Bordetella hinzii* and *Bordetella trematum* lipid A structures and genomic sequence analyses of the loci involved in their modifications. *Innate immunity*, 20(6), pp.659–672.
- O'Hagan, D.T., 2009. US2009214592A1. Adjuvant composition comprising aluminium phosphate and 3D-MPL.
- O'Hagan, D.T. & De Gregorio, E., 2009. The path to a successful vaccine adjuvant - "The long and winding road." *Drug Discovery Today*, 14(11–12), pp.541–551.

- O'Neill, L.A.J., Golenbock, D. & Bowie, A.G., 2013. The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(6), pp.453–460.
- O’Ryan, M. et al., 2015. Vaccines for viral and bacterial pathogens causing acute gastroenteritis: Part II: Vaccines for Shigella, Salmonella, enterotoxigenic E. coli (ETEC) enterohemorrhagic E. coli (EHEC) and Campylobacter jejuni. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 11(3), pp.601–619.
- Oliviero, F. et al., 2012. Poster: Le phorbol myristate acétate, utilisé pour induire la transcription du gène de la pro-IL-1 $\beta$ , affecte fortement l’apoptose et la viabilité cellulaire dans le modèle de l’inflammation par microcristaux. *25<sup>ème</sup> congrès de la société française de rhumatologie*.
- Opiyo, S.O. et al., 2010. Evolution of the Kdo2-lipid A biosynthesis in bacteria. *BMC evolutionary biology*, 10, p.362.
- Osborn, M.J., Gander, J.E. & Parisi, E., 1972. Mechanism of assembly of the outer membrane of Salmonella typhimurium. Site of synthesis of lipopolysaccharide. *The Journal of biological chemistry*, 247(12), pp.3973–86.
- Park, B.S. et al., 2009a. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, 458(7242), pp.1191–5.
- Park, B.S. et al., 2009b. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, 458(7242), pp.1191–5.
- Park, B.S. & Lee, J.-O., 2013. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & molecular medicine*, 45(12), p.e66.
- Park, H.S. et al., 2004. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(6), pp.3589–3593.
- Pellegrini, M. et al., 2009. MF59-adjuvanted versus non-adjuvanted influenza vaccines: integrated analysis from a large safety database. *Vaccine*, 27(49), pp.6959–65.
- Peng, D. et al., 2005. Moraxella catarrhalis Bacterium without Endotoxin, a Potential Vaccine Candidate. *Infection and Immunity*, 73(11), pp.7569–7577.
- Perdomo, R. & Montero, V., 2006. Purification of E. coli O55:B5 lipopolysaccharides by size exclusion chromatography. *Biotecnología Aplicada*, 23, pp.124–129.
- Perry, B., MacLean, L.L. & Griffith, W., 1986. Structure of the O-chain polysaccharide of the phenol-phase soluble lipopolysaccharide of Escherichia coli O157:H7. *biochemistry and cell biology*, 7.
- Pfeiffer, R., 1892. Untersuchungen über das Cholera Gift. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 11(1), pp.393–412.
- Pieretti, G. et al., 2014. A combined fermentative-chemical approach for the scalable production of pure E. coli monophosphoryl lipid A. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(18), pp.7781–7791.

- Poltorak, A., 1998. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science*, 282(5396), pp.2085–2088.
- Pugin, J. et al., 1993. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(7), pp.2744–8.
- Qureshi, N., Takayama, K. & Ribi, E., 1982. Purification and structural determination of nontoxic lipid A obtained from the lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Biological Chemistry*, 257(19), pp.11808–11815.
- Raetz, C.R. et al., 2007. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem*, 76, pp.295–329.
- Raetz, C.R.H. et al., 2006. Kdo<sub>2</sub>-Lipid A of *Escherichia coli*, a defined endotoxin that activates macrophages via TLR-4. *Journal of lipid research*, 47(5), pp.1097–1111.
- Raetz, C.R.H. & Whitfield, C., 2002. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), pp.635–700.
- Rappuoli, R. et al., 2011. Vaccines for the twenty-first century society. *Nat Rev Immunol*, 11(12), pp.865–872.
- Rautemaa, R. & Seppo, M., 1999. Complement-resistance mechanisms of bacteria. *Microbes and Infection*, 1(10), pp.785–794.
- Reed, C.E. & Milton, D.K., 2001. Endotoxin-stimulated innate immunity: A contributing factor for asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108(2), pp.157–166.
- Register, K.B. & Sanden, G.N., 2006. Prevalence and sequence variants of IS481 in *Bordetella bronchiseptica*: implications for IS481-based detection of *Bordetella pertussis*. *Journal of clinical microbiology*, 44(12), pp.4577–83.
- Reife, R.A. et al., 2006. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide lipid A heterogeneity: differential activities of tetra- and penta-acylated lipid A structures on E-selectin expression and TLR4 recognition. *Cellular Microbiology*, 8(5), pp.857–868.
- Ribi, E. et al., 1979. Peptides as requirement for immuno therapy of the guinea-pig line-10 tumor with endotoxins. *Cancer immunology, immunotherapy*, 58, pp.43–58.
- Richards, S.M., Strandberg, K.L. & Gunn, J.S., 2010. *Salmonella*-Regulated Lipopolysaccharide Modifications. In pp. 101–122.
- Ridley, B.L., Jeyaretnam, B.S. & Carlson, R.W., 2000. The type and yield of lipopolysaccharide from symbiotically deficient rhizobium lipopolysaccharide mutants vary depending on the extraction method. *Glycobiology*, 10(10), pp.1013–23.
- Riehl, T.E. et al., 2004. TNFR1 mediates the radioprotective effects of lipopolysaccharide in the mouse intestine. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 286(1), pp.G166-73.
- Rokhsartalab-Azar, S. et al., 2015. Synthesis, characterization and immunological properties of *Escherichia coli* O157:H7 lipopolysaccharide- diphtheria toxoid conjugate vaccine. *Iranian journal of microbiology*, 7(3), pp.150–5.
- Rosewich, M., Lee, D. & Zielen, S., 2013. Pollinex Quattro: An innovative four injections immunotherapy In allergic rhinitis.

- Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(7), pp.1523–1531.
- Rozis, G. et al., 2008. Human Langerhans' cells and dermal-type dendritic cells generated from CD34 stem cells express different toll-like receptors and secrete different cytokines in response to toll-like receptor ligands. *Immunology*, 124(3), pp.329–38.
- Ryan, K.A. et al., 2004. Reactive Oxygen and Nitrogen Species Differentially Regulate Toll-Like Receptor 4-Mediated Activation of NF- $\kappa$ B and Interleukin-8 Expression. *Infection and Immunity*, 72(4), pp.2123–2130.
- Sagan, L., 1967. On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14(3), p.225–IN6.
- Saha, D.C. et al., 2001. Monophosphoryl lipid A stimulated up-regulation of reactive oxygen intermediates in human monocytes in vitro. *Journal of leukocyte biology*, 70(3), pp.381–5.
- Sahly, H. et al., 2003. Burkholderia is highly resistant to human beta-defensin 3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(5), pp.1739–1741.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual* 2nd ed. Cold spring Harbor Laboratory, ed., N.Y.: Cold Spring Harbor.
- Santambrogio, L. et al., 2005. Involvement of caspase-cleaved and intact adaptor protein 1 complex in endosomal remodeling in maturing dendritic cells. *Nature immunology*, 6(10), pp.1020–8.
- Satoh, M. et al., 2003. Induction of lupus autoantibodies by adjuvants. *Journal of autoimmunity*, 21(1), pp.1–9.
- Savva, A. & Roger, T., 2013. Targeting Toll-Like Receptors: Promising Therapeutic Strategies for the Management of Sepsis-Associated Pathology and Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology*, 4, p.387.
- Schröder, J.-M. & Harder, J., 2006. Peptides antimicrobiens naturels cutanés. *M/S : médecine sciences*, 22(2), pp.153–157.
- Schrohm, A.B. et al., 1998. The charge of endotoxin molecules influences their conformation and IL-6-inducing capacity. *J Immunol*, 161(10), pp.5464–5471.
- Schrohm, a B. et al., 2001. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *The Journal of experimental medicine*, 194(1), pp.79–88.
- Schumann, R. et al., 1990. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4975), pp.1429–1431.
- Schwartz, K.L. et al., 2016. Effectiveness of pertussis vaccination and duration of immunity. , pp.1–8.
- Sender, R. et al., 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biology*, 14(8), p.e1002533.
- Shah, N.R. et al., 2013. Minor modifications to the phosphate groups and the C3' acyl chain length of lipid A in two *Bordetella pertussis* strains, BP338 and 18-323, independently affect Toll-like receptor 4 protein activation. *The*

- Journal of biological chemistry*, 288(17), pp.11751–60.
- Shibaki, a & Katz, S.I., 2002. Induction of skewed Th1/Th2 T-cell differentiation via subcutaneous immunization with Freund's adjuvant. *Experimental dermatology*, 11(2), pp.126–34.
- Shimazu, R. et al., 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *The Journal of experimental medicine*, 189(11), pp.1777–82.
- Shinichi, O. et al., 1975. Degradation of lipopolysaccharide of Escherichia coli by hot phenol extraction. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 21, pp.169–184.
- Silipo, A. et al., 2009. Glycoconjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiology*, 20(4), pp.406–419.
- Simin Rezanian Bahman Tabarraei, Mahmood Jeddi-Tehrani, N.A. & Omid Zarei Faramarz Masjedian, and Amir Hassan Zarnani, R.A., 2011. Extraction, Purification and Characterization of Lipopolysaccharide from Escherichia coli and Salmonella typhi. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 3(1), pp.1–7.
- Singer, M. et al., 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8), p.801.
- Smith, A.E. et al., 2008. PagP activation in the outer membrane triggers R3 core oligosaccharide truncation in the cytoplasm of Escherichia coli O157:H7. *Journal of Biological Chemistry*, 283(7), pp.4332–4343.
- Smith, D.R., 2016. Vaccination of Cattle against Escherichia coli O157:H7.
- Song, E.S. et al., 2007. Adjuvant effect of CIA07, a combination of Escherichia coli DNA fragments and modified lipopolysaccharides, on the immune response to hepatitis B virus surface antigen. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 51(3), pp.496–504.
- Song, P.I. et al., 2002. Human Keratinocytes Express Functional CD14 and Toll-Like Receptor 4. *J Invest Dermatol*, 119(2), pp.424–432.
- Sori, A.J. et al., 1988. The gut as source of sepsis after hemorrhagic shock. *American journal of surgery*, 155(2), pp.187–92.
- Stowe, I., Lee, B. & Kayagaki, N., 2015. Caspase-11: Arming the guards against bacterial infection. *Immunological Reviews*, 265(1), pp.75–84.
- Strain, S.M., Fesik, S.W. & Armitage, I.M., 1983. Characterization of Lipopolysaccharide from a Heptoseless Mutant of Escherichia coli by Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance. *J.Biol.Chem.*, 258(5), pp.2906–2910.
- Sturiale, L. et al., 2011. Reflectron MALDI TOF and MALDI TOF/TOF mass spectrometry reveal novel structural details of native lipooligosaccharides. *Journal of Mass Spectrometry*, (46), pp.1135–1142.
- Su, B. et al., 2008. The effects of IL-6 and TNF- $\alpha$  as molecular adjuvants on immune responses to FMDV and maturation of dendritic cells by DNA vaccination. *Vaccine*, 26(40), pp.5111–5122.
- Sun, Y. et al., 2015. Inhibitory Effects of Antimicrobial Peptides on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. *Mediators of*



- Inflammation*, 2015, pp.1–8.
- Suzuki, T. et al., 2004. Mechanisms involved in apoptosis of human macrophages induced by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the presence of cycloheximide. *Infection and immunity*, 72(4), pp.1856–65.
- Sweet, C.R. et al., 2001. A *Chlamydia trachomatis* UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase selective for myristoyl-acyl carrier protein: Expression in *Escherichia coli* and formation of hybrid lipid A species. *Journal of Biological Chemistry*, 276(22), pp.19565–19574.
- Sweet, C.R. et al., 2004. Enzymatic synthesis of lipid A molecules with four amide-linked acyl chains. LpxA acyltransferases selective for an analog of UDP-N-acetylglucosamine in which an amine replaces the 3'-hydroxyl group. *The Journal of biological chemistry*, 279(24), pp.25411–9.
- Szentivanyi, A., Friedman, H. & Nowotny, A. (Alois), 1986. *Immunobiology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins*, Springer US.
- Takayama, K. et al., 1989. Diphosphoryl lipid A from *Rhodopseudomonas sphaeroides* ATCC 17023 blocks induction of cachectin in macrophages by lipopolysaccharide. *Infection and immunity*, 57(4), pp.1336–8.
- Takayama, K., Qureshi, N. & Raetz, C.R.H., 1984. Influence of fine structure of lipid A on limulus amoebocyte lysate clotting and toxic activities. *Infection and Immunity*, 45(2), pp.350–355.
- Tanamoto, K.I., Zahringer, U. & McKenzie, G.R., 1984. Biological activities of synthetic Lipid A analogs: Pyrogenicity, lethal toxicity, anticomplement activity, and induction of gelation of *Limulus amoebocyte lysate*. *Infection and Immunity*, 44(2), pp.421–426.
- Tang, Y. et al., 1998. *Bordetella holmesii*-Like Organisms Associated with Septicemia, Endocarditis, and Respiratory Failure. *Clinical Infectious Diseases*, 26(2), pp.389–392.
- Teghanemt, A. et al., 2005. Molecular Basis of Reduced Potency of Underacylated.
- Therisod, H., Labas, V. & Caroff, M., 2001. Direct microextraction and analysis of rough-type lipopolysaccharides by combined thin-layer chromatography and MALDI mass spectrometry. *Anal Chem*, 73(16), pp.3804–3807.
- Thompson, B.S. et al., 2005. The low-toxicity versions of LPS, MPL adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4<sup>+</sup> T cells. *Journal of leukocyte biology*, 78(December), pp.1273–1280.
- Tirsoaga, A., El Hamidi, A., et al., 2007. A rapid, small-scale procedure for the structural characterization of lipid A applied to *Citrobacter* and *Bordetella* strains: discovery of a new structural element. *J Lipid Res*, 48(11), pp.2419–2427.
- Tirsoaga, A., Novikov, A., et al., 2007. Simple method for repurification of endotoxins for biological use. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), pp.1803–1808.
- Tissières, P. & Pugin, J., 2009. The role of MD-2 in the opsonophagocytosis of Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 22, pp.286–291.

- Trent, M.S. et al., 2006. Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. *Journal of endotoxin research*, 12(4), pp.205–223.
- Tsai, C.M. & Frasch, C.E., 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 119(1), pp.115–119.
- Tsang, J.C., Wang, C.S. & Alaupovic, P., 1974. Degradative effect of phenol on endotoxin and lipopolysaccharide preparations from *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 117(2), pp.786–795.
- Tsuchiya, M., 2014. Possible Mechanism of Low Endotoxin Recovery. *Microbiology*.
- Ulrich, J.T. & Myers, K.R., 1995. Monophosphoryl lipid A as an adjuvant. Past experiences and new directions. *Pharm.Biotechnol.*, 6, pp.495–524.
- Ulrich, T.J., 2000. *Vaccine Adjuvants: preparation, methods and research protocols. MPL Immunostimulant : Adjuvant* HumanaPres. D. T. O'Hagan, ed., Totowa, NJ.
- Uy, B., McGlashan, S.R. & Shaikh, S.B., 2011. Measurement of reactive oxygen species in the culture media using Acridan lumigen PS-3 assay. *Journal of Biomolecular Techniques*, 22(3), pp.95–107.
- Vaure, C. & Liu, Y., 2014. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Frontiers in immunology*, 5, p.316.
- Vesy, C.J. et al., 2000. Lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein release lipopolysaccharides from gram-negative bacterial membranes. *Infection and Immunity*, 68(5), pp.2410–2417.
- Vinogradov, E. V et al., 1997. Structural investigation of the lipopolysaccharide from *Acinetobacter haemolyticus* strain NCTC 10305 (ATCC 17906, DNA group 4). *European journal of biochemistry / FEBS*, 247, pp.82–90.
- Viriyakosol, S. et al., 2001. MD-2 Binds to Bacterial Lipopolysaccharide. *Journal of Biological Chemistry*, 276(41), pp.38044–38051.
- Volz, T. et al., 2014. Nonpathogenic bacteria alleviating atopic dermatitis inflammation induce IL-10-producing dendritic cells and regulatory Tr1 cells. *The Journal of investigative dermatology*, 134(1), pp.96–104.
- Wang, X. & Quinn, P.J., 2010. *Endotoxins: structure, function and recognition*,
- Wang, Z. et al., 2009. Structural characterization of the lipopolysaccharide O-antigen from atypical isolate of *Vibrio anguillarum* strain 1282. *Carbohydrate Research*, 344(11), pp.1371–1375.
- Weary, M.E. et al., 1980. Relative potencies of four reference endotoxin standards as measured by the *Limulus amoebocyte* lysate and USP rabbit pyrogen tests. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(6), pp.1148–1151.
- Wells, A.S. et al., 2012. Use of Enzymes in the Manufacture of Active Pharmaceutical Ingredients: A Science and Safety-Based Approach To Ensure Patient Safety and Drug Quality. *American chemical society*, (16), pp.1986–1993.
- Westphal, O. & Lüderitz, O., 1954. Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien. *Angewandte*

- Chemie*, 66(13–14), pp.407–417.
- Westphal, O., Lüderitz, O. & Bister, F., 1952. Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 7(3), pp.148–155.
- Westphal & Jann, 1965. Bacterial lipopolysaccharide. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbohydr. Chem.*, 5, p.83–91.
- WHO, 2008. WHO | Statement from the Global Advisory Committee on Vaccine Safety on aluminium-containing vaccines. WHO.
- Wollenweber, H.W. & Rietschel, E.T., 1990. Analysis of lipopolysaccharide (lipid A) fatty acids. *Journal of Microbiological Methods*, 11(3–4), pp.195–211.
- World Health Organization, 2013. Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines ©. , (October), pp.21–25.
- Wright, S.D. et al., 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4975), pp.1431–3.
- Wu, T.T., Chen, T.L. & Chen, R.M., 2009. Lipopolysaccharide triggers macrophage activation of inflammatory cytokine expression, chemotaxis, phagocytosis, and oxidative ability via a toll-like receptor 4-dependent pathway: Validated by RNA interference. *Toxicology Letters*, 191(2–3), pp.195–202.
- Wurfel, M.M. et al., 1994. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *The Journal of experimental medicine*, 180(3), pp.1025–35.
- Yamamoto, M. et al., 2002. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*, 420(6913), pp.324–329.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., et al., 2003. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nature immunology*, 4(11), pp.1144–50.
- Yamamoto, M., Sato, S. & Hemmi, H., 2003. Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway. *Science*, 301(August), pp.640–643.
- Zaehring, U. et al., 1994. Rietschel, E. T. et al. Bacterial endotoxin : molecular relationships of structure to activity ships of struetui to. , (MARCH), pp.217–225.
- Zähringer, U. et al., 2008. TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology*, 213(3–4), pp.205–224.
- Zariri, A. & van der Ley, P., 2015. Biosynthetically engineered lipopolysaccharide as vaccine adjuvant. *Expert Review of Vaccines*, 14(6), pp.861–876.



**Title:** Extraction, Characterization and Detoxification of Endotoxins for Human Applications.

**Keywords:** Endotoxins, Lipid A, Structure-activity relationships, Immune System, Adjuvants, Analytical Methods.

**Abstract:** Lipopolysaccharides (LPS) are the main components of the outer membrane of Gram negative bacteria. They are composed of a polysaccharide moiety linked to a lipid one, the lipid A. These structures are different from one bacterium to the other. They are also able to be modified by enzymatic post-translational modifications in response to external stimuli. Each bacterium possesses its own footprint shown by the unique structure of its LPS. LPS are recognized by the MD-2:TLR4 receptor. This complex distinguishes the lipid A structures and it activates some signalling pathways with a structure dependant manner. LPS are studied for their harmful effects, especially for their implication in the inflammatory cascade leading to septic shock. However, LPS keep multiple beneficial activities. In the context of this thesis, we have explored two kinds of beneficial activities for human.

Structural analysis of LPS by mass spectrometry is an indispensable step to understand their biological activities. We propose two new micromethods of analysis directly applied on bacterial membranes. We can identify quickly the LPS molecules as close as possible to their native configurations. Thus, we can check the LPS structures before their extraction. This powerful method could be developed as a rapid tool for pathogens detection.

Then, we studied the structure-activity relationships of naturally low-toxic, but active LPS at the skin level. They are compounds of the *Vitreoscilla filiformis* bacterial lysate. This lysate is used in dermatological and cosmetic creams to treat atopic dermatitis. Lipids A are composed of short fatty-acid chains (10 and 12 carbons), and the phosphate groups can be substituted by ethanolamine-phosphate. The biological activities induced by these LPS take place as defense mechanisms to improve the immune response against pathogens.

Moreover, the adjuvant capability of LPS is another well studied beneficial activity. LPS are naturally too toxic to be used as vaccine adjuvant. We characterized chemically detoxified LPS and we established and realized different « screening » tests to evaluate their adjuvanticity and non-pyrogenicity.

Finally, for human therapeutic applications, LPS must be produced on a large scale. We exposed the compatibility between the LPS-BioSciences process of production at the industrial scale and the medical regulation. One improvement of the extraction method is proposed in order to extract about one gram of LPS. The process is compatible with the good manufacturing practices.

## **Titre :** Extraction, Caractérisation et Détoxification des Endotoxines pour des Applications chez l'Homme.

**Mots clés :** Endotoxines, Lipide A, Relations structure-activité, Système immunitaire, Adjuvants, Méthodes analytiques.

**Résumé :** Les lipopolysaccharides (LPS) sont les constituants majeurs de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Ils sont composés d'un polysaccharide (PS) relié à une région lipidique : le lipide A. Ces structures sont très variables d'une bactérie à l'autre. Elles sont aussi susceptibles de subir des modifications post-traductionnelles par des enzymes en réponse à des stimuli extérieurs. Chaque bactérie possède sa propre signature représentée par la structure unique de ses LPS. Les LPS sont reconnus par le récepteur MD-2 :TLR4. Ce complexe discrimine la structure des lipides A et déclenche de façon structure-dépendante ses voies de signalisation. Les LPS sont très étudiés pour leurs activités néfastes, notamment dans le déclenchement de la cascade inflammatoire qui mène au choc septique. Cependant ils présentent aussi de multiples activités bénéfiques. Dans le cadre de cette thèse, nous avons exploré deux types d'activités bénéfiques des LPS chez l'homme.

L'analyse structurale des LPS par spectrométrie de masse est une étape indispensable pour comprendre leurs activités biologiques. Nous proposons deux nouvelles micro-méthodes d'analyse appliquées directement sur les membranes bactériennes. Ceci nous permet d'identifier plus rapidement les molécules de LPS au plus proche de leurs configurations natives, en évitant les artefacts dus à l'extraction. Cette méthode puissante pourra également être développée comme outil de détection rapide de pathogènes.

Ensuite, nous avons étudié la relation structure-activité de LPS naturellement peu toxiques mais actifs au niveau cutané. Ce sont des composés du lysat bactérien de *Vitreoscilla filiformis* contenus dans des crèmes dermatologiques et cosmétiques visant à traiter la dermatite atopique. Les lipides A possèdent des chaînes courtes d'acides gras et les groupes phosphates peuvent être substitués par des groupements phosphoéthanolamines. Les activités biologiques induites par ces LPS prennent place comme des mécanismes de défense pour améliorer la réponse immune et lutter contre les pathogènes.

En outre, le pouvoir adjuvant des LPS est l'une de leurs activités bénéfiques les plus étudiées. Les LPS sont naturellement trop toxiques pour être utilisés tels quels. Nous avons, caractérisé des LPS détoxifiés par modifications chimiques, établi et effectué différents tests de « screening » permettant d'évaluer leur adjuvantité et leur non-pyrogénicité.

Enfin, pour des applications thérapeutiques chez l'homme, les LPS doivent être produits en grandes quantités. Nous exposons la compatibilité du procédé de production de la société LPS-BioSciences à l'échelle industrielle et la réglementation des médicaments. Une amélioration de la méthode d'extraction est proposée pour extraire des quantités de l'ordre du gramme. De plus, le procédé de production est réalisable en respectant les bonnes pratiques de fabrication des médicaments.