

**UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY**

ANNEE : 2006

DES N°

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE**

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE

Pour l'obtention du Diplôme d'Etat de

DOCTEUR EN PHARMACIE

Présenté devant le Jury Interrégional

Le 11 octobre 2006

Par Mlle **Angélique CHAUVINEAU**

**ROLES DE LA LEPTINE ET DU « VASOACTIVE INTESTINAL
PEPTIDE » AU COURS DES REPONSES INFLAMMATOIRES : ETUDE
DE LEURS EFFETS SUR LES FONCTIONS ET L'APOPTOSE DES
POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES HUMAINS**

JURY :

Président : Madame le Professeur Delphine BORGEL

Membres : Monsieur le Professeur Jean-Marc GOMBERT

Madame le Docteur Chantal ANDRE

Madame le Docteur Carole ELBIM

REMERCIEMENTS

Je souhaite dans un premier temps remercier ma directrice de thèse, le Docteur Carole Elbim. Qu'elle reçoive ici l'expression de ma gratitude et de ma reconnaissance pour m'avoir proposé ce sujet de thèse, mais surtout pour son soutien, sa gentillesse, la qualité de ses conseils et de son encadrement scientifique.

Mes plus sincères remerciements vont également au Professeur Marie-Anne Gougerot Pocidalo pour l'attention et le soutien qu'elle a portés à mon travail, ainsi que pour ses conseils judicieux et ses encouragements.

Je remercie le Professeur Delphine Borgel pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse ainsi que le Professeur Jean-Marc Gombert et le Docteur Chantal André pour leur participation à ce jury. Qu'ils reçoivent ici toute ma gratitude.

Je remercie également le Professeur Marie-Claude Guillin pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire d'Hématologie et d'Immunologie de l'Hôpital Bichat-Claude Bernard.

Je souhaite remercier les Docteurs Jamel El Benna et Pham M.C. Dang, Christiane Rouyer-Fessard, ainsi que les autres membres de l'unité INSERM U683 « Communications cellulaires et homéostasie digestive » pour l'aide qu'ils m'ont apportée et leur gentillesse.

Je remercie les membres du laboratoire d'Hématologie et d'Immunologie de l'Hôpital Bichat-Claude Bernard qui, par leurs conseils, leur soutien et leur aide précieuse, m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je remercie Stéphanie François pour ses travaux sur l'apoptose des Polynucléaires Neutrophiles au sein du laboratoire et son soutien.

Je remercie chaleureusement les Docteurs Eléonore Fontan-Leclercq et Mounia Slaoui pour leur soutien et leurs conseils.

Je désire également remercier toutes les personnes ayant accepté d'être prélevées au cours de ce travail, dont la réalisation n'aurait pas été possible sans leur participation.

Merci à mes parents et ma famille pour leur soutien tout au long de mes études.

Je dédie ce travail à Christophe, pour son amour, son soutien, ses encouragements.

A la mémoire des Professeurs Serge Bouquet et François Huguet pour m'avoir conseillé cette voie et soutenue par la suite.

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	1
1	
INTRODUCTION.....	2
GENERALITES.....	4
I. Les polynucléaires neutrophiles.....	4
<i>I.1. Principales étapes fonctionnelles</i>	4
I.1.1. Adhérence et migration transendothéliale.....	4
I.1.2. Reconnaissance de l'agent pathogène	5
I.1.3. Destruction de l'agent pathogène.....	5
I.1.4. Production de médiateurs par le PN.....	8
<i>I.2. Mort du PN par nécrose ou par apoptose</i>	9
II. La leptine.....	13
<i>II.1. Structure et récepteurs</i>	14
<i>II.2. Fonctions de la leptine</i>	16
II. 2. 1. Régulation de la prise alimentaire.....	16
II.2.2. Régulation des réponses immunitaires.....	16
<i>II.3. Implication de la leptine au cours de certaines situations pathologiques</i>	20
II.3.1 Rôle de la leptine au cours de certaines maladies auto-immunes.....	20
II.3.2 Rôle de la leptine au cours de certaines maladies inflammatoires chroniques.....	21
III. Le « Vasoactive Intestinal Peptide ».....	24
<i>III.1 Structure et récepteurs</i>	25
<i>III.2 Fonctions du VIP</i>	26
III.2.1 Rôle du VIP en tant que neurotransmetteur et neuromodulateur.....	26
III.2.2. Rôle du VIP dans les réponses immunitaires.....	26
<i>III. 3 Rôle potentiel du VIP en tant qu'agent thérapeutique au cours de certaines maladies inflammatoires et auto-immunes.</i>	30
IV. Effets de la leptine et du VIP sur les fonctions des PN : études antérieures.....	32
<i>IV. 1 Effets de la leptine sur les fonctions des PN</i>	33
IV.1.1. Expression des molécules d'adhérence.....	33
IV.1.2. Chimiotactisme.....	33
IV.1.3. Phagocytose.....	34
IV.1.4. Explosion oxydative.....	35
IV.1.5. Apoptose	35
<i>IV. 2. Effets du VIP et du PACAP sur les fonctions des PN</i>	35
IV.2.1. Expression des molécules d'adhérence.....	35
IV.2.2. Chimiotactisme.....	36
IV.2.3. Explosion oxydative.....	37
IV.2.4. Apoptose.....	37
	38
MATERIELS ET METHODES.....	39
I. Echantillons sanguins.....	39
II. Isolement et purification des polynucléaires neutrophiles	39

II.1. Isolement des polynucléaires neutrophiles	39
II.2. Purification des polynucléaires neutrophiles	39
III. Exploration fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles	40
III.1. Traitement des échantillons	40
III.2. Etude de l'expression de la L-sélectine et du CD11b à la surface des PN	40
III.2.1. Principe	40
III.2.2. Technique	41
III.3. Etude de l'explosion oxydative des PN	41
III.3.1. Principe	41
III.3.2. Technique	42
III.4. Préparation des échantillons de sang total avant lecture au cytomètre de flux	42
IV. Etude de l'apoptose des PN	42
IV.1. Marquage par l'annexine V et la 7 Amino Actinomycine D	42
IV.1.1. Principe	42
IV.1.2. Technique	43
IV.2. Etude du potentiel transmembranaire mitochondrial	44
IV.2.1. Principe	44
IV.2.2. Technique	44
IV.3. Etude de l'expression intracellulaire des molécules de la famille Bcl-2	44
IV.3.1. Principe	44
IV.3.2. Technique	45
V. Production et dosage de cytokines par la technique BD® « Cytometric Bead Array »	45
VI. Analyse par cytométrie en flux	46
VI.1. Appareil	46
VI.2. Acquisition des données	47
VI.3. Analyse des données	47
VII. Analyse statistique	47
RESULTATS	48
I. Effet de la leptine et du VIP sur l'expression des molécules d'adhérence à la surface des PN	48
I.1. Modulation par la leptine de l'expression de la L-sélectine et du CD11b à la surface des PN dans le sang total	48
I.2. L'effet exercé par la leptine sur l'expression des molécules d'adhérence est indirect	49
I.3. Absence d'effet du VIP sur l'expression des molécules d'adhérence à la surface des PN	51
II. Absence d'effet du VIP et de la leptine sur l'explosion oxydative des PN	52
III. Effet de la leptine et du VIP sur la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires	53
IV. Effet différentiel de la leptine et du VIP sur l'apoptose des PN	54
IV.1. La leptine inhibe l'apoptose des PN dans le sang total	54
IV.2. Le VIP augmente l'apoptose des PN après isolement et purification	57
DISCUSSION	61
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	67
BIBLIOGRAPHIE	68

ABBREVIATIONS

7-AAD : 7- Amino Actinomycine D
APC : allophycocyanine
DHE : dihydroéthidine
FITC : isothiocyanate de fluorescéine
fMLP : formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine
FRO : formes réactives de l'oxygène
G-CSF : « Granulocyte colony stimulating factor »
GH : hormone de croissance
GM-CSF : « Granulocyte-macrophage colony stimulating factor »
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
HSA : sérum albumine humaine
ICAM : « Intercellular adhesion molecule »
IFN : interféron
IL-1 : Interleukine 1
LTB₄ : leucotriène B₄
MAPK : « Mitogen-activated protein kinase »
MIP : « Macrophage Inflammatory Protein »
NO :monoxyde d'azote
O₂^{•-} : anion superoxyde
PACAP: « Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide »
PAF : « Platelet Activating Factor »
PBS : « Phosphate buffer saline »
PE : phycoérythrine
PI3K : « Phosphatidyl-inositol 3 kinase »
PMA : Phorbol 12-Myristate 13-Acétate
PN : polynucléaire neutrophile
TLR : « Toll Like Receptor »
TNF : « tumor necrosis factor »
TPM :tours par minute
VIP : « Vasoactive Intestinal Peptide »

RESUME

Les Polynucléaires Neutrophiles (PN) humains constituent un des pivots de l'immunité innée, jouant un rôle majeur dans l'élimination des agents pathogènes. Cependant, stimulés de façon inappropriée ou excessive, ils peuvent être à l'origine de lésions tissulaires graves, ce qui souligne l'importance d'une régulation fine et précise de leurs fonctions. Des données récentes montrent que certains neuropeptides et hormones neuroendocriniennes, tels que la leptine et le « Vasoactive Intestinal Peptide » (VIP) exercent un large spectre d'actions sur les réponses immunitaires et sont de plus libérés au cours de certaines pathologies inflammatoires. Ces neuropeptides pourraient donc jouer un rôle majeur dans la régulation des fonctions des PN. L'objectif de mon travail a donc été d'étudier la modulation des fonctions des PN par la leptine et le VIP.

Nous n'avons pas mis en évidence d'effet direct de la leptine et du VIP sur l'explosion oxydative des PN. De plus, ces deux médiateurs n'exercent pas d'effet de « priming » sur la production de formes réactives de l'oxygène en réponse aux formyl peptides, dérivés bactériens. Alors que le VIP ne modifie pas l'expression des molécules d'adhérence à la surface des PN, la leptine diminue l'expression de la L-sélectine et augmente l'expression du CD11b, ce qui témoigne de son effet activateur sur les PN. De plus, la leptine inhibe l'apoptose des PN dans le sang total. L'effet anti-apoptotique exercé par la leptine, de même que l'effet modulateur sur l'expression des molécules d'adhérence à la surface des PN, sont en partie médiés par le $TNF\alpha$, dont la synthèse par les cellules de l'environnement est induite par la leptine. A l'inverse, le VIP exerce un effet pro-apoptotique direct sur les PN. Cet effet, observé sur PN isolés et associé à une perte du potentiel transmembranaire mitochondrial, conforte le rôle du VIP en tant que médiateur anti-inflammatoire.

INTRODUCTION

Les polynucléaires neutrophiles humains (PN) constituent un des pivots de l'immunité innée et jouent un rôle majeur dans les défenses de l'organisme contre les différents agents pathogènes. Les réactions inflammatoires dans lesquelles ils sont engagés sont donc le plus souvent bénéfiques à l'organisme, en participant à l'élimination de l'agent pathogène et à la réparation des tissus endommagés. De plus, les PN jouent un rôle dans l'engagement et la régulation des réponses immunitaires innée et adaptative de par leur production de cytokines. Cependant, stimulés de façon excessive et/ou inappropriée, ils peuvent également participer à la survenue de lésions tissulaires graves par la libération, dans le milieu extracellulaire, de molécules à haute potentialité toxique comme les Formes Réactives de l'Oxygène (FRO), les protéases ou d'autres médiateurs inflammatoires. De telles molécules ont ainsi été impliquées dans des maladies inflammatoires, aiguës ou chroniques, telles que le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte, la polyarthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires intestinales...

Ceci met en exergue la nécessité d'une régulation fine et précise des fonctions phagocytaires, notamment au niveau d'un foyer inflammatoire.

De nombreux auteurs ont montré le rôle régulateur majeur joué par les cytokines pro et anti-inflammatoires, présentes au niveau du foyer inflammatoire, sur les fonctions des PN, telles que l'expression des molécules d'adhérence, l'explosion oxydative et l'apoptose des PN. Des données récentes montrent que certains neuropeptides et hormones neuroendocriniennes, tels que la leptine et le « Vasoactive Intestinal Peptide » (VIP), sont libérés au cours de pathologies inflammatoires. En outre, il a été montré que ces médiateurs exercent un large spectre d'actions sur les réponses immunitaires et pourraient donc jouer un rôle dans la modulation des fonctions du PN, pivot de l'immunité innée.

Néanmoins, peu d'études se sont intéressées aux effets de la leptine et du VIP sur les différentes fonctions des PN, telles que l'expression des molécules d'adhérence, le chimiotactisme, la phagocytose, l'explosion oxydative ou l'entrée en apoptose. De plus, certains des résultats rapportés se sont avérés contradictoires. Ces discordances pourraient s'expliquer par le fait que la majorité des études ont été réalisées sur des PN isolés de leur environnement, par différentes techniques susceptibles de les activer et de moduler de ce fait leurs réponses fonctionnelles.

Introduction

L'objectif de mon travail a donc été d'étudier l'effet du VIP et de la leptine sur différentes fonctions des PN, à savoir l'expression des molécules d'adhérence et l'explosion oxydative, ainsi que sur l'apoptose des PN. Cette étude a bénéficié de nouvelles techniques d'étude des PN dans des conditions de sang total et ce, grâce à l'utilisation de la cytométrie en flux. Ceci permet en effet d'une part, d'éviter les artéfacts de stimulation en rapport avec l'isolement des PN par différentes procédures et d'autre part, de se rapprocher des conditions physiologiques. Les résultats sur sang total ont été confrontés avec ceux obtenus en parallèle sur PN isolés.

GENERALITES

I. Les polynucléaires neutrophiles*I.1. Principales étapes fonctionnelles*

I.1.1. Adhérence et migration transendothéliale

Sous l'influence de différents stimuli provenant du foyer infectieux ou inflammatoire, les PN, cellules physiologiquement au repos dans le sang circulant, adhèrent aux cellules endothéliales puis se glissent entre celles-ci pour se diriger de façon orientée vers leur cible au niveau tissulaire. Ce phénomène d'adhérence des PN aux cellules endothéliales fait intervenir une série d'évènements régulés de façon très précise (Gougerot-Pocidalò, 2002).

Le PN va d'abord adhérer de façon transitoire aux cellules endothéliales par l'intermédiaire de molécules d'adhérence appartenant à la famille des sélectines. En effet, le PN exprime à sa surface de façon constitutive la L-sélectine ou CD62L, qui se lie à des E et P-sélectines, présentes à la surface des cellules endothéliales et dont l'expression est augmentée par différents médiateurs provenant du foyer inflammatoire [Interleukine 1 (IL-1), lipopolysaccharide (LPS), Tumor Necrosis Factor (TNF)]. Ces interactions, de faible affinité, induisent des étapes successives d'attachement et de détachement du PN de la cellule endothéliale. Ceci correspond au phénomène de roulement ou « **rolling** » du PN le long de l'endothélium.

Dans un deuxième temps, le PN est activé par différents médiateurs dérivés de l'endothélium, en particulier l'IL-8. Cette phase d'**activation** est caractérisée par une disparition rapide de la L-sélectine de la surface du PN par un phénomène de clivage protéolytique ou « **shedding** ». On assiste parallèlement à une augmentation de l'expression et de l'affinité des $\beta 2$ intégrines, notamment la molécule CD11b/CD18, qui se lie avec une forte affinité aux molécules ICAM, (« Intercellular adhesion molecule »), exprimées par les cellules endothéliales. Cette **adhérence forte** à l'endothélium provoque un arrêt du roulement du PN et précède sa **migration trans-endothéliale**, possible grâce à la molécule PECAM (« platelet endothelial cell adhesion molecule »). Cette étape est capitale dans le fonctionnement approprié du PN dont le but est d'éliminer, au niveau du foyer inflammatoire, l'agent pathogène. Une hyperactivation au moment de l'adhérence du PN aux cellules endothéliales des veinules post-capillaires peut être responsable d'une destruction de celles-ci et de lésions tissulaires sévères.

Après s'être glissé entre les cellules endothéliales, le PN migre dans les tissus vers le site inflammatoire. Cette migration s'effectue de façon orientée, selon un gradient de substances chimioattractantes, dont des dérivés bactériens tels que les N-formyl-peptides (en particulier le formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine : fMLP), des dérivés du complément comme le C5a, des dérivés lipidiques tels que le leucotriène B4 (LTB4) et le Platelet Activating Factor (PAF), ou des chimiokines dont le prototype est l'IL-8 pour le PN. Les facteurs chimioattractants se lient à des récepteurs à 7 domaines transmembranaires dont l'extrémité C-terminale est couplée à une protéine G hétérotrimérique qui gouverne la transduction du signal. Les mécanismes du mouvement sont complexes, faisant intervenir les mouvements du calcium intracellulaire et de nombreuses voies de signalisation, aboutissant au déclenchement de la polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine.

I.1.2. Reconnaissance de l'agent pathogène

Au niveau du foyer inflammatoire, le PN reconnaît les microorganismes par l'intermédiaire de différents récepteurs (Gougerot-Pocidalò, 2002). L'immunité innée repose sur la reconnaissance de motifs microbiens, conservés au cours de l'évolution, les PAMP's, « Pathogen associated molecular patterns », par des récepteurs, les PRR, « Pattern recognition receptor ». Ces PRR incluent en particulier les « Toll Like Receptor », ou TLR, homologues de la protéine Toll de la Drosophile. Dix TLR ont été identifiés chez l'homme, onze chez la souris. Les PN ont été rapportés comme exprimant tous les TLR, à l'exception de TLR3. De plus, **l'opsonisation** des microorganismes par des immunoglobulines (IgG1 et IgG3) ou par des produits du complément dérivés du C3 (C3b et C3bi), dont il existe des récepteurs à la surface des PN (Récepteur pour le Fragment Fc des IgG et récepteurs CR1, CR3 et CR4 respectivement), facilite leur reconnaissance par les PN.

I.1.3. Destruction de l'agent pathogène

Après reconnaissance et adhérence à la cible, la formation de pseudopodes cellulaires permet d'entourer la particule et de l'englober au sein d'une vacuole de phagocytose. La destruction de l'agent pathogène par le PN s'y effectue alors par l'intermédiaire de deux mécanismes bactéricides agissant en coopération (Gougerot-Pocidalò, 2002):

➤ **Un système indépendant de l'oxygène**, impliquant non seulement le déversement du contenu granulaire dans le phagosome [enzymes (hydrolases acides, glycosidases, protéases), lysozyme, protéines cationiques à action antibiotique telles que les défensines] mais aussi l'augmentation de l'expression de certaines protéines à la surface du PN comme

les récepteurs des N-formyl-peptides ou les $\beta 2$ intégrines, permettant d'amplifier les mécanismes de destruction des microorganismes par le PN.

➤ **Un système dépendant de l'oxygène**, aboutissant à la production de FRO, dans le cadre de **l'explosion oxydative**. La production de FRO fait intervenir un système enzymatique complexe, la NADPH oxydase, constitué de plusieurs composants protéiques, dispersés entre les membranes et le cytosol dans le PN au repos. Les composants membranaires sont le cytochrome b558, constitué de deux sous-unités -la $p22^{phox}$ et la $gp91^{phox}$ - et une petite protéine G de type Rap1A. Les composants cytosoliques sont les protéines $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ et une petite protéine G de type Rac2. Après activation du PN sous différents stimuli, les différents composants du complexe se regroupent au niveau membranaire et sous-membranaire, formant ainsi une enzyme active, permettant le transfert d'électrons à partir du NADPH sur une flavine liée au cytochrome b puis sur les hèmes et enfin sur l'oxygène moléculaire. Ceci donne naissance à l'anion superoxyde O_2° , précurseur des autres FRO, comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , l'acide hypochloreux HOCl et le radical hydroxyl OH° .

La stimulation de la NADPH oxydase peut être induite par un grand nombre de facteurs particuliers [bactéries, zymosan, particules de latex, plus ou moins opsonisées] et solubles [peptides N-formylés (fMLP), fragment C5a du complément, Leucotriène B4, « Platelet activating factor », endotoxines bactériennes, ionophores calciques (Ionomycine, A23187), activateurs de Protéine kinase C de type esters de phorbol (Phorbol 12-Myristate 13-Acétate : PMA)]. L'activation de la NADPH oxydase dépend de l'activation de kinases permettant la phosphorylation des composants cytosoliques de l'oxydase et notamment de la $p47^{phox}$ (élément primaire de l'assemblage de l'oxydase) (El Benna, 1996, 1997).

Les FRO induisent des altérations lipidiques, protéiques et des atteintes des acides nucléiques. Leur production se fait au niveau de la face externe de la membrane plasmique, qui devient la face interne de la membrane du phagosome lors du processus de phagocytose des micro-organismes. Les FRO sont donc produites directement au contact de l'agent phagocyté et participent donc de façon effective à la destruction des agents pathogènes. Le rôle majeur des FRO et de la NADPH oxydase dans la défense anti-infectieuse est illustré par la survenue d'infections bactériennes et fongiques sévères et/ou répétées au cours de déficits génétiques des différents composants de la NADPH oxydase regroupés sous le terme de Granulomatose septique chronique (Andrews, 2003).

Cependant, lorsqu'elles sont produites de façon excessive ou inappropriée, les FRO peuvent conduire à la survenue de lésions tissulaires, participant à la physiopathologie des

maladies inflammatoires. Ainsi, afin d'exercer son activité anti-infectieuse tout en évitant la survenue de lésions tissulaires secondaires à une stimulation excessive, le PN doit être soumis à une régulation fine et précise. Parmi les éléments impliqués dans cette régulation, les cytokines présentes au sein du foyer inflammatoire jouent un rôle important par des phénomènes de « priming » et de désensibilisation, conduisant respectivement à une potentialisation ou une diminution des réponses cellulaires aux stimuli externes.

- ✓ **Le phénomène de "priming"**, que l'on peut traduire par amorçage, est défini par le fait qu'un prétraitement par un premier stimulus à une concentration suboptimale, augmente la réponse à un second stimulus ajouté ultérieurement. Les premières observations d'un tel effet « primant » ont été faites en mettant en évidence une potentialisation de la production de FRO par prétraitement des PN par des facteurs chimioattractants. Puis, de nombreux travaux ont montré l'intervention de différentes cytokines telles que les TNF α et β , le « granulocyte-macrophage colony stimulating factor » (GM-CSF), le « granulocyte colony stimulating factor » (G-CSF), l'IL-8, (Yuo, 1991; Khwaja, 1992; Elbim, 1993, 1994; Downey, 1995), les endotoxines (Yee, 1993) ou encore l'adhérence par l'intermédiaire par exemple du CD11b/CD18. Ces conditions de préactivation augmentent la réponse à différents stimuli tels les N-formyl-peptides, le C5a ou encore le PAF ou le LTB4. Ces phénomènes de « priming » sont aussi observés *ex vivo* après traitement de certains patients par du G- ou GM-CSF (Khwaja, 1992).

Les mécanismes moléculaires restent mal connus et feraient intervenir :

- 1) une augmentation du nombre de récepteurs au fMLP exprimés à la membrane (Tennenberg, 1990). Une autre étude de notre laboratoire a suggéré que le TNF α induisait un recyclage accéléré des récepteurs au fMLP présents à la surface des PN, au niveau d'une sous-population de PN hyperréactive produisant des quantités importantes de FRO (Elbim, 1993);
 - 2) un transfert préalable du cytochrome b_{558} vers la membrane plasmique (Ward, 2000);
 - 3) une phosphorylation partielle de la $p47^{phox}$ qui pourrait permettre une augmentation du degré de phosphorylation des autres sites lors de l'application ultérieure d'un deuxième stimulus (fMLP) (Dang, 1999; Dewas, 2003).
- ✓ **Le phénomène de désensibilisation** permet une désactivation du système NADPH oxydase, cette désactivation étant nécessaire à la résolution du phénomène inflammatoire. Il correspond au fait qu'un prétraitement des PN avec une substance

pharmacologique peut diminuer la réponse oxydative à un agoniste ajouté ultérieurement (Ali, 1999). Quelques exemples de phénomènes de désensibilisation peuvent être donnés : ainsi un prétraitement par un même agent ou un agent partageant le même récepteur induit une non réponse à cet agent appliqué ultérieurement. Il s'agit d'une désensibilisation homologue. Les phénomènes de désensibilisation sont parfois de nature hétérologue impliquant deux récepteurs différents, que les agonistes soient ou non de la même famille de molécules; la désensibilisation du deuxième récepteur n'implique pas forcément son occupation par un agoniste. Par ailleurs, certains auteurs ont rapproché les phénomènes de désensibilisation les phénomènes de régulation négative par les cytokines anti-inflammatoires. La régulation de l'expression des récepteurs pour ces cytokines comme l'IL-10 jouerait donc un rôle important au sein d'un foyer inflammatoire dans la régulation négative des effets pro-inflammatoires des PN (Elbim, 2001).

Les phénomènes de désensibilisation font appel à différents mécanismes: internalisation des récepteurs, “shedding” de certains récepteurs comme ceux du $TNF\alpha$, phosphorylation des récepteurs à sept domaines transmembranaires suivie d'un découplage des signaux transductionnels par l'arrestine ou encore par l'intervention de protéines RGS (regulatory G protein signaling) à activité GTPase (Ferguson, 2001). Une élévation de la concentration intracellulaire de l'AMPc ainsi que l'intervention de la Protéine Kinase A inhibent l'activation de l'oxydase et la phosphorylation de la $p47^{phox}$ en réponse au fMLP (Bengis-Garber, 1996). Par ailleurs, la transduction du signal fait intervenir des phénomènes de phosphorylation, eux-mêmes régulés par des phénomènes de déphosphorylation. Ainsi de nombreuses phosphatases existent dans le PN (CD45, Protéine Phosphatases 1 et 2A) qui permettent une déphosphorylation des composants du système conduisant ainsi à l'arrêt de son activité (Harbecke, 1997). Cependant, un autre mécanisme d'arrêt de l'activation de la NADPH oxydase a été suggéré: l'arrêt de l'activité oxydasique serait corrélé avec une perte du complexe $p47^{phox}/p67^{phox}$ accroché au cytochrome b_{558} à la suite d'une hyperphosphorylation de la $p47^{phox}$ (Yamaguchi, 1995, DeLeo, 1999).

I.1.4. Production de médiateurs par le PN

Le PN n'est pas simplement une cellule effectrice tueuse mais participe, de par ses sécrétions, à la régulation des fonctions de nombreux partenaires du système immunitaire et de ses propres fonctions, ainsi qu'au remodelage tissulaire. Ainsi la production de FRO intervient également comme médiateur de l'inflammation au niveau des cellules présentes au

niveau du site inflammatoire, modulant l'apoptose des cellules de leur environnement (Buttke, 1994; Vogt, 1998), induisant une diminution des réponses prolifératives lymphocytaires *in vivo* et *in vitro* (Gougerot-Pocidallo, 1988), augmentant la production de cytokines proinflammatoires (Gougerot-Pocidallo, 1989), activant des facteurs de transcription intracellulaires ainsi que la phosphorylation de différentes tyrosines kinases (Carballo, 1999; Jope, 1999; Li, 1999 ; Sonoda, 1999).

Par ailleurs, la libération d'enzymes protéolytiques régule l'environnement tissulaire, la conformation de certains médiateurs, les activant ou les désactivant. Enfin, les **PN produisent de nombreux médiateurs de l'inflammation** (PAF, LTB₄...) ainsi que **des cytokines pro et anti-inflammatoires**. Parmi les cytokines produites par le PN [IL-8, TNF α , IL-1 β , IL-3, IL-12, Interféron alpha (IFN α), Oncostatine M, Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha et bêta (MIP-1 α et β), Tumor Growth Factor bêta (TGF β), IL-1ra,...], l'IL-8 est la cytokine produite de façon majoritaire. La production de cette chimiokine par le PN lui-même est responsable d'un phénomène important d'amplification de la migration des PN vers le lieu de l'inflammation.

1.2. Mort du PN par nécrose ou par apoptose

Malgré leur rôle crucial dans les défenses de l'hôte contre les infections, les PN présentent, au cours des réponses inflammatoires, un potentiel élevé à induire des lésions tissulaires par le relargage de leur contenu toxique. La stimulation des PN induit en effet la synthèse et la libération de diverses substances toxiques, responsables en général de leur mort par nécrose. La mort cellulaire par nécrose se caractérise par une altération de la structure cellulaire, un gonflement cellulaire et une perte de l'intégrité membranaire, entraînant la libération du contenu des granulations du PN dans l'environnement tissulaire, exacerbant ainsi les lésions tissulaires locales et prolongeant la réaction inflammatoire (Savill, 1995).

Cette agression tissulaire peut être évitée par le phénomène d'**apoptose**, ou mort cellulaire programmée prototypique, suivie de la phagocytose des PN apoptotiques par les macrophages. En effet, l'élimination par phagocytose de PN intacts prévient le relargage du contenu intracellulaire toxique des PN dans le milieu extracellulaire, qui survient si les cellules meurent par nécrose. L'apoptose représente un mécanisme normal d'élimination des PN à partir d'un site infectieux et constitue de ce fait un **phénomène critique dans la résolution de l'inflammation**, contrôlant l'étendue des dommages tissulaires médiés par les PN ainsi que la durée et l'intensité des réponses inflammatoires (Savill, 1995, 1997a ; Akgul, 2000 ; Simon, 2003). Par ailleurs, les PN âgés meurent également par apoptose constitutive au

niveau des tissus, en l'absence de cytokines ou d'agents pro-inflammatoires, ceci avant d'être éliminés par les macrophages : l'apoptose des PN constitue donc un processus important pour maintenir un nombre approprié de PN sous des conditions physiologiques, 10^{11} PN matures étant générés chaque jour chez le sujet adulte (Akgul, 2000 ; Simon, 2003).

Durant l'apoptose, les PN présentent des modifications morphologiques caractéristiques d'une cellule apoptotique, avec en particulier une condensation chromatinienne et cytoplasmique, une fragmentation de la cellule en corps apoptotiques. L'intégrité de la membrane plasmique des PN apoptotiques est néanmoins conservée, retenant les composants cellulaires au sein de la cellule (Savill, 1997a ; Edwards, 2003 ; Maiani, 2004a).

En outre, l'expression de certaines molécules de surface est modifiée, assistant à la diminution de l'expression de certains récepteurs ou à l'apparition de nouvelles molécules de surface. L'apoptose des PN s'accompagne ainsi d'une diminution de l'expression des membres de la superfamille des immunoglobulines (CD31, CD50, CD66b, CD63...) et de certains récepteurs de surface comme CD16, CD15, CD32. De plus, la phosphatidylsérine, caractéristique des cellules apoptotiques, apparaît sur le feuillet externe de la membrane plasmique, par perte de l'asymétrie membranaire normale (Homburg, 1995). L'externalisation de cette molécule facilite la reconnaissance des PN apoptotiques par les macrophages. Par ailleurs, la molécule phagocytaire CD36 coopère avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pour se lier à la thrombospondine, sécrétée par les phagocytes, cette dernière constituant un pont entre les récepteurs des phagocytes et des structures présentes à la surface des PN apoptotiques (Savill, 1995, 1997b).

Les PN apoptotiques sont de plus non fonctionnels, perdant leur aptitude à se déplacer par chimiotactisme, à se polariser, à dégranuler et à produire des FRO en réponse à des stimuli extérieurs tels que le fMLP (Whyte, 1993). Cette diminution des fonctions cellulaires s'explique par une diminution de l'expression de récepteurs fonctionnels à leur surface et par une perturbation de la signalisation. (Akgul, 2000 ; Maiani, 2004a).

Enfin, l'englobement des PN apoptotiques par les macrophages conduit à l'induction de signaux anti-inflammatoires par le macrophage, liée à la libération d'agents anti-inflammatoires (TGF β , Prostaglandine E2), conjointement à la diminution de la production d'agents pro-inflammatoires (IL-1 β , GM-CSF, IL-8, TNF) (Lucas, 2003).

Toutefois, **ce processus d'apoptose est lui-même modulé au cours des processus inflammatoires**, en particulier par différentes cytokines ainsi que par des médiateurs dérivés de l'agent pathogène (Colotta, 1992). En effet, les PN, après leur libération de la moelle

osseuse, ont une très courte durée de vie dans le sang circulant (six à dix heures), puis ils migrent physiologiquement dans les tissus, où ils entrent spontanément en apoptose au bout de un à deux jours (Maianski, 2004a). Au cours des processus inflammatoires, la durée de vie des PN est augmentée, de nombreuses molécules présentes au niveau du site inflammatoire retardant l'apoptose constitutive des PN. Il a ainsi été rapporté que l'IL-1 β , l'IL-15, l'IL-8, le LPS, le GM-CSF... pouvaient prolonger la survie des PN (Colotta, 1992 ; Akgul, 2000 ; Simon, 2003 ; Edwards, 2003). De même, l'hypoxie, les glucocorticoïdes retardent l'apoptose des neutrophiles (Akgul, 2000 ; Edwards, 2003). Le TNF α présente quant à lui des effets sur l'apoptose des PN différents selon les études. Alors que des incubations prolongées de PN humains en présence de TNF α provoquent une diminution de l'apoptose, le TNF α peut également induire l'apoptose dans une sous-population de PN pour des temps d'incubation plus courts (Murray, 1997 ; Salamone, 2004). En outre, le TNF α aurait un effet inhibiteur à faibles concentrations mais un effet pro-apoptotique à fortes concentrations (Van den Berg, 2001).

Ces différents stimuli anti-apoptotiques, présents localement au cours de la réaction inflammatoire, interviennent **en modulant l'expression des membres de la famille Bcl-2** (Akgul, 2001; Simon, 2003). En effet, si les deux voies d'apoptose, la voie extrinsèque des récepteurs de mort et la voie intrinsèque mitochondriale, sont toutes deux impliquées dans l'apoptose du PN, la voie mitochondriale semble la plus sollicitée. Bien que les PN expriment Fas à leur surface, les interactions Fas/Fas ligand ne semblent pas constituer le principal mécanisme responsable de l'apoptose spontanée des PN. En effet, les PN de souris déficientes en Fas ou en Fas ligand présentent une apoptose normale. De plus, le blocage de Fas par un anticorps monoclonal neutralisant n'a pas d'effet sur l'apoptose constitutive des PN (Simon, 2003).

Si les PN n'expriment pas la molécule anti-apoptotique Bcl-2, **ils expriment de façon constitutive les protéines pro-apoptotiques Bax, Bid, Bim, Bak et Bad**. Ces protéines ont une demi-vie relativement longue et leur expression constitutive pourrait expliquer la durée de vie courte des PN sanguins. Les PN expriment également, **de façon inductible, les molécules anti-apoptotiques A1, Mcl-1 et Bcl-X_L**, de demi-vie très courte (Akgul, 2000 ; Edwards, 2003). L'apoptose des PN serait ainsi gouvernée par les taux cellulaires de ces molécules anti-apoptotiques.

- Ainsi, dans des conditions non inflammatoires, les PN expriment des taux élevés des molécules pro-apoptotiques alors que les molécules anti-apoptotiques A1 et Mcl-1 sont exprimées de façon marginale. En outre, celles-ci sont neutralisées par

les molécules pro- apoptotiques Bad et Bim. Enfin, la molécule pro-apoptotique Bid est clivée (clivage nécessaire à l'activation et la translocation mitochondriale de Bax), participant au relargage de facteurs pro-apoptotiques de la mitochondrie vers le cytoplasme, tels que le cytochrome c, et conduisant à l'apoptose. Ainsi, le processus d'apoptose dans le PN ne nécessite pas de synthèse protéique, d'autant plus que sa capacité de synthèse est réduite (Simon, 2003).

- Au cours des processus inflammatoires, le mécanisme d'inhibition de l'apoptose requiert à l'inverse une synthèse de nouvelles protéines anti-apoptotiques. En effet, en l'absence de synthèse de novo, les taux cellulaires de ces protéines seraient rapidement déplétés en raison de leur demi courte et de leur turn-over rapide. Ainsi, une augmentation du taux intracellulaire des molécules anti-apoptotiques A1 et Mcl-1 a notamment été impliquée dans la survie des PN induite par des cytokines pro-inflammatoires telles que le GM-CSF, l'IL-1, le TNF α et l'IL-15 (Moulding, 2001) et les agonistes des TLR (François, 2005). De plus, la phosphorylation de Bad participe également à la survie des PN. En effet, la phosphorylation de Bad conduit à sa séquestration dans le cytosol par la protéine 14-3-3. Bad est alors incapable d'interagir avec les molécules anti-apoptotiques telles que Bcl-X_L, Mcl-1 et A1 ; ces dernières peuvent se lier à Bax, bloquant son activité pro-apoptotique et conduisant à la survie cellulaire (Simon, 2003 ; Edwards, 2003 ; Perianayagam, 2004). Enfin, les conditions de survie ont été associées à l'absence de clivage du facteur pro-apoptotique Bid, l'absence d'activation de la molécule pro-apoptotique Bim ainsi que la diminution de la translocation de Bax, induites notamment par le G-CSF et le GM-CSF (Maianski, 2004b).

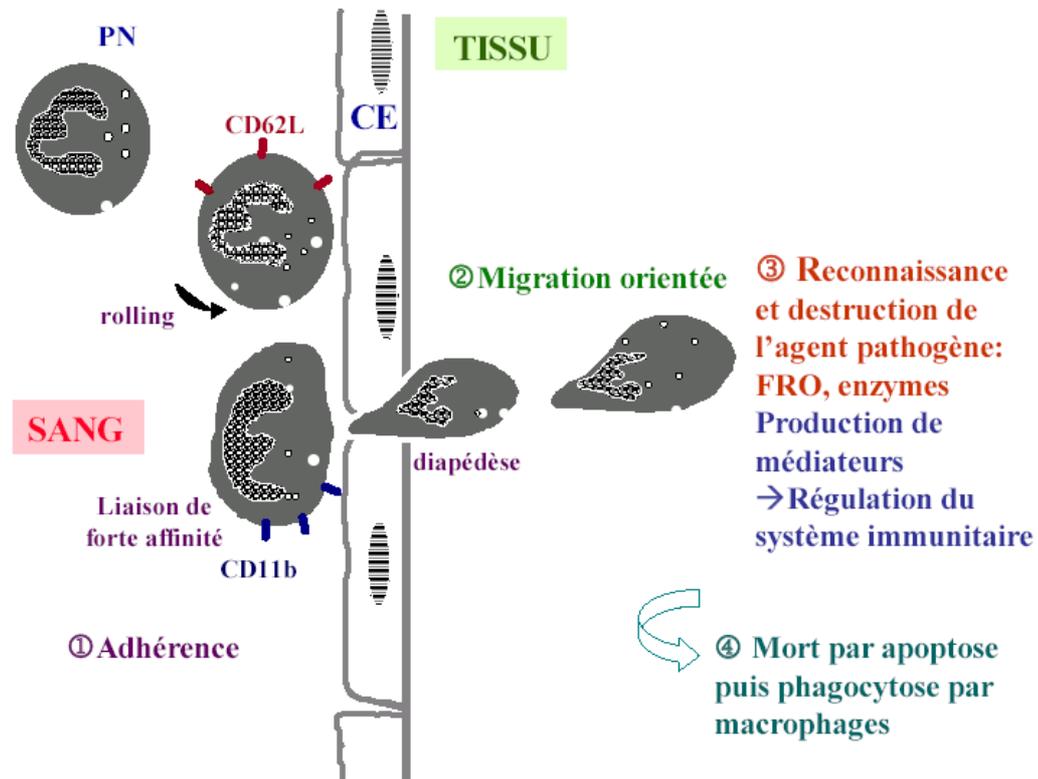


Figure I. Schéma récapitulatif sur les principales étapes fonctionnelles du PN.

II. La leptine

La leptine, produit du gène *ob*, est une protéine non glycosylée de 16 kDa découverte en 1994.

Essentiellement sécrétée par les adipocytes, de façon proportionnelle à la masse corporelle adipeuse, cette hormone peptidique est également produite, en plus faible quantité, par l'estomac, les muscles squelettiques et le placenta (La Cava, 2004).

Les taux sériques de leptine, d'environ 5 à 8 ng/ml dans les conditions physiologiques, sont directement corrélés à la masse corporelle adipeuse. Les sujets obèses présentent en effet des taux sériques de leptine plus élevés que les sujets de poids normal. En outre, une réduction du poids corporel est associée à une diminution des taux sériques de leptine. (Considine, 1996).

L'expression du gène codant pour la leptine est régulée par différents facteurs, principalement la prise alimentaire, une diminution de celle-ci étant associée à une diminution des taux sériques de leptine. Par ailleurs, l'insuline stimule la sécrétion de leptine au cours des repas et une diminution des taux d'insuline précède la réduction des taux de leptine durant le jeûne. Il existe au contraire une relation inverse entre leptine et glucocorticoïdes. La sécrétion de leptine est par ailleurs inhibée par la testostérone alors qu'elle est augmentée par les hormones stéroïdiennes féminines. Enfin, la synthèse de leptine augmente en réponse aux

infections aiguës et à la sécrétion de médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1, le TNF α et le LIF (Leukemia inhibitory factor) (Otero, 2005).

II.1. Structure et récepteurs

La structure de la leptine et de son récepteur suggèrent que **la leptine appartient à la famille des cytokines**. Malgré l'absence de similitude de séquence entre la leptine et les cytokines à longue chaîne hélicoïdale, il existe entre ces molécules une forte similitude au niveau de leur structure tertiaire. En effet, la leptine présente une longue chaîne comprenant quatre hélices alpha et présente ainsi des similitudes structurales avec différentes cytokines telles que l'IL-6, l'IL-12, l'IL-15, le G-CSF, l'oncostatine M, la prolactine ou l'hormone de croissance qui appartiennent elles-aussi au groupe 1 des cytokines, à longue chaîne hélicoïdale (Faggioni, 2001, La Cava, 2004 ; Otero, 2005).

Le récepteur de la leptine (Ob-R), codé par le gène *db*, est rattaché, de par sa structure, aux récepteurs des cytokines de type I (ou récepteurs des hématopoïétines), à chaîne gp130. Cette famille de récepteurs inclut en particulier les récepteurs pour l'IL-6, l'IL-12, l'oncostatine M et la prolactine (La Cava, 2004 ; Otero, 2005).

Ce récepteur Ob-R est une glycoprotéine transmembranaire et existe sous six isoformes, obtenus par épissage alternatif. Ces isoformes, caractérisés par des domaines cytoplasmiques de longueur différente, sont classés en 3 groupes (Fantuzzi, 2000 ; Faggioni, 2001 ; La Cava, 2004 ; Otero, 2005) :

➤ **L'isoforme long**, Ob-Rb, présente 302 résidus cytoplasmiques, contenant les motifs d'activation et de transduction du signal. Il est exprimé à hautes concentrations dans l'hypothalamus, médiant ainsi les effets de la leptine dans la régulation du poids corporel, principal effet de la leptine. Il est en outre présent dans plusieurs tissus périphériques tels que les cellules β pancréatiques, le foie foetal, ainsi que sur les cellules endothéliales, les plaquettes, les précurseurs hématopoïétiques CD34+, les lymphocytes T et les lymphocytes B, les macrophages.

➤ **Plusieurs isoformes courts** existent, Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd et Ob-Rf, caractérisés par un domaine cytoplasmique de 34 acides aminés. Exprimés par différents tissus non immuns, ils semblent médier le transport et la dégradation de la leptine. Ob-Ra est l'isoforme le plus abondamment exprimé, ceci dans différents tissus, en particulier le rein, le poumon, le foie, les plexus choroïdes où il joue un rôle dans le passage de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique.

➤ Il existe enfin **une forme sécrétée**, Ob-Re, pouvant se lier à la leptine circulante. En effet, la leptine circule dans le plasma sous une forme libre et une forme liée. Chez les sujets minces, 50% de la leptine est présente sous forme liée alors qu'elle circule essentiellement sous forme libre chez les sujets obèses.

Les voies de transduction du signal médiées par la fixation de la leptine à son récepteur sont comparables à ceux rapportés pour différentes cytokines. Le récepteur Ob-Rb est considéré classiquement comme l'isoforme impliqué dans la signalisation. Néanmoins, les isoformes courts sont également capables de signalisation, par des voies différentes.

Les isoformes long et courts forment des homodimères en l'absence de ligand, cette dimérisation étant indispensable à la signalisation. Chaque récepteur se lie à une molécule de leptine, conduisant ainsi à la formation d'un complexe tétramérique (Frühbeck, 2006).

Le récepteur de la leptine, comme les autres récepteurs de cytokines de type I, ne possède pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque. Ob-Rb requiert donc l'activation de tyrosines kinases associées au récepteur, de la famille Janus (Jak), en particulier Jak2, qui vont, par la suite, phosphoryler et activer les facteurs de transcription STAT (« signal transducers and activators of transcription »), notamment STAT3 (La Cava, 2004 ; Otero, 2005 ; Matarese, 2005 ; Frühbeck, 2006). Ces derniers, après homodimérisation et translocation dans le noyau, induisent l'expression de différents gènes spécifiques, dont des gènes codant pour des protéines jouant un rôle régulateur négatif, telles que la protéine SOCS-3 (« suppressor of cytokine signaling ») (Frühbeck, 2006). L'administration de leptine à des souris ob/ob, déficientes en leptine, induit en effet l'expression de l'ARNm SOCS-3 dans l'hypothalamus. Des résultats similaires ont été obtenus lors d'études de transfection utilisant des cellules CHO exprimant l'isoforme long du récepteur de la leptine. De plus, ces études ont montré que SOCS-3 inhibait la phosphorylation induite par la leptine de Jak2, suggérant un rôle de SOCS-3 dans la régulation et l'atténuation de la signalisation de la leptine (Bjørnbæk, 1999). La phosphotyrosine phosphatase 1B, présente à la surface du réticulum endoplasmique, est également impliquée dans la régulation négative de la signalisation de la leptine via la déphosphorylation de Jak2 (Matarese, 2005 ; Frühbeck, 2006).

Parallèlement à la voie Jak2-STAT3, importante pour médier les effets de la leptine dans les cellules immunitaires, d'autres voies de transduction du signal sont également impliquées, en particulier la voie de la « Phosphatidyl-inositol 3 kinase » (PI3K), la voie de l'Insuline receptor substrate 1 (IRS1) et la voie des « Mitogen-activated protein kinase » (MAPK), avec activation des kinases ERK (« extracellular Regulated Kinase ») et p38 MAPKinase (Otero, 2005 ; Frühbeck, 2006).

Les isoformes courts, capables de se lier et d'activer les tyrosines kinases Jak, ne peuvent pas induire une signalisation STAT. Ils sont néanmoins capables de signalisation par la voie des MAPKinases .

II.2. Fonctions de la leptine

II. 2. 1. Régulation de la prise alimentaire

Le mot leptine vient du grec *leptos*, qui signifie mince. La fonction essentielle de cette protéine consiste en effet en **la régulation de la prise alimentaire**, principalement par ses effets sur l'hypothalamus. Des taux élevés de leptine signalent la présence de stocks énergétiques suffisants au système nerveux central, qui répond en réduisant l'appétit et en augmentant les dépenses énergétiques, prévenant ainsi une obésité sévère. Un déficit génétique en leptine (exemple des souris *ob/ob*) ou en son récepteur (cas des souris *db/db*, résistantes à la leptine) conduit à une obésité extrême, liée à une prise alimentaire excessive et un défaut de dépense énergétique (Fantuzzi, 2000 ; Faggioni, 2001).

Néanmoins, ces souris présentent également des anomalies marquées, secondaires aux effets de la leptine sur la reproduction, l'hématopoïèse, l'angiogénèse, la sécrétion d'insuline, les métabolismes osseux, lipidique et glucidique. De telles altérations sont de plus décrites lors des déficits congénitaux en leptine chez l'homme. Ainsi, **les mutations du gène Ob, rares** (observées chez 1 sujet obèse sur 250) se caractérisent par une hyperphagie, une obésité, un hypogonadisme hypothalamique et une fertilité altérée (Ozata, 1999). La leptine est donc une molécule pléiotropique, jouant un rôle important dans la régulation des fonctions endocrines et des fonctions métaboliques (Faggioni, 2001 ; Otero, 2005).

II.2.2. Régulation des réponses immunitaires

Plus récemment a été découvert **le rôle de la leptine dans l'immunité**.

Ainsi, une altération des réponses immunitaires et une susceptibilité aux infections ont été rapportées chez les animaux déficients en leptine ou en son récepteur, chez les sujets déficients en leptine ainsi que lors des situations de malnutrition, où l'on observe des taux faibles de leptine (Ozata, 1999 ; Faggioni, 2001 ; La Cava, 2004 ; Matarese, 2005). Dans ce dernier cas la leptine semble être un signal pour l'adaptation à l'état de jeûne, permettant de conserver l'énergie pour les muscles et l'activité cérébrale (Faggioni, 2001 ; Sanchez-Margalet, 2003).

De plus, plusieurs études ont montré une augmentation des taux circulants de leptine au cours de certaines infections bactériennes ou de réactions inflammatoires. Ainsi, les taux de leptine sont augmentés sous l'action de différents médiateurs de la phase aiguë de

l'inflammation tels que le TNF, l'IL-6 et l'IL-1 ou après stimulation par le LPS (La Cava, 2004). De même, les taux de leptine sont augmentés au cours de péritonites expérimentales ou de modèles d'inflammation aiguë chez le rat (pleurésie ou œdème de la patte induits par les carraghénates) (Gualillo, 2000). Ces résultats suggèrent un rôle de la leptine dans les mécanismes de défense de l'hôte.

II.2.2.1. Effets de la leptine sur la réponse immunitaire adaptative

Ces effets concernent essentiellement **les lymphocytes T CD4⁺**.

- Rôle dans la génération, la maturation et la survie des thymocytes, en retardant leur entrée en apoptose.

En effet, au cours du jeûne, une diminution brutale du nombre de calories absorbées provoque une diminution rapide des taux sériques de leptine, accompagnée d'une atrophie thymique, réversible avec l'administration de leptine (La Cava, 2004). De plus, les souris ob/ob, déficitaires en leptine, présentent également un thymus de petite taille, renfermant de nombreux thymocytes apoptotiques. Cette atrophie thymique affecte le cortex du thymus, où se trouvent la plupart des thymocytes double positifs CD4⁺CD8⁺, et l'apport de leptine permet de réduire le taux d'apoptose de ces cellules (Howard, 1999). La leptine apporterait donc un signal de survie aux thymocytes double positifs CD4⁺CD8⁺ et simple positifs durant la maturation des lymphocytes T. Elle exerce également des effets anti-apoptotiques sur les cellules T matures. Ces effets peuvent résulter de son aptitude à augmenter l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L, qui protègent les cellules T et les thymocytes de l'apoptose (La Cava, 2004 ; Matarese, 2005).

- Rôle dans la prolifération et l'activation lymphocytaire T

L'addition de concentrations physiologiques de leptine lors d'une réaction lymphocytaire mixte (LMR) induit une prolifération dose dépendante des lymphocytes T CD4⁺. Néanmoins, la leptine présente des effets différents sur la prolifération et la production de cytokines par les cellules T CD4⁺ naïves (CD45RA⁺) et mémoires (CD45RO⁺). Ainsi, la leptine augmente la prolifération et la sécrétion d'IL-2 par les cellules T naïves alors qu'elle possède de très faibles effets sur la prolifération des cellules T mémoires, voire un effet inhibiteur (La Cava, 2004 ; Matarese, 2005).

La leptine augmente également l'expression de molécules d'adhérence à la surface des lymphocytes T CD4⁺, telles que « Intercellular adhesion molecule 1 » (ICAM1) ou « very late

antigen 2 » (VLA2), pouvant permettre l'activation et la migration des cellules immunitaires vers les sites de l'inflammation (Faggioni, 2001 ; La Cava, 2004).

Enfin, la leptine induit une polarisation Th1 des réponses immunitaires. En effet, elle augmente la production d'IFN- γ et de TNF α par les lymphocytes T, conduisant de ce fait à une augmentation de la production d'IgG2a par les cellules B, des réactions d'hypersensibilité retardée et de l'activation des macrophages. A l'inverse, elle inhibe les réactions de type Th2, diminuant ainsi la production d'IL-4 et d'immunoglobulines d'isotype IgG1 (Faggioni, 2001 ; La Cava, 2004 ; Matarese, 2005).

- Rôle dans la production d'hormone de croissance par les lymphocytes

La leptine possède un autre mécanisme d'action sur les cellules immunitaires. Elle peut en effet stimuler la production d'hormone de croissance (GH) par les lymphocytes du sang périphérique, par des mécanismes dépendants de la protéine kinase C et de l'oxyde nitrique. Les lymphocytes expriment en effet des récepteurs pour la GH à leur surface et produisent eux-mêmes cette hormone (Dixit, 2003).

La GH joue un rôle important dans le développement et la régulation du système immunitaire. Ce rôle s'exerce en particulier sur les lymphocytes T. En effet, la GH intervient dans le développement des lymphocytes T au niveau du thymus (Murphy, 1994). Elle régule également l'adhésion et la migration des lymphocytes T (Taub, 1994). Par ailleurs, *in vitro*, elle potentialise la prolifération et la réponse cytokinique des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ aux antigènes dont ils sont spécifiques (Murphy, 2000).

Par ailleurs, la leptine augmente l'expression du récepteur de la GH à la surface des lymphocytes, potentialisant les effets biologiques de la GH sur ces cellules (Dixit, 2003).

La leptine pourrait donc réguler les réponses immunitaires en induisant la production locale de GH par les lymphocytes.

II.2.2.2. Effets de la leptine sur la réponse immunitaire innée

- Rôle dans l'activation et la prolifération des **monocytes/macrophages**

La leptine augmente l'expression à la surface des monocytes d'une part de marqueurs d'activation, tels CD38, CD25 (chaîne α du récepteur à l'IL-2) ou CD71 (récepteur de la transferrine) et d'autre part de certaines molécules d'adhérence (CD11b/CD18, CD11c/CD18) et des molécules de CMH (HLA-DR) (Santos-Alvarez, 1999). Par ailleurs, elle régule les fonctions des macrophages, telles la phagocytose, (les macrophages de souris ob/ob ou db/db présentent en effet une fonction phagocytaire altérée, restaurée par l'administration de leptine

recombinante ; Loffreda, 1998), l'expression de la cyclooxygénase 2, la sécrétion de leucotriène B4 ou de monoxyde d'azote (Raso, 2002; Otero, 2005). Elle induit également la production par ces cellules de cytokines pro-inflammatoires, telles le TNF α ou l'IL-6 (Loffreda, 1998 ; Santos-Alvarez, 1999 ; Zarkesh-Esfahani, 2001). Enfin, il a été montré que la leptine exerçait un effet sur la survie des monocytes, en prévenant leur apoptose, via l'activation des MAPK (Sanchez-Margalet, 2003).

- Rôle dans le développement, la différenciation, la prolifération, l'activation et la cytotoxicité des **cellules NK**, augmentant leur sécrétion de perforine et d'IL-2 (La Cava, 2004 ; Otero, 2005).

- Rôle dans la survie des **polynucléaires éosinophiles**

Une étude récente a en effet montré que les polynucléaires éosinophiles exprimaient à leur surface le récepteur de la leptine (isoforme court Ob-Ra) et que la leptine exerçait un effet anti-apoptotique sur ces cellules, médié par l'activation des MAPK et de la PI3K (Conus, 2005)

- Rôle dans la régénération tissulaire

Le récepteur Ob-Rb est exprimé à la surface des cellules endothéliales et la leptine jouerait un rôle dans l'angiogénèse. La leptine induit la prolifération des kératinocytes *in vitro* et permet la ré-épithélisation des plaies *in vivo*. De plus, les souris déficientes en leptine sont caractérisées par un retard important de cicatrisation des plaies. En raison de ses propriétés mitogènes et angiogéniques, la leptine pourrait jouer un rôle important dans la régénération tissulaire au cours des réponses inflammatoires (Faggioni, 2001).

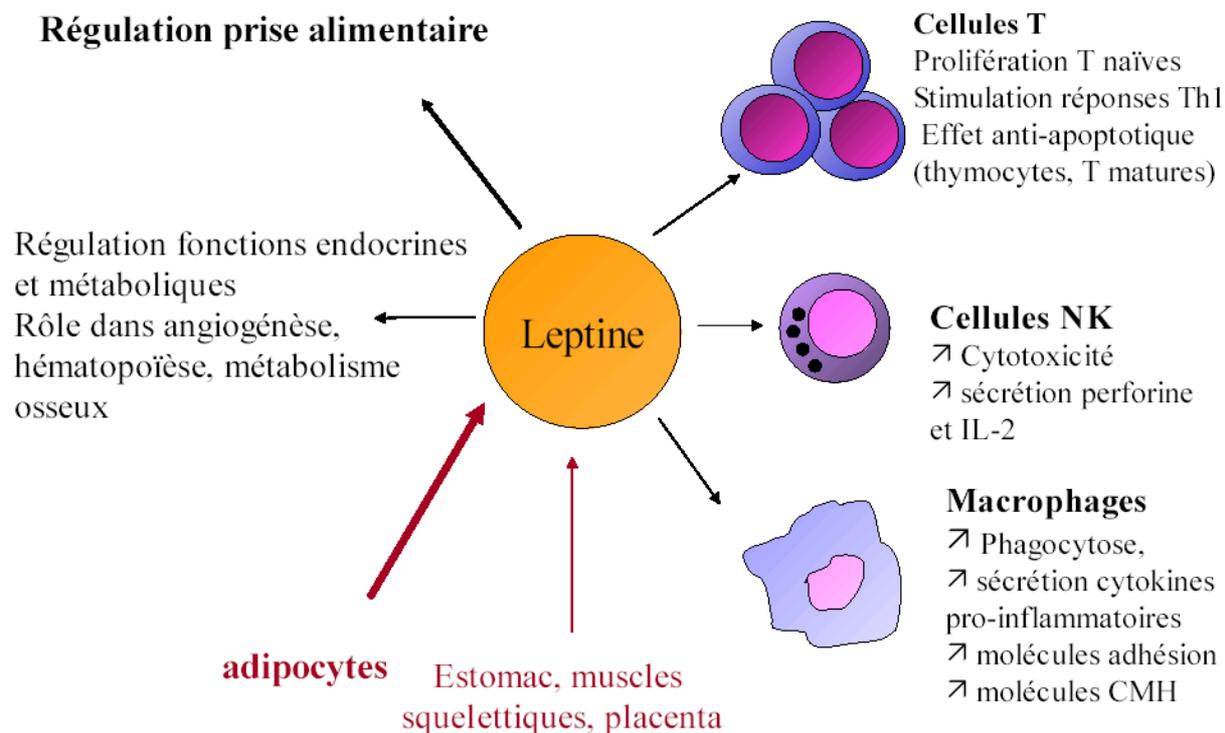


Figure II. Schéma récapitulatif sur les principales fonctions de la leptine.

II.3. Implication de la leptine au cours de certaines situations pathologiques

Parallèlement à son rôle physiologique dans la régulation des réponses immunitaires, la leptine a été impliquée dans la physiopathologie de certaines maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques.

II.3.1 Rôle de la leptine au cours de certaines maladies auto-immunes

Différents arguments plaident en faveur de l'implication de la leptine dans les processus auto-immuns :

- Les souris ob/ob présentent une diminution de sécrétion d'IL-2, d'IFN- γ , de TNF α et d'IL-18, associée à une production augmentée de cytokines de type Th2, telles que l'IL-4 et l'IL-10. Ces souris sont résistantes à l'induction expérimentale de différentes maladies auto-immunes (La Cava, 2004 ; Matarese, 2005).

- Dans l'**Encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE)**, modèle murin de sclérose en plaques, la survenue de la maladie est précédée d'une augmentation des taux sériques de leptine. En outre, le jeûne, qui réduit les taux de leptine, retarde la survenue de la maladie et

atténue les symptômes. Enfin, les souris ob/ob sont résistantes à l'induction de l'EAE, cette résistance étant abolie par l'administration de leptine (avec un switch vers la production de cytokines de type Th1) (Otero, 2005). Chez l'homme, une diminution du nombre de calories ingérées ou des changements diététiques peuvent améliorer les symptômes de la sclérose en plaque.

- La leptine a également été impliquée dans le **diabète de type 1**, où les cellules β pancréatiques sont détruites par un processus inflammatoire immun. En effet, les souris femelles NOD (qui constituent l'un des meilleurs modèles animaux de diabète de type 1) ont des taux sériques de leptine augmentés avant la survenue de la maladie. De plus, l'administration de leptine exogène accélère la survenue et la progression de la maladie, en accélérant la destruction auto-immune des cellules β pancréatiques et en augmentant la sécrétion d'INF- γ par les cellules T périphériques. La leptine interviendrait donc dans le développement du diabète de type 1 via des réponses Th1 (La Cava, 2004 ; Otero, 2005).

- Un autre élément en faveur de l'implication de la leptine dans l'autoimmunité est le dimorphisme sexuel observé au niveau des concentrations sériques de leptine, plus élevées chez les femmes que chez les hommes de même âge et de même indice de masse corporelle. La leptine pourrait donc s'ajouter aux autres hormones telles l'œstradiol ou la prolactine, connues pour participer à la prédisposition féminine aux maladies auto-immunes. Ainsi, seules les souris femelles hyperleptinémiques développent des maladies auto-immunes alors que les souris hypoleptinémiques sont protégées. Le traitement des souris mâles résistantes à l'EAE par de la leptine recombinante les rend susceptibles à cette maladie (La Cava, 2004 ; Matarese, 2005).

II.3.2 Rôle de la leptine au cours de certaines maladies inflammatoires chroniques

- Une augmentation de la sécrétion périphérique de leptine a été associée à de nombreuses situations d'inflammation chronique, telles les stéatoses hépatiques non alcooliques, la bronchopneumopathie chronique obstructive, les maladies inflammatoires intestinales, la polyarthrite rhumatoïde...(Uygun, 2000 ; Schols, 1999 ; Bokarewa, 2003). Néanmoins, d'autres études effectuées chez l'homme ont rapporté des concentrations de leptine dans les limites de la normale au cours de ces différentes situations inflammatoires (Chalasanani, 2003 ; Takabatake, 1999 ; Anders, 1999). Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par des

caractéristiques différentes des patients étudiés, en particulier selon le stade de la maladie (La Cava, 2004).

- Les **maladies inflammatoires intestinales** sont souvent associées à une perte de poids marquée. Dans un modèle d'inflammation intestinale chez le rat (colite induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique), les taux de leptine sont élevés, corrélés avec le degré d'inflammation et associés à une anorexie (Barbier, 1998). Chez l'homme, des taux élevés de leptine sont observés chez les patients au stade aigu de la colite ulcéreuse, ces taux élevés pouvant contribuer à l'anorexie et à la perte de poids (Otero, 2005).

Très récemment a été découvert que les cellules épithéliales gastriques du rat et de l'homme produisent de la leptine. La leptine gastrique, résistante à la dégradation protéolytique, peut de ce fait atteindre l'intestin sous une forme active et ainsi agir sur d'éventuelles cibles lumineuses. Les récepteurs de la leptine ont par ailleurs été décrits au niveau de la bordure en brosse des entérocytes mais aussi à la membrane apicale des cellules épithéliales coliques (Sitaraman, 2004).

La leptine gastrique peut agir sur l'intestin grêle mais il semble peu probable qu'elle puisse avoir une action sur le colon. Néanmoins, chez les patients présentant une colite ulcéreuse modérée à sévère ou chez les patients atteints de maladie de Crohn, des taux élevés de leptine ont été observés au niveau du colon. La leptine pourrait être libérée par les cellules en nécrose ou en apoptose au cours des maladies inflammatoires intestinales. De plus, la leptine plasmatique pourrait traverser les épithéliums et se retrouver au niveau de la lumière intestinale. Par ailleurs, si la leptine n'est pas détectée au niveau des cellules épithéliales coliques normales, les cellules épithéliales coliques inflammatoires expriment de fortes quantités de leptine, concentrée au niveau de leur partie apicale. Ces résultats suggèrent que les cellules épithéliales coliques inflammatoires puissent constituer l'une des principales sources de leptine lumineuse chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales. En outre, la leptine lumineuse induit l'activation du facteur de transcription NF- κ B, cette activation étant impliquée dans la pathogénèse des maladies inflammatoires intestinales. In vivo, la leptine induit également des dommages de la paroi épithéliale colique : la leptine est considérée de ce fait comme une cytokine pro-inflammatoire au niveau du colon (Sitaraman, 2004).

Enfin dans un modèle murin d'inflammation intestinale chronique, la réponse immunitaire au niveau intestinal, faisant intervenir les lymphocytes T de la lamina propria, est modifiée par la leptine. Cette dernière, agissant par l'intermédiaire du récepteur Ob-Rb exprimé à la surface

des lymphocytes T, modifie en particulier la production de cytokines et l'apoptose des lymphocytes T (diminution de l'apoptose de ces cellules) (Siegmund, 2004).

- La leptine semble également jouer un rôle majeur dans la pathogénèse de la **polyarthrite rhumatoïde**. En effet, dans des modèles expérimentaux, les souris ob/ob et db/db développent une arthrite moins sévère par rapport aux animaux sauvages et présentent des taux diminués d'IL-1 β et de TNF α dans le liquide synovial. Les souris ob/ob présentent également une diminution de la prolifération des cellules T, une diminution de la sécrétion d'INF- γ et une augmentation de la sécrétion d'IL-10. L'augmentation de la production de leptine au cours de la polyarthrite rhumatoïde est également un argument en faveur de son implication dans la physiopathologie de cette maladie. En outre, chez les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde, le jeûne conduit à l'amélioration des différents marqueurs cliniques ou biologiques d'activité de la maladie, ceci étant associé à une diminution des taux de leptine et une polarisation Th2 des réponses immunitaires. La leptine pourrait donc influencer les mécanismes inflammatoires de l'arthrite via l'induction de réponses Th1. De plus, les chondrocytes expriment la leptine et l'isoforme long de son récepteur. La leptine exerce un effet synergique avec l'IFN- γ et l'IL-1 sur l'induction de la NO synthase de type II, aboutissant à la production d'oxyde nitrique, médiateur impliqué dans la plupart des altérations inflammatoires du cartilage, incluant l'apoptose des chondrocytes et l'activation des métalloprotéases (Otero, 2005).

- Enfin, chez les sujets obèses, non déficients en leptine, les taux élevés de leptine reflète une résistance à la leptine, provoquée par une down-regulation du récepteur ObR. Ceci pourrait conduire à une dérégulation immunitaire et à une altération de la balance Th1/Th2, entraînant une susceptibilité aux infections et une réponse inflammatoire anormale. L'obésité est en effet considérée comme un état pro-inflammatoire, étant associée à une infiltration progressive des tissus adipeux par des macrophages, qui sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6). Ces dernières vont stimuler les adipocytes pour sécréter davantage de leptine et de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF α (Matarese, 2005).

En conclusion, la leptine joue un rôle majeur dans la régulation de l'immunité, permettant de maintenir une réponse immunitaire optimale et de protéger ainsi les individus des infections. Néanmoins elle est également impliquée dans la physiopathologie de l'inflammation et des

maladies auto-immunes. Des perspectives thérapeutiques, visant à contrecarrer l'action néfaste de la leptine, pourraient ainsi être envisagées au cours des maladies inflammatoires ou auto-immunes. Il serait ainsi possible d'utiliser un récepteur soluble capable de se lier avec une forte affinité à la leptine, permettant ainsi de contrôler la quantité de leptine disponible, comme cela a été proposé afin de s'opposer aux effets néfastes du TNF α dans la polyarthrite rhumatoïde. Une autre perspective thérapeutique consisterait en l'utilisation d'anticorps monoclonaux humanisés anti-leptine ou de mutants de leptine présentant des propriétés antagonistes, capables de se lier au récepteur de la leptine sans l'activer (Otero, 2005).

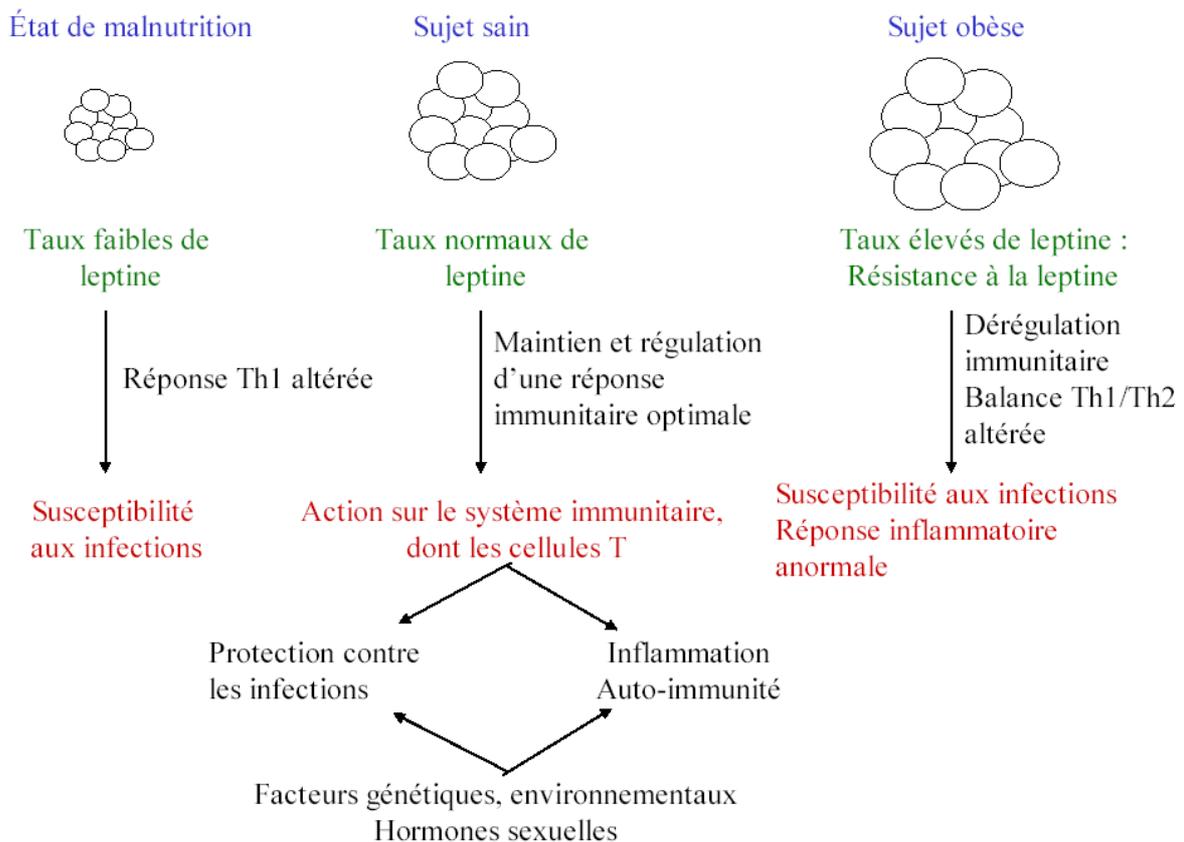


Figure III. Possibles mécanismes d'action de la leptine dans la susceptibilité aux infections et aux maladies auto-immunes. (d'après Matarese, 2005)

III. Le « Vasoactive Intestinal Peptide »

Le « Vasoactive Intestinal Peptide » ou VIP est un neuropeptide de 28 acides aminés, produit par les cellules neurales et les cellules lymphoïdes (en particulier les cellules Th2), qui présente une large distribution dans les systèmes nerveux central et périphérique.

III.1 Structure et récepteurs

Isolé en 1970 par Sami Said et Victor Mutt, le VIP appartient à une famille de 9 membres, comprenant entre autres, la sécrétine et le glucagon. Cette famille comprend par ailleurs un peptide isolé plus récemment, nommé « Pituitary adenylate cyclase-activating peptide » (PACAP-38), qui possède un isoforme plus court, PACAP-27. Au sein de cette famille Sécrétine-Glucagon-VIP, le VIP et le PACAP présentent la plus forte homologie, PACAP-27 présentant 67% d'homologie avec le VIP. De plus, ils agissent sur les mêmes récepteurs et partagent plusieurs propriétés biologiques (Laburthe, 2002 ; Ganea, 2002)

Les récepteurs du VIP ont été décrits au cours des années soixante-dix dans le foie, le tissu adipeux, le pancréas exocrine et l'épithélium intestinal. Ces récepteurs sont également abondamment exprimés par différentes cellules cancéreuses, en particulier au cours du cancer du colon. Les récepteurs du VIP ont par la suite été caractérisés dans la plupart des tissus, en relation avec la distribution large de ce neuropeptide dans le cerveau et le système nerveux périphérique (Laburthe, 2002).

Trois récepteurs du VIP/PACAP ont été clonés. Parmi ces trois récepteurs, deux sont capables de lier plusieurs peptides naturels, de faible affinité, appartenant à la famille Sécrétine-Glucagon-VIP. De plus, ils présentent une affinité très similaire pour le VIP et le PACAP. Ces deux récepteurs, liant le VIP et le PACAP avec la même affinité, ont été ainsi appelés VPAC (contraction de VIP et PACAP), respectivement VPAC1 et VPAC2. Par ailleurs, un récepteur spécifique du PACAP, PAC1, a été cloné en 1993. PAC1 lie de façon sélective le PACAP, présentant une affinité 300 à 1000 fois plus élevée pour le PACAP que pour le VIP (Laburthe, 2002 ; Ganea, 2002 ; Pozo, 2003).

Très rapidement a été mis en évidence le rôle de l'AMPc comme second messager prépondérant dans l'action du VIP. Les récepteurs VPAC et PAC1 ont en effet une structure à 7 hélices transmembranaires, typique des récepteurs couplés à des protéines G. L'engagement des récepteurs VPAC et PAC1 conduit à l'activation de l'adénylate cyclase puis à l'accumulation d'AMPc, via la stimulation des sous-unités α des protéines Gs. L'augmentation du taux d'AMPc cellulaire permet l'activation d'enzymes dépendantes de l'AMPc, notamment la protéine kinase A (Laburthe, 2002 ; Pozo, 2003, 2004).

En outre, les récepteurs du VIP sont capables de déclencher des réponses biologiques par le biais d'autres voies de signalisation. Ils peuvent en particulier activer la phospholipase C, via les protéines *Gai/αq*, entraînant une augmentation de l'inositol 1,4,5-triphosphate et du calcium (Harfi, 2005).

Ainsi, VPAC1 et VPAC2 activent principalement la voie de l'adénylate cyclase alors que PAC1 active à la fois l'adénylate cyclase et la phospholipase C (Pozo, 2003).

III.2 Fonctions du VIP

III.2.1 Rôle du VIP en tant que neurotransmetteur et neuromodulateur

Initialement décrit au niveau du poumon et de l'intestin grêle comme **peptide vasodilatateur et hypotenseur**, le VIP a par la suite été identifié au niveau des systèmes nerveux et endocrinien, agissant comme un neurotransmetteur et un neuromodulateur multifonctionnel. Le VIP exerce en effet un large spectre d'actions biologiques chez les mammifères, des effets du VIP ayant été décrits dans le tractus digestif, le système cardiovasculaire, les voies aériennes, le système reproducteur, le système immunitaire, les glandes endocrines et le cerveau.

En plus de ses actions à court terme sur les sécrétions endocrines et exocrines, la relaxation musculaire, le métabolisme, la régulation du tonus vasculaire et de la motilité intestinale, le VIP intervient également durant le développement cérébral embryonnaire. Des données plus récentes ont montré que le VIP jouerait également un rôle dans la perception de la douleur (Laburthe, 2002).

III.2.2. Rôle du VIP dans les réponses immunitaires

Le VIP s'est avéré être également **immunomodulateur**. Le VIP, et probablement le PACAP, est libéré au niveau des organes lymphoïdes par les fibres nerveuses et les cellules immunitaires (Ganea, 2002 ; Delgado, 2003a). Les fibres nerveuses libératrices de VIP sont en effet trouvées dans la plupart des organes lymphoïdes, en particulier au niveau du tractus respiratoire et du tractus gastro-intestinal, à proximité des cellules immunitaires. En outre, les cellules immunitaires elles-mêmes, en particulier les lymphocytes T, expriment et secrètent le VIP en réponse à différents stimuli, tels que le LPS, les cytokines ou des anticorps anti-TCR. En particulier, le VIP est synthétisé et sécrété par les cellules Th2 après stimulation antigénique, à la fois *in vivo* et *in vitro* (Ganea, 2002 ; Pozo, 2003, 2004).

Différentes cellules du système immunitaire expriment à leur surface les récepteurs pour le VIP/PACAP, cette expression pouvant être modulée au cours de la différenciation ou de l'activation cellulaire. Ainsi des macrophages péritonéaux murins expriment VPAC1 et PAC1 de façon constitutive et VPAC2 après stimulation par le LPS. Les lymphocytes T expriment quant à eux VPAC1 et VPAC2 (mais pas PAC1), l'expression de VPAC1 étant constitutive, celle de VPAC2 inductible. En effet, les cellules T non stimulées expriment de façon

marginale VPAC2, cette expression étant augmentée après stimulation du TCR ou exposition aux cytokines. Par ailleurs, l'expression de VPAC1 est diminuée à la surface des cellules T stimulées, suggérant un rôle essentiel de VPAC2 pour médier les effets du VIP sur les cellules T activées (Ganea, 2002 ; Pozo, 2003 ; Delgado, 2003a).

III.2.2.1. Effet du VIP sur les lymphocytes T

- Plusieurs auteurs ont rapporté un **effet inhibiteur du VIP sur la production d'IL-2** et donc sur la prolifération des cellules T après exposition à l'antigène (Ganea, 2002).

- Le VIP et le PACAP exercent par ailleurs un effet sur la différenciation des cellules T CD4⁺, inhibant les réponses Th1 et **induisant des réponses Th2**, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, des macrophages ou des cellules dendritiques traités *in vitro* par du VIP ou du PACAP acquièrent l'aptitude à induire la production de cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5) et inhibent parallèlement la production des cytokines de type Th1 (IFN- γ , IL-2) dans des lymphocytes T CD4⁺ stimulés par un antigène. De plus, l'administration *in vivo* de VIP ou de PACAP chez une souris immunisée induit une diminution du nombre de cellules Th1 et une augmentation du nombre de cellules Th2 (Ganea, 2002 ; Pozo, 2004). Par ailleurs, des souris transgéniques, exprimant de façon constitutive VPAC2 à la surface des lymphocytes T CD4⁺ à des taux comparables à ceux de cellules normales après stimulation maximale du TCR produisent davantage de cytokines de type Th2 que de cytokines de type Th1. Elles présentent également des taux élevés d'IgE et de polynucléaires éosinophiles et développent des réactions allergiques cutanées. A l'inverse, chez des souris knockout VPAC2^{-/-}, l'activation des cellules T conduit à une production plus importante de cytokines de type Th1, conduisant à des réactions d'hypersensibilité retardée augmentées et à une diminution des réactions d'hypersensibilité de type I (Pozo, 2003 ; Delgado, 2003a).

Plusieurs mécanismes non exclusifs permettent d'expliquer la polarisation Th2 des réponses immunitaires induite par le VIP/PACAP (Ganea, 2002 ; Delgado, 2003a ; Pozo, 2004).

- ✓ Action sur les cellules présentatrices d'antigène : la différenciation en effecteurs Th2 dépend beaucoup plus de l'expression de molécules de co-stimulation de la famille B7 que la différenciation Th1. Le VIP, en augmentant l'expression de B7-2 à la surface des macrophages non stimulés et des cellules dendritiques immatures, induit une polarisation Th2 des réponses immunitaires.
- ✓ Action sur les effecteurs Th1/Th2 : La majorité des cellules effectrices Th1 et Th2 sont éliminées en fin de réponse immunitaire par apoptose médiée par Fas/FasL

(processus d'AICD ou « antigen-induced cell death », mort cellulaire induite par l'antigène), avec survie de quelques cellules T mémoires. Le VIP favorise la survie préférentielle des effecteurs Th2 par rapport aux effecteurs Th1.

- ✓ Action sur les macrophages activés : le VIP et le PACAP inhibent la production d'IL-12 par les macrophages activés. L'IL-12 jouant un rôle déterminant dans la différenciation Th1, une diminution de la production de cette cytokine participe à la différenciation Th2.
- ✓ Action sur les chimiokines spécifiques Th1/Th2 : IP10 (IFN- γ induced-protein 10, CXCL10) et MDC (macrophage-derived chemokine, CCL22) sont des chimiokines dérivées des macrophages et des cellules dendritiques qui attirent de façon spécifique les cellules Th1 et Th2 respectivement. Le VIP inhibe la production d'IP10 et stimule la production de MDC, favorisant la chimioattraction des cellules Th2 vers le site de présentation antigénique.
- ✓ Enfin, le VIP pourrait agir directement sur les lymphocytes T CD4⁺ et polariser la différenciation Th1/Th2 vers le type Th2 en stimulant l'expression des facteurs de transcription Th2 (notamment GATA3) et en inhibant l'expression de T-bet, facteur de transcription Th1.

- Le VIP exerce enfin un effet sur la **cytotoxicité des lymphocytes T**. En effet, les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques détruisent leurs cibles par deux mécanismes : un mécanisme dépendant du calcium, médié par la perforine et les granzymes, et un mécanisme calcium indépendant, médié le système Fas/FasL. Les cellules T CD4⁺ possèdent également une activité cytotoxique, détruisant leurs cibles via les interactions Fas/FasL. Le VIP et le PACAP n'affectent pas la cytotoxicité médiée par le système perforine/granzymes mais inhibent la cytotoxicité des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ médiée par Fas/FasL, cette inhibition résultant d'une diminution de l'expression de FasL à la surface des cellules T cytotoxiques (Ganea, 2002).

III.2.2.2. Propriétés anti-inflammatoires du VIP

Le VIP a clairement été identifié ces dernières années comme un facteur **anti-inflammatoire**. Le macrophage activé constitue l'une des cibles principales du VIP, ce dernier exerçant son rôle de « **facteur désactivant les macrophages** » de plusieurs façons :

- Le VIP et le PACAP inhibent plusieurs fonctions des macrophages, telles la phagocytose, l'explosion oxydative et le chimotactisme (Delgado, 1999a).

- Ils inhibent également la production par les macrophages activés de cytokines pro-inflammatoires, telles que le $TNF\alpha$, l'IL-6 et l'IL-12 (Delgado, 1999b). Par ailleurs, le VIP et le PACAP inhibent la production de monoxyde d'azote (NO), par inhibition de la NO synthase inductible (Delgado, 1999a). A l'inverse, ils augmentent la production d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire. L'effet du VIP sur la production de $TNF\alpha$, d'IL-12, d'IL-10 et de NO est principalement médié par le récepteur VPAC1, VPAC2 intervenant dans une moindre mesure. L'inhibition de la production d'IL-6 est quant à elle médiée par le récepteur PAC1 (Ganea, 2002 ; Pozo, 2003).

- Le VIP et le PACAP modulent également la production par les macrophages de différentes chimiokines. Ils inhibent en effet l'expression de deux chimiokines CXC (MIP-2 et IL-8), chimioattractantes pour les PN, et de quatre chimiokines CC [MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) et RANTES], chimioattractantes pour les monocytes/macrophages et les lymphocytes T. Cette inhibition est médiée par le récepteur VPAC1 (Pozo, 2003). Par ailleurs, l'administration intrapéritonéale de VIP ou de PACAP dans un modèle de péritonite aiguë conduit à une diminution significative du recrutement des PN, des macrophages et des lymphocytes T dans la cavité péritonéale (Ganea, 2002).

- Enfin, le VIP et le PACAP régulent l'expression des molécules de co-stimulation B7 à la surface des macrophages. Cette régulation s'exerce de façon différente selon que le macrophage est au repos ou est activé. Ainsi, sur les macrophages non stimulés, le VIP et le PACAP augmentent l'expression de la molécule B7-2, sans affecter celle de la molécule B7-1, l'augmentation de l'expression de la molécule B7-2 intervenant dans la polarisation Th2 des réponses immunitaires. Au contraire, le VIP et le PACAP inhibent l'expression des molécules de co-stimulation B7.1/B7.2 à la surface des macrophages activés, inhibant leur activité stimulatrice sur les lymphocytes T activés (Ganea, 2002).

La plupart des études réalisées sur macrophages activées ont donc conduit à considérer le PACAP comme un facteur anti-inflammatoire ou « peptide désactivant les macrophages », **ceci de façon identique au VIP**. Néanmoins, certaines études ont mis en évidence un effet pro-inflammatoire du PACAP. Ainsi, le PACAP augmente la phagocytose et la production d'anion superoxyde par des macrophages murins non stimulés (Delgado, 1996). De plus, il augmente la production par ces cellules d'IL-6 (Martinez, 1998), cet effet impliquant le récepteur VPAC1.

Une étude récente a par ailleurs montré que le PACAP agissait comme une molécule pro-inflammatoire sur les monocytes humains. En effet, le PACAP induit des changements cytoplasmiques et phénotypiques caractéristiques de l'activation des monocytes, avec une augmentation de la production de FRO et une augmentation de l'expression de CD11b/CD18 et de CD35 (El Zein, 2006).

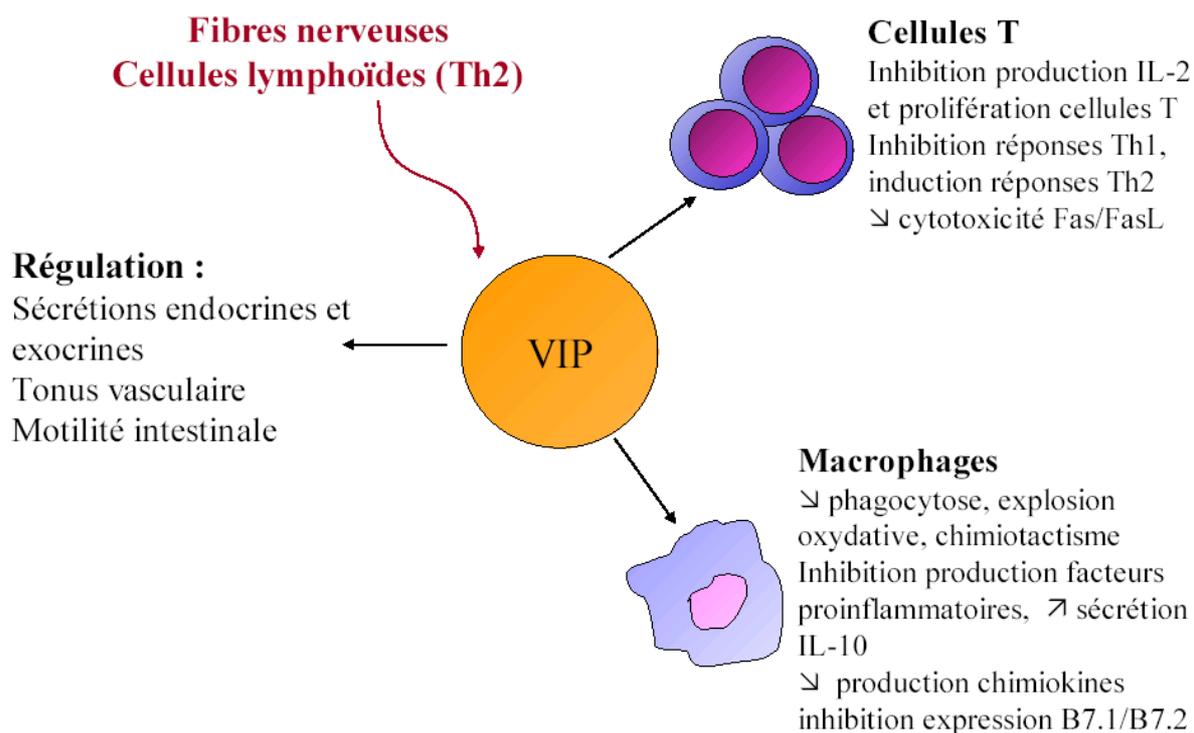


Figure IV. Schéma récapitulatif sur les principales fonctions du VIP.

III. 3 Rôle potentiel du VIP en tant qu'agent thérapeutique au cours de certaines maladies inflammatoires et auto-immunes.

De par ses propriétés anti-inflammatoires, le VIP pourrait présenter un intérêt clinique dans le traitement de certaines maladies inflammatoires ou certaines maladies auto-immunes.

➤ Intérêt thérapeutique du VIP dans **la polyarthrite rhumatoïde**

Dans des modèles murins d'arthrite induite par le collagène, un traitement par le VIP diminue la fréquence, retarde la survenue et réduit la sévérité de la maladie (Pozo, 2003). L'effet du VIP est associé à une diminution de la réponse auto-immune et de la réponse inflammatoire. On observe en effet une diminution du taux des auto-anticorps anti-collagène, en réponse à une diminution de la réponse cellulaire T spécifique du collagène. De plus, le VIP diminue la

production de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires dans les articulations inflammées par les cellules synoviales, incluant le $\text{TNF}\alpha$, l'IL-6, l'IL-1 β , l'IL-12, l'IL-18, le NO et différentes chimiokines (RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β). Par ailleurs, les taux de VIP sont augmentés dans le sérum et les articulations de souris arthritiques durant le développement de la maladie. Ainsi, le VIP peut être considéré comme un facteur antiarthritique endogène, activé en réponse à des situations auto-immunes ou inflammatoires afin de contre-balancer les effets des médiateurs inflammatoires (Pozo, 2004).

➤ Intérêt thérapeutique du VIP dans **la maladie de Crohn**

Dans un modèle murin de maladie de Crohn, induite par l'administration intra-rectale d'acide trinitrobenzène sulfonique, l'administration de VIP réduit la sévérité clinique et histopathologique de la maladie, diminuant la perte de poids, les diarrhées et l'inflammation intestinale. Cet effet, observé aux différents stades de la maladie, s'explique par une down régulation de la production de différents médiateurs pro-inflammatoires ($\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β , IL-12, MIP-1 α , MCP-1), conduisant à une diminution de l'inflammation et à une diminution de l'infiltration de PN, de macrophages et de lymphocytes T CD4⁺ dans la lamina propria (Pozo, 2004).

➤ Intérêt thérapeutique du VIP dans les **maladies neurodégénératives**

Le VIP agit comme un facteur désactivateur de la microglie, capable de prévenir la neurodégénérescence induite par l'inflammation. En effet, la microglie cérébrale est impliquée dans la surveillance immunitaire et la défense de l'hôte contre les agents infectieux. Cependant, en réponse à une agression, une infection ou à l'inflammation, la microglie est activée. En particulier, plusieurs maladies neurodégénératives, telles que la maladie de Parkinson, la sclérose en plaque ou la maladie d'Alzheimer, sont caractérisées par une activation de la microglie ; cette activation pathologique pourrait contribuer aux dommages progressifs observés au cours de ces maladies neurodégénératives, via le relargage de facteurs pro-inflammatoires et/ou cytotoxiques, tels que des cytokines pro-inflammatoires ($\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-12), le NO ou des formes réactives de l'oxygène. Dans des conditions inflammatoires, le VIP est capable de prévenir la neurodégénérescence et l'activation de la microglie à la fois *in vitro* et *in vivo*. Cet effet neuroprotecteur du VIP passe par une inhibition de la production des facteurs pro-inflammatoires dérivés de la microglie ($\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , NO) (Delgado, 2003b). Le VIP pourrait de ce fait avoir un intérêt thérapeutique, d'une part dans certaines maladies cérébrales où la réponse inflammatoire joue un rôle majeur dans la neurodégénérescence et

d'autre part, au cours des traumatismes cérébraux où l'on observe précocement une augmentation du taux de cytokines pro-inflammatoires ; dans ce dernier cadre, le VIP prévient la mort des cellules neuronales en réduisant la réponse inflammatoire de la microglie (Pozo, 2004).

➤ Effet du VIP au cours **des chocs septiques**

In vivo, le VIP et le PACAP exercent un effet protecteur dans des modèles murins de chocs septiques. Les animaux traités par le VIP ne présentent pas les caractéristiques histopathologiques associées au choc septique, telles qu'une CIVD, une infiltration leucocytaire et une inflammation de différents organes... Cet effet protecteur s'explique en partie par l'inhibition de la production de facteurs pro-inflammatoires tels que le $TNF\alpha$, l'IL-6, l'IL-12 et le NO ainsi que par l'augmentation de la production d'IL-10 (Pozo, 2004). Des données récentes ont montré que l'action inhibitrice du VIP sur l'infiltration des PN dans les organes cibles, l'expression de molécules d'adhérence ICAM-1 et VCAM-1 par les cellules endothéliales ou la synthèse de fibrinogène était médiée par le récepteur PAC1 (Martinez, 2005).

De plus, l'effet inhibiteur du VIP sur la production de chimiokines proinflammatoires interviendrait également dans son action préventive sur les chocs endotoxiques. Enfin, l'effet protecteur du VIP pourrait être médié par la régulation des taux sériques de certaines hormones comme l'adrénaline ou le cortisol, qui contrôlent les constantes hémodynamiques (Pozo, 2004).

IV. Effets de la leptine et du VIP sur les fonctions des PN : études antérieures

Le récepteur de la leptine a été récemment mis en évidence à la surface des PN. Cette expression a été décrite à la fois sur PN isolés et dans des conditions de sang total, par immunohistochimie (Caldefie-Chezet, 2001), immunofluorescence (Bruno, 2005) ou cytométrie en flux (Zarkesh-Esfahani, 2001, 2004). Néanmoins, la proportion de PN exprimant à leur surface le récepteur de la leptine était plus élevée sur PN isolés que dans les conditions de sang total ($46 \pm 2,8\%$ versus $12 \pm 4\%$ respectivement), ceci pouvant s'expliquer par les procédures d'isolement des PN qui modifient l'expression des récepteurs à la surface des PN (Zarkesh-Esfahani, 2001, 2004). En outre, à la différence des monocytes, qui expriment à la fois les isoformes courts et long des récepteurs de la leptine, **les PN**

expriment seulement l'isoforme court Ob-Ra à leur surface (Zarkesh-Esfahani, 2004 ; Bruno, 2005).

De même, les récepteurs du VIP/PACAP ont été récemment mis en évidence à la surface des PN. Néanmoins, **le récepteur VPAC1 a été trouvé comme étant le seul récepteur exprimé par les PN**, ceci par RT-PCR puis immunoblot (Harfi, 2004). Par la suite des techniques d'immunohistochimie, d'immunofluorescence et de cytométrie en flux ont démontré l'expression du récepteur VPAC1 à la membrane des PN (Harfi, 2005).

Toutefois, peu d'auteurs se sont intéressés aux effets de ces neuropeptides sur les fonctions des PN et les résultats rapportés sont controversés.

IV. 1 Effets de la leptine sur les fonctions des PN

IV.1.1. Expression des molécules d'adhérence

Il a été récemment rapporté que **la leptine augmentait l'expression de la $\beta 2$ intégrine CD11b/CD18 à la surface des PN** (Zarkesh-Esfahani, 2004). Différents arguments ont permis de montrer que cet effet activateur de la leptine était indirect, médié en grande partie par le TNF α sécrété par les monocytes. En effet, dans des conditions de sang total, une incubation de 90 minutes en présence de leptine conduit à une augmentation de l'expression de CD11b à la surface des PN, de façon dose dépendante, cette expression ayant été mesurée par cytométrie en flux. Cet effet activateur n'était pas retrouvé sur PN isolés, pouvant suggérer un effet indirect de la leptine. Par ailleurs, l'effet modulateur observé dans les conditions de sang total était en partie neutralisé par un récepteur soluble du TNF α . Enfin, l'addition de monocytes purifiés à des PN isolés permettait de restaurer l'effet de la leptine sur l'expression de CD11b, indiquant que la leptine pouvait influencer l'état d'activation des PN du sang périphérique via sa capacité à induire la sécrétion de TNF α par les monocytes.

D'autres auteurs ont confirmé l'absence d'effet direct de la leptine sur l'expression de la molécule CD11b à la surface des PN, ces études ayant été réalisées sur PN isolés (Ottonello, 2004).

IV.1.2. Chimiotactisme

La leptine exerce un **effet chimio-attractant vis à vis des PN**. En effet, par une mesure du chimiotactisme en gel d'agarose, la leptine, après 90 minutes d'incubation à 37°C sous 5% de CO₂, augmente la migration des PN. L'effet chimio-attractant de la leptine est comparable à celui du fMLP, agent connu pour ses propriétés chimio-attractantes, la leptine reproduisant

environ 90% de l'effet du fMLP (Caldefie-Chezet, 2003). Des résultats similaires ont été obtenus par utilisation de chambres de migration, la leptine présentant, après 45 minutes d'incubation à 37°C, un effet chimio-attractant vis à vis des PN, néanmoins inférieur à celui du fMLP (Ottonello, 2004).

De plus, certains auteurs ont rapporté un **effet potentialisateur de la leptine sur le chimiotactisme des PN induit par le fMLP**. Ainsi, la pré-incubation de PN pendant 180 minutes en présence de leptine conduit à une augmentation du chimiotactisme vis à vis du fMLP (Caldefie-Chezet, 2003).

A l'inverse, d'autres auteurs rapportent un **effet inhibiteur de la leptine sur la migration des PN en réponse à différents chimio-attractants**, tels que le fMLP, le C5a ou l'IL-8. En effet, la présence de leptine dans le compartiment supérieur d'une chambre de migration inhibe, de façon dose dépendante, la migration des PN en réponse à différents chimio-attractants situés dans le compartiment inférieur. La leptine se comporterait donc comme une chimiokine, capable de stimuler la migration des PN et de désensibiliser les cellules à la stimulation par d'autres chimio-attractants (Ottonello, 2004). Cette même étude a par ailleurs montré que le sérum de patients atteints d'insuffisance rénale chronique, qui présentent des taux sériques élevés de leptine, inhibait la migration de PN normaux en réponse au fMLP, observant une corrélation inverse entre les taux sériques de leptine et la migration des PN. De plus, l'activité inhibitrice de ces sérums sur la migration des PN était prévenue après immuno-déplétion de la leptine. L'activité inhibitrice exercée par le sérum de patients atteints d'insuffisance rénale chronique sur le chimiotactisme des PN serait donc médiée par la leptine et pourrait contribuer à la susceptibilité élevée aux infections observée chez ces patients (Ottonello, 2004).

IV.1.3. Phagocytose

Alors que de nombreux auteurs s'accordent à décrire l'effet potentialisateur de la leptine sur la phagocytose des macrophages, peu de données ont été rapportées en ce qui concerne l'effet sur la phagocytose des PN.

Ainsi, Moore et al ont suggéré que la **leptine augmentait la phagocytose des PN**. En effet, les PN de souris ob/ob, déficientes en leptine, ont une capacité altérée à phagocyter des bactéries *Klebsiella pneumoniae* opsonisées (Moore, 2003). Après 30 minutes d'incubation des PN en présence de bactéries opsonisées, élimination par lavage des bactéries extracellulaires puis coloration, la phagocytose des PN a été évaluée par détermination au microscope du nombre de bactéries internalisées pour 100 cellules : la phagocytose des PN de souris

déficientes en leptine était ainsi environ 40% inférieure à celle des PN de souris sauvages. Par ailleurs, la phagocytose par les PN de souris déficientes en leptine de *Klebsiella pneumoniae* était restaurée par l'administration de leptine exogène, à la fois *in vivo* (injection intrapéritonéale de leptine recombinante aux souris ob/ob) et *in vitro* (culture des PN de ces souris en présence de leptine).

IV.1.4. Explosion oxydative

La leptine exerce un **effet direct sur l'explosion oxydative des PN**. En effet, la stimulation de PN humains par la leptine conduit à une augmentation de la production de FRO. Cet effet activateur de la leptine a été observé après 3 heures d'incubation des PN isolés en présence de leptine, l'explosion oxydative ayant été étudiée par la technique de chimioluminescence (Caldefie-Chezet, 2001). Ces mêmes auteurs ont obtenu des résultats similaires en utilisant la technique d'oxydation de la dichlorofluoresceine en cytométrie en flux (Caldefie-Chezet, 2003). En outre, ils ont montré, par cette technique, que la leptine ne modifiait pas la production de FRO par des PN stimulés par le PMA (Caldefie-Chezet, 2003).

IV.1.5. Apoptose

Une étude récente rapporte un **effet anti-apoptotique de la leptine sur les PN**, cet effet anti-apoptotique de la leptine ayant été observé sur PN isolés. En effet, en mesurant la mort cellulaire par captation du bromure d'éthidium en cytométrie en flux, la leptine, après 24 heures d'incubation, inhibe la mort des PN de façon dose dépendante. Cet effet de la leptine sur la mort cellulaire était lié à l'inhibition de l'apoptose, la leptine diminuant la redistribution de la phosphatidylsérine, caractéristique des cellules apoptotiques, et diminuant la fragmentation de l'ADN. L'analyse des événements intracellulaires a révélé que la leptine activait les voies de signalisation PI3K et MAPK, conduisant à une inhibition de la voie mitochondriale de l'apoptose (Bruno, 2005).

IV. 2. Effets du VIP et du PACAP sur les fonctions des PN

IV.2.1. Expression des molécules d'adhérence

Certains auteurs ont montré par cytométrie en flux l'**absence d'effet du VIP sur l'expression, à la surface de PN isolés, du CD11b**, présent dans les granulations spécifiques. (Kinhult, 2002). Parallèlement, cette étude n'a montré aucune modification de l'expression des molécules CD63 et CD66b, présentes respectivement dans les granulations azurophiles et spécifiques.

A l'inverse, l'expression de ces molécules –CD11b, CD63, CD66b- est augmentée à la surface des PN sous l'effet du PACAP, après 20 minutes d'incubation (Kinhult, 2002). D'autres auteurs ont confirmé cet effet du PACAP : l'effet du PACAP sur l'expression du CD11b à la surface des PN a été observé à la fois sur PN isolés et purifiés, étant maximal après 60 minutes d'incubation, et dans des conditions de sang total (Harfi, 2004). Ces observations indiquent que le PACAP pourrait activer les PN, par une voie non partagée par le VIP : des travaux récents ont en effet mis en évidence que l'augmentation de l'expression de CD11b à la surface des PN induite par le PACAP faisait intervenir le récepteur Formyl Peptide Receptor-Like 1 (FPRL1), très récemment identifié comme un récepteur spécifique de PACAP 27 (Kim, 2006).

IV.2.2. Chimiotactisme

Des premiers travaux ont rapporté **l'absence d'effet direct du VIP sur le chimiotactisme des PN**, le chimiotactisme ayant été mesuré à l'aide de chambres de migration, après 3 heures d'incubation. En outre, un prétraitement des PN par le VIP n'exerçait pas d'effet inhibiteur sur la migration des PN induite par un agent chimio-attractant tel que le fMLP, le LTB4 ou le PAF (Carolan, 1993). D'autres auteurs ont par ailleurs mis en évidence un effet variable du VIP sur la migration des PN selon la concentration de VIP utilisée : effet inhibiteur pour des concentrations de 10^{-6} à 10^{-9} M, effet stimulant pour des concentrations plus faibles (10^{-13} - 10^{-14} M) (Bondesson, 1991).

D'autres études, réalisées ultérieurement, ont conduit à des résultats opposés. Ainsi, un **effet inhibiteur du VIP et du PACAP 38 sur le chimiotactisme des PN induit par le fMLP** a pu être montré par utilisation de chambre de migration, le VIP et le PACAP ayant été ajoutés à la suspension de PN dans le compartiment supérieur de la chambre et le chimiotactisme ayant été mesuré après 20 minutes d'incubation. De plus, par cette même technique, le VIP et le PACAP 38 exercent un effet inhibiteur sur la migration spontanée des PN (Kinhult, 2001). Par ailleurs, cet effet inhibiteur du VIP sur le chimiotactisme des PN a été retrouvé *in vivo*. En effet, l'administration locale ou systémique d'un analogue du VIP chez le rat inhibe le recrutement des PN induit par l'IL-1 β dans les voies aériennes *in vivo*, un nombre plus faible de PN dans le LBA étant observé par rapport aux animaux non traités (Sergejeva, 2004).

A l'inverse, une étude récente a montré, par étude du chimiotactisme en chambre de migration, que le PACAP 27, après 2 heures d'incubation, stimulait le chimiotactisme des PN, cet effet activateur étant médié par le récepteur FPRL1 (Kim, 2006)

IV.2.3. Explosion oxydative

Certains auteurs ont rapporté **un effet de « priming » exercé par le VIP sur l'explosion oxydative des PN en réponse au PMA et au fMLP**. En effet, la pré-incubation de PN pendant 2 minutes en présence de VIP, suivie de la stimulation par le PMA ou le fMLP, conduisait à une augmentation de la production de FRO (mesurée par chimioluminescence et réduction du cytochrome C). Par ailleurs, le VIP n'exerçait **pas d'effet direct sur l'explosion oxydative des PN** (Pedrera, 1994 ; Lopez-Gonzalez, 1994). D'autres auteurs ont au contraire montré **un effet inhibiteur du VIP sur la production d'anion superoxide par les PN stimulés par le fMLP**, cette production ayant été mesurée par chimioluminescence en utilisant comme sonde le MCLA (2-méthyl-6-[p-méthoxyphényl]-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one) (Kurosawa, 1993).

Le PACAP ne possède pas d'effet direct sur l'explosion oxydative des PN mais exerce un effet de priming sur l'explosion oxydative des PN en réponse au fMLP : en effet, le prétraitement des PN par le PACAP pendant 5 minutes augmente la chimioluminescence de PN stimulés par le fMLP. Le PACAP est par ailleurs capable de mobiliser les différents types de granules présents dans le PN : il augmente en effet le relargage de lactoferrine (contenue dans les granules spécifiques), de Metalloproteinase 9 (contenue dans les granules gélatinase), et exerce un effet de priming sur le relargage d'élastase (contenue dans les granules azurophiles) en réponse au fMLP : le PACAP agirait donc comme une molécule pro-inflammatoire sur les PN (Harfi, 2004, 2005).

IV.2.4. Apoptose

Peu d'études se sont intéressées aux effets du VIP sur l'apoptose des PN. L'une de ces études, analysant l'apoptose par mesure de la liaison de l'annexine V en cytométrie en flux et par étude de la caspase 3 ont conclu à l'absence d'effet du VIP sur l'apoptose des PN (Djanani, 2002).

En conclusion et d'une façon générale, il semble que la leptine et le PACAP exercent des effets proinflammatoires sur le PN alors que le VIP n'exerce aucune action. Toutefois,

certaines résultats rapportés dans la littérature sont contradictoires. Ceci pourrait être lié au fait que la majorité de ces travaux ont été réalisés à partir de PN isolés de leur environnement circulant par différentes techniques, susceptibles d'activer les PN, modifiant de ce fait les réponses cellulaires ultérieures.

MATERIELS ET METHODES

I. Echantillons sanguins

Les échantillons de sang périphérique ont été prélevés sur héparinate de lithium chez des sujets volontaires sains, n'ayant pas reçu de traitement antibiotique ou anti-inflammatoire dans les quinze jours précédant le prélèvement, ceux-ci étant susceptibles de moduler les fonctions des PN. Les échantillons ont été placés immédiatement dans la glace.

II. Isolement et purification des polynucléaires neutrophiles

II.1. Isolement des polynucléaires neutrophiles

Les leucocytes ont été isolés par sédimentation simple sur dextran à 2% dans du NaCl isotonique. Après avoir été mélangé à un volume égal de dextran, le sang est mis à sédimenter pendant 20 à 40 minutes à température ambiante, temps correspondant à la vitesse moyenne de sédimentation des globules rouges.

Le surnageant riche en leucocytes est ensuite prélevé, déposé délicatement sur un coussin de Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences) de volume égal au tiers du sien et centrifugé pendant 25 minutes à 1800 tours par minute (TPM) à température ambiante. Après retrait du plasma et du ficoll, le culot de PN et de globules rouges est remis en suspension. Les hématies sont alors lysées par addition d'eau distillée pendant 20 secondes, l'isotonie étant restaurée par addition de NaCl à 18g/l. Après lavage en tampon phosphate (PBS) stérile, les PN sont centrifugés, remis en suspension dans 1 ml de PBS puis comptés au Sysmex XE (société Roche®). La suspension de PN est alors ajustée à 10^7 PN/ml dans du PBS et conservée à 4°C.

II.2. Purification des polynucléaires neutrophiles

Cette purification est effectuée par sélection négative à l'aide de billes magnétiques conjuguées à un anticorps monoclonal murin anti-HLA-DR (Miltenyi Biotec®), afin d'éliminer les cellules résiduelles exprimant HLA-DR, à savoir les lymphocytes B, les lymphocytes T activés et les monocytes.

Les PN, remis en suspension dans du tampon PBS contenant 0,5% d'albumine humaine (HSA), sont incubés pendant 15 minutes à 4°C avec les microbilles anti-HLA-DR. Après lavage en PBS-HSA 0,5% et centrifugation 10 minutes à 1200 TPM, les cellules (jusqu'à 10^8) sont remises en suspension dans 500µl de tampon. La séparation magnétique des cellules HLA-DR+ et des cellules HLA-DR- est alors effectuée en appliquant la suspension cellulaire

sur une colonne MACS®, placée sur un aimant, puis en rinçant la colonne par le tampon. Les cellules HLA-DR+ sont retenues sur la colonne alors que les cellules non marquées sont recueillies dans un tube stérile. Cette fraction cellulaire, déplétée en cellules HLA-DR+, comprend moins de 0,5% de monocytes et plus de 99% de PN, comme ceci a été vérifié par cytométrie en flux. La suspension de PN est alors ajustée à 10^6 PN/ml puis conservée dans la glace.

III. Exploration fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles

III.1. Traitement des échantillons

Certains échantillons (sang total ou PN isolés à 10^6 /ml) ont été conservés à 4°C afin d'évaluer l'état basal des PN ; d'autres ont été incubés à 37°C sous agitation horizontale en présence de PBS (contrôle), ou en présence de leptine ou de VIP selon les conditions suivantes:

Condition A : 15 à 120 minutes en présence de leptine (Tebu-bio, concentration finale : 5 à 10000 ng/ml) ou de VIP (Neosystem, concentration finale : 10^{-11} à $5 \cdot 10^{-6}$ M) (étude de l'effet direct).

Condition B : 15 à 120 minutes en présence de leptine (5 à 10000 ng/ml) ou de VIP (10^{-11} à $5 \cdot 10^{-6}$ M) puis 5 minutes en présence de fMLP (Sigma, 10^{-6} M) (étude de l'effet de priming).

Condition C : 15 minutes en présence de VIP (10^{-11} à $5 \cdot 10^{-6}$ M) puis 45 minutes en présence de TNF α (R&D Systems, 5 ng/ml) (étude de l'effet modulateur sur l'action du TNF α).

Condition D : 15 minutes en présence de VIP (10^{-11} à $5 \cdot 10^{-6}$ M), puis 30 minutes en présence de TNF α (5ng/ml), puis 5 minutes en présence de fMLP (10^{-6} M) (étude de l'effet modulateur sur l'action du TNF α).

Condition E : 15 minutes en présence d'anticorps neutralisants anti-IL-8 (R&D Systems, 5 μ g/ml) ou anti-TNF α (Becton-Dickinson, 10 μ g/ml) puis incubation pendant 45 minutes en présence de leptine (10000 ng/ml) (étude de l'implication de l'IL-8 ou du TNF α dans l'effet de la leptine)

III.2. Etude de l'expression de la L-sélectine et du CD11b à la surface des PN

III.2.1. Principe

L'utilisation d'anticorps monoclonaux, dirigés contre CD62L et CD11b et couplés à différents fluorochromes, permet d'étudier par cytométrie en flux l'expression de ces molécules à la surface des PN.

III.2.2. Technique

Les échantillons ont été conservés à 4°C ou incubés en présence de PBS, de leptine ou de VIP, selon les conditions A, en présence de VIP puis de TNF, selon les conditions C ou en présence d'anticorps neutralisants anti-IL-8 ou anti- TNF α puis de leptine selon les conditions E. Enfin, un contrôle positif a été effectué en présence de TNF α (5 ng/ml), dont l'effet modulateur sur l'expression des molécules d'adhérence à la surface des PN a précédemment été rapporté (Elbim, 1995).

Puis, 100 μ l de chaque échantillon sont incubés pendant 30 minutes, à 4°C et à l'obscurité en présence des anticorps monoclonaux dirigés contre les molécules d'adhérence étudiées :

- Anticorps monoclonal murin anti-CD62L humain, purifié, non marqué (Becton Dickinson), révélé par incubation pendant 30 minutes à 4°C avec un anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de souris, conjugué à la fluorescéine (GAM/FITC, Nordic Immunology). Un nouveau lavage en présence de PBS est alors effectué.
- Anticorps monoclonal murin anti-CD11b humain, conjugué à la phycoérythrine (Dako)

Des tubes contrôles ont été effectués en présence d'isotypes contrôles afin d'évaluer la fixation non spécifique des anticorps.

Après incubation en présence des différents anticorps, les échantillons de PN isolés, après un lavage en présence de PBS-HSA 0,5%, sont remis en suspension dans 500 μ l de formaldéhyde et conservés avant analyse à 4°C. Les échantillons de sang total sont quant à eux préparés pour la lecture au cytomètre. (cf paragraphe III.4)

III.3. *Etude de l'explosion oxydative des PN*

III.3.1. Principe

L'explosion oxydative des PN a été mesurée, dans le sang total, par cytométrie en flux par la technique d'oxydation de l'hydroéthidine (Rothe, 1990). La dihydroéthidine (DHE) est un composé non fluorescent qui diffuse rapidement à l'intérieur des cellules. En présence d'anion superoxyde O $_2^{\circ-}$, métabolite primaire produit par la NADPH oxydase activée, la DHE est oxydée en éthidium (E $^+$), composé hautement fluorescent, qui émet à 580 nm (fluorescence orange) après excitation à 488 nm. L'éthidium est séquestré dans le noyau par intercalation dans l'ADN, conduisant à une augmentation de la fluorescence, reliée linéairement à l'intensité de la production des FRO.

Des expériences préliminaires ont montré que dans des conditions de sang total, un stimulus isolé (cytokine ou formyl peptide) n'avait pas d'effet direct sur la production de FRO. Il est nécessaire d'amorcer ou « primer » les PN en présence d'un premier agoniste, tel que le TNF α , afin de déclencher une réponse ultérieure aux formyl peptides (Elbim, 1994) .

III.3.2. Technique

Les échantillons de sang total (500 µl) ont été incubés en présence 5 µl de DHE (Fluka, concentration finale : 1500 ng/ml) pendant 15 minutes à 37°C sous agitation horizontale. Après charge par la DHE, les échantillons ont été incubés en présence des différents agonistes selon les conditions A (effet direct de la leptine ou du VIP) ou les conditions B (effet d'amorçage de la leptine ou du VIP sur la réponse induite par le fMLP).

D'autre part, afin d'étudier l'effet du traitement par le VIP sur l'amorçage de l'explosion oxydative par le TNF α en réponse au fMLP, les échantillons ont été incubés en présence de VIP puis traités par le TNF, avant d'être stimulés par le fMLP, selon les conditions D.

III.4. Préparation des échantillons de sang total avant lecture au cytomètre de flux

Une lyse des érythrocytes est effectuée par addition de solution de lyse (FACS lysing solution, Becton Dickinson). Après centrifugation 5 minutes à 1500 TPM à température ambiante puis retrait du surnageant, les leucocytes sont remis en suspension dans une solution de formaldéhyde à 1% dans de l'isoton. Les échantillons sont alors conservés à 4°C jusqu'à leur analyse, effectuée le plus rapidement possible.

IV. Etude de l'apoptose des PN

IV.1. Marquage par l'annexine V et la 7 Amino Actinomycine D

IV.1.1. Principe

Un des évènements clés de l'apoptose précoce consiste en la translocation de la phosphatidylsérine depuis la face interne de la membrane plasmique vers sa surface externe. Ce phénomène peut être détecté à l'aide d'annexine V, protéine ayant la propriété biologique de se lier, de façon calcium-dépendante, aux phospholipides. Elle présente en effet une forte affinité pour les phospholipides chargés négativement, tels que la phosphatidylsérine, et peut être conjuguée à différents fluorochromes, sans modification de ses propriétés de liaison aux phospholipides.

Ce phénomène de translocation survient précocement au cours de l'apoptose, alors que la membrane cellulaire est encore intacte, permettant ainsi l'exclusion de colorants vitaux. La nécrose et l'apoptose tardive sont au contraire caractérisées par une perte de l'intégrité membranaire. Ainsi, un double marquage avec de l'annexine V et un colorant vital, la 7-Amino Actinomycine D (7AAD), permet de détecter les cellules apoptotiques et de discriminer l'apoptose de la nécrose. Quatre populations cellulaires peuvent ainsi être distinguées : les cellules vivantes (annexine V⁻, 7AAD⁻), les cellules en apoptose précoce (annexine V⁺, 7AAD⁻), les cellules en apoptose tardive ou en nécrose (annexine V⁺, 7AAD⁺)

et les cellules en nécrose (annexine V⁻, 7AAD⁺) (Homburg, 1995 ;Vermes, 1995 ; Steensma, 2003 ; François, 2005).

IV.1.2. Technique

1ml d'échantillon (sang total ou de suspension de PN à 10⁶/ml) a été incubé dans des plaques de culture de 24 puits à 37°C sous 5% de CO₂ selon les conditions suivantes :

Condition A : 1 à 24 heures en présence de PBS, de leptine (5-10000 ng/ml), de VIP (10⁻¹¹-5.10⁻⁶ M) ou de GM-CSF (R&D Systems, 1000 pg/ml), ce dernier étant utilisé comme contrôle antiapoptotique (étude de l'effet direct).

Condition B : 6 heures en présence de leptine et d'anticorps neutralisants anti-GM-CSF (R&D Systems, 20µg/ml), anti-IL-8 (5µg/ml) ou anti-TNFα (10µg/ml) (étude de l'implication du GM-CSF, de l'IL-8 et du TNFα dans l'effet de la leptine).

Condition C : 5 minutes en présence de PMA (0,5 ng/ml) ou de PBS, puis 6 heures en présence de PBS ou de VIP (10⁻⁹ à 5.10⁻⁶ M) (étude de l'influence d'une étape préalable d'activation des PN sur l'effet du VIP sur l'apoptose de ces cellules).

Après incubation, 100µl de chaque échantillon ont été lavés en PBS, incubés dans la glace pendant 15 minutes avec un anticorps monoclonal anti-CD15 conjugué au FITC (Becton Dickinson), permettant de définir la fenêtre des granulocytes, puis pendant 15 minutes supplémentaires avec de l'annexine V marquée à l'allophycocyanine (Becton Dickinson). Les échantillons sont alors dilués dans 500µl de PBS puis incubés pendant 15 minutes à température ambiante avec la 7-AAD (Becton Dickinson). Les échantillons sont alors analysés immédiatement par cytométrie de flux (François, 2005) .

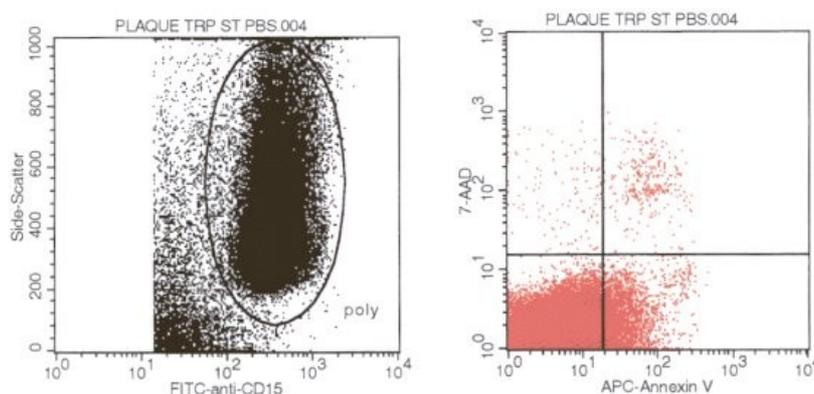


Figure V. Etude de l'apoptose des PN en cytométrie en flux : Marquage par l'annexine V et la 7 Amino Actinomycine D

Après définition de la fenêtre des granulocytes grâce à un anticorps anti-CD15, l'utilisation d'annexine V et de 7-AAD permet de distinguer les cellules vivantes (annexine V⁻, 7AAD⁻), les cellules en apoptose précoce (annexine V⁺, 7AAD⁻), les cellules en apoptose tardive ou en nécrose (annexine V⁺, 7AAD⁺) et les cellules en nécrose (annexine V⁻, 7AAD⁺).

IV.2. Etude du potentiel transmembranaire mitochondrial

IV.2.1. Principe

La voie apoptotique mitochondriale a été étudiée à l'aide de DiOC6, une réduction de son incorporation (cellules DiOC6^{low}) correspondant à une perte du potentiel transmembranaire mitochondrial, observée lors du processus apoptotique (Shapiro, 2000).

IV.2.2. Technique

Après incubation du sang ou des PN isolés (10⁶/ml) avec le PBS ou les différents agonistes étudiés, 100µl de chaque échantillon sont mis en présence de DiOC6 (Interchim, concentration : 1µM) pendant 15 minutes à 37°C puis marqués avec un anticorps anti-CD15 conjugué à l'allophycocyanine (APC, Becton Dickinson) pendant 30 minutes à 4°C. Après avoir été remis en suspension dans du PBS, les échantillons sont analysés immédiatement par cytométrie en flux.

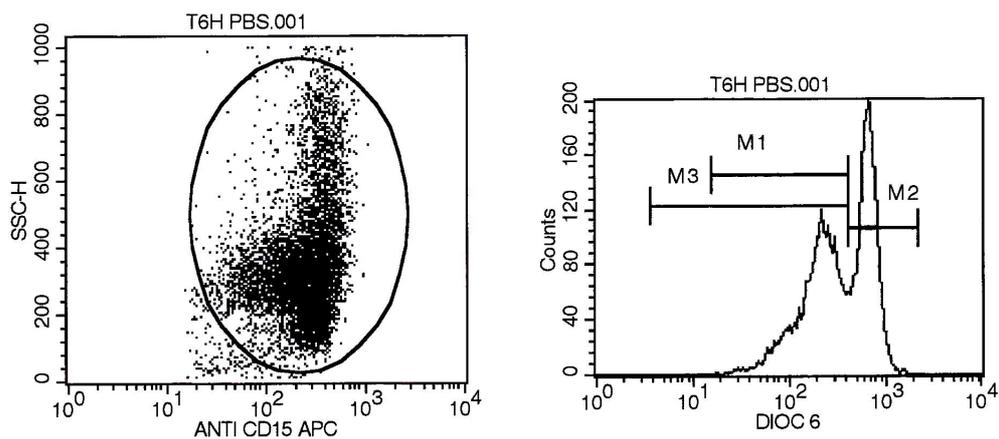


Figure VI. Etude du potentiel transmembranaire mitochondrial à l'aide de DiOC6

Une perte du potentiel transmembranaire mitochondrial est associée à une réduction de l'incorporation de DiOC6 : cellules DiOC6^{low} (population M1)

IV.3. Etude de l'expression intracellulaire des molécules de la famille Bcl-2

IV.3.1. Principe

Le marquage à l'aide d'anticorps monoclonaux, dirigés contre les molécules de la famille Bcl-2, a été effectué après perméabilisation membranaire et étude par cytométrie en flux (François, 2005).

IV.3.2. Technique

Les échantillons (sang total ou PN isolés à 10^6 /ml) ont été traités par le PBS, le GM-CSF (1000 pg/ml) ou le VIP ($5 \cdot 10^{-6}$ M), pendant 5 à 240 minutes à 37°C sous agitation horizontale. Après lyse des hématies dans le cas des échantillons sanguins, les leucocytes ont été fixés par du formaldéhyde à 2% pendant 10 min à 37°C , puis traités par du méthanol à 90% pendant 30 minutes à 4°C , afin de perméabiliser les membranes. Les échantillons ont été par la suite incubés pendant une heure à température ambiante avec les anticorps non marqués anti-Bax (Immunotech), anti-Phospho-Bad (Cell Signaling), anti-A1 et anti-Mcl-1 (Santa Cruz Biotechnology), puis lavés en présence de PBS/HSA à 1%. Les échantillons ont été alors traités par un anticorps de chèvre anti Immunoglobuline de souris (Nordic Immunology) ou de lapin (Becton Dickinson) conjugué à la FITC pendant 30 min. L'expression de Bad a été quant à elle étudiée par marquage avec un anticorps anti-Bad conjugué à la FITC (Becton Dickinson). Après lavage, les leucocytes ont été remis en suspension en présence de formaldéhyde et analysés par cytométrie en flux.

V. Production et dosage de cytokines par la technique BD[®] « Cytometric Bead Array »

Les échantillons de sang total, dilués au $1/5^{\text{ème}}$ en RPMI 1640, ont été incubés à 37°C , sous 5% de CO_2 , en présence de PBS, de LPS (10 ng/ml), de leptine (10000 ng/ml) ou de VIP ($5 \cdot 10^{-6}$ M) pendant des temps variables (1, 4 ou 18h). Après centrifugation, le surnageant a été prélevé et congelé à -80°C .

Le taux de cytokines a par la suite été mesuré dans le surnageant par cytométrie en flux par la technique BD[®] Cytometric Bead Array. Cette technique utilise six populations de billes, caractérisées par des intensités de fluorescence distinctes et recouvertes par des anticorps de capture spécifiques de l'IL-8, l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-10, le TNF α et l'IL-12p70. Ces billes de capture sont incubées avec les échantillons et des anticorps de détection conjugués à la Phycoérythrine (PE) et dirigés contre les cytokines dosées. L'intensité de fluorescence FL3, correspondant à l'intensité de fluorescence des billes, permet d'identifier la ou les cytokines présentes, tandis que l'intensité de fluorescence FL2 (PE) est proportionnelle au taux de cytokines. Des courbes de calibration sont établies à partir des standards et permettent de déterminer la concentration des cytokines présentes dans les échantillons testés. Les résultats sont exprimés en pg/ml de surnageant.

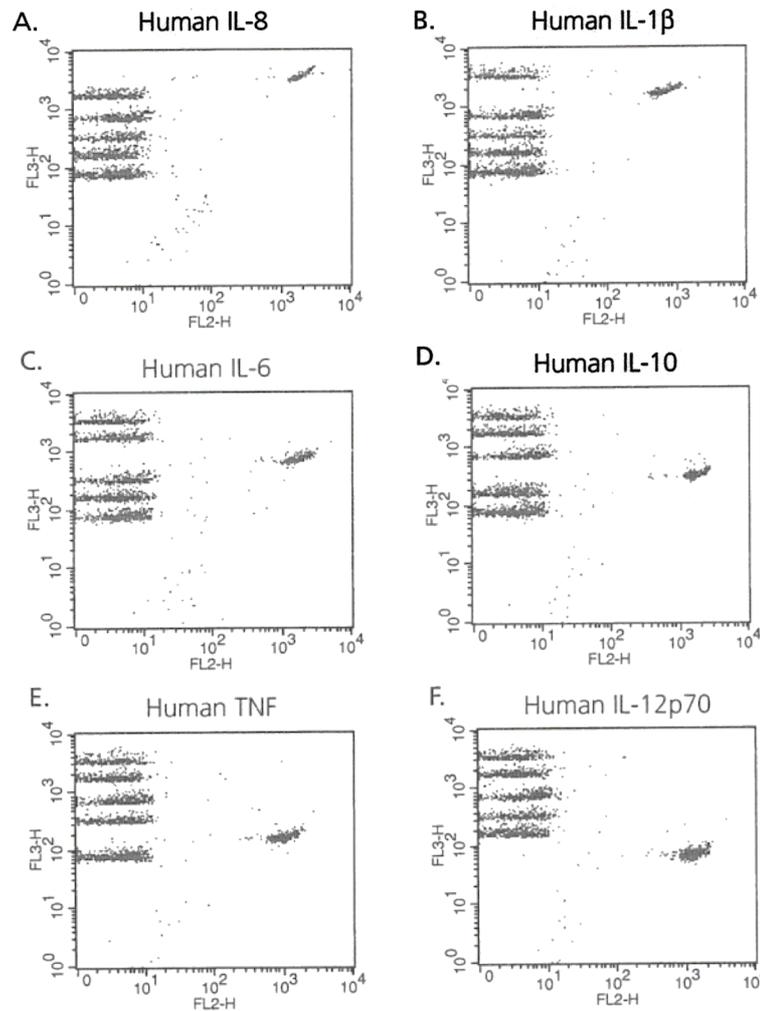


Figure VII. Dosage de cytokines par la technique BD® « Cytometric Bead Array »

La ou les cytokines présentes sont identifiées grâce à l'intensité de fluorescence FL3, correspondant à l'intensité de fluorescence des billes. L'intensité de fluorescence FL2 est proportionnelle au taux de cytokines.

VI. Analyse par cytométrie en flux

VI.1. Appareil

Le cytomètre en flux utilisé est un « FACScalibur », commercialisé par la société Becton Dickinson, comprenant deux sources d'excitation : un laser argon, caractérisé par une longueur d'onde d'excitation de 488nm et d'une puissance de 15mW, et une diode laser, de longueur d'onde d'excitation de 635nm. La suspension cellulaire analysée est aspirée avec une vitesse de passage de 60μL par minute. Pour chaque cellule, six paramètres peuvent être analysés à l'aide du logiciel « Cell-Quest » :

- La lumière diffusée sous un angle faible, inférieur à 10° (Forward Scatter ou FSC), corrélée à la taille de la cellule,
- La lumière diffusée sous un grand angle (Side Scatter ou SSC), corrélée au contenu intracytoplasmique de la cellule et permettant d'évaluer la granularité cellulaire,

- Les intensités de fluorescence FL1, FL2, FL3, FL4, caractérisées par une longueur d'onde d'émission maximale respectivement de 530 ± 15 nm (FITC), 585 ± 25 nm (PE), 675 ± 25 nm (7-AAD) et 670 nm après excitation à 650 nm par la diode laser (APC).

VI.2. Acquisition des données

Les acquisitions, d'une part des signaux de taille et de granularité, d'autre part des signaux de fluorescence, se font respectivement par amplification sur le mode linéaire et logarithmique. Les réglages des photomultiplicateurs ont été effectués de façon à obtenir une localisation centrale des PN dans un graphe représentant la granularité en fonction de la taille et un pic d'autofluorescence des cellules inférieur à 10^{-1} sur l'échelle logarithmique des intensités de fluorescence. Des réglages identiques ont été utilisés pour chaque type d'expérimentation afin de permettre la comparaison statistique des résultats entre eux.

En ce qui concerne l'étude fonctionnelle des PN, les paramètres de taille et de granularité ont été utilisés afin d'identifier la population granulocytaire et d'éliminer de l'analyse les autres cellules et débris. Cinq mille évènements ont été acquis par échantillon. Concernant l'étude de l'apoptose, les PN ont été identifiés grâce au marqueur CD15 et 2×10^5 évènements ont été comptés par échantillon.

VI.3. Analyse des données

Les résultats ont été obtenus :

- soit sous forme d'histogramme à échelle logarithmique monoparamétrique représentant l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cellules analysées. Un marqueur placé de part et d'autre du pic de fluorescence a permis d'exprimer les résultats en moyenne d'intensité de fluorescence (MFI).
- soit sous forme de cytogramme, divisé en quatre quadrants, avec détermination des pourcentages des populations positivement et/ou négativement marquées.

VII. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (SEM). Les comparaisons ont été effectuées à l'aide d'une analyse ANOVA et du test post hoc Tukey, en utilisant le logiciel Prism 4.0.

RESULTATS

I.Effet de la leptine et du VIP sur l'expression des molécules d'adhérence à la surface des PN

I.1 Modulation par la leptine de l'expression de la L-sélectine et du CD11b à la surface des PN dans le sang total

- ✓ Les échantillons de sang total ont été incubés pendant 45 minutes à 37°C, en présence de leptine à concentrations croissantes, avant marquage à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-CD62L et anti-CD11b.

	CD62L (MFI)	CD11b (MFI)
4°C (état basal)	91 ± 11	77 ± 8
PBS	73 ± 7	367 ± 53
Leptine (ng/ml)		
5	80 ± 13	445 ± 56
50	68 ± 11	508 ± 64
100	62 ± 9	458 ± 62
500	58 ± 7	495 ± 62
1000	53 ± 7	474 ± 72
5000	24 ± 5*	793 ± 46*
10000	15 ± 2 *	1058 ± 85*
TNFα (5 ng/ml)	6 ± 2 *	1570 ± 29*

Tableau I : Effet de la leptine à différentes concentrations sur l'expression de CD62L et du CD11b à la surface des PN dans le sang total.

Les valeurs sont exprimées en moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) et les résultats en moyenne ± SEM (n=4).

** : significativement différent par rapport à l'échantillon traité par le PBS (p<0.05).*

Nous observons que la leptine, à fortes concentrations (5000 et 10 000 ng/ml), diminue l'expression de la L-sélectine (CD62L) et augmente l'expression du CD11b à la surface des PN. Ce résultat témoigne de **l'effet activateur exercé par la leptine sur les PN**, ceci de façon identique au TNF, conduisant d'une part au clivage enzymatique de la L-sélectine et d'autre part à la translocation de stocks intracellulaires à la membrane cellulaire. L'effet exercé par le TNFα sur l'expression de CD11b est significativement supérieur à celui exercé par la leptine (p<0,05).

- ✓ Par ailleurs, une étude cinétique a été réalisée afin de déterminer la durée d'incubation pour laquelle la leptine exerçait un effet modulateur maximal. L'expression de la L-sélectine et du CD11b a donc été étudiée après des temps d'incubation variables (15 à 120 minutes) en présence de leptine, utilisée à une concentration de 10 000 ng/ml, la leptine présentant un effet maximal sur l'expression des molécules d'adhérence à cette concentration.

CD62L (MFI)						
Temps (min)	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min
PBS	96 ± 7	72 ± 10	62 ± 5	78 ± 10	55 ± 5	65 ± 3
Leptine	86 ± 9	71 ± 6	21 ± 9*	15 ± 4*	11 ± 3*	12 ± 1*

CD11b (MFI)						
Temps (min)	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min
PBS	291 ± 37	437 ± 75	468 ± 141	449 ± 124	551 ± 70	497 ± 47
Leptine	424 ± 66	619 ± 17	1053 ± 63*	1158 ± 24*	1175 ± 12*	1135 ± 39*

Tableau II : Effet de la leptine (10 000 ng/ml) sur l'expression de CD62L et du CD11b à la surface des PN dans le sang total en fonction du temps d'incubation.

Les valeurs sont exprimées en moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) et les résultats en moyenne ± SEM (n= 3).

** : significativement différent par rapport aux échantillons traités par le PBS (p<0.05).*

Nous avons ainsi constaté que l'effet modulateur de la leptine sur l'expression de la L-sélectine (CD62L) et de la β2 intégrine CD11b/CD18 à la surface des PN était significatif à partir de 45 minutes d'incubation et n'était pas modifié au cours d'incubations plus longues. Pour les expériences suivantes, des temps d'incubation de 45 minutes ont donc été utilisés.

1.2. L'effet exercé par la leptine sur l'expression des molécules d'adhérence est indirect

- ✓ Certains auteurs ayant rapporté l'induction de la synthèse de cytokines pro inflammatoires par la leptine (Loffreda, 1998 ; Santos-Alvarez, 1999 ; Zarkesh-Esfahani, 2001), l'effet modulateur sur les PN que nous observons sur sang total pourrait être en rapport avec la libération de tels médiateurs inflammatoires par les autres cellules sanguines circulantes, notamment les monocytes.

Nous avons donc étudié l'effet de la leptine (5-10000 ng/ml, 45 min) sur l'expression des molécules d'adhérence à partir de PN isolés et purifiés.

	CD62L (MFI)	CD11b (MFI)
4°C (état basal)	125 ± 13	326 ± 52
PBS	119 ± 14	420 ± 10
Leptine (ng/ml)		
50	121 ± 19	417 ± 13
100	120 ± 14	414 ± 16
500	123 ± 16	406 ± 17
1000	126 ± 12	405 ± 16
5000	119 ± 17	411 ± 10
10000	109 ± 11	422 ± 11
TNF (5ng/ml)	10 ± 1 *	1041 ± 55*

Tableau III : Effet de la leptine sur l'expression de CD62L et CD11b à la surface des PN isolés

Les valeurs sont exprimées en moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) et les résultats en moyenne ± SEM (n= 3).

* : significativement différent par rapport à l'échantillon traité par le PBS (p<0.05).

Nous avons ainsi constaté que l'effet modulateur de la leptine sur l'expression de CD62L et CD11b, observé sur sang total, n'était pas retrouvé sur PN isolés, faisant suspecter un effet indirect de la leptine.

- ✓ Afin de confirmer ce résultat, nous avons étudié l'expression de CD62L et du CD11b à la surface des PN **dans des conditions de sang total**, après prétraitement pendant 15 minutes en présence d'anticorps neutralisants anti-IL-8 (5µg/ml) ou anti-TNFα (10µg/ml) puis incubation pendant 45 minutes en présence de leptine (10000 ng/ml).

	CD62L (MFI)		CD11b (MFI)	
	PBS	Ac anti TNF	PBS	Ac anti TNF
PBS	66 ± 11	58 ± 13	847 ± 47	738 ± 89
Leptine (ng/ml)				
1000	29 ± 2	51 ± 3	1021 ± 17	748 ± 37
5000	16 ± 3 *	29 ± 1	1272 ± 40 *	807 ± 49 †
10000	13 ± 2 *	35 ± 4	1332 ± 31 *	970 ± 3 †

Tableau IV : Implication du TNFα dans l'effet modulateur de la leptine sur l'expression de CD62L et CD11b

Les valeurs sont exprimées en moyenne d'intensité de fluorescence(MFI) et les résultats en moyenne ± SEM (n=3).

* : significativement différent par rapport à l'échantillon incubé en présence de PBS.

† : significativement différent par rapport à l'échantillon prétraité en présence de PBS puis incubé en présence de leptine (p<0.05).

Nous avons ainsi constaté que l'effet modulateur de la leptine sur l'expression des molécules d'adhérence n'était pas modifié en cas de prétraitement avec l'anticorps anti-IL-8 (résultats non montrés). Par contre, cet effet était diminué, de façon significative pour l'expression du CD11b, après prétraitement avec l'anticorps anti-TNF. Ces résultats suggèrent que **l'effet exercé par la leptine sur l'expression des molécules d'adhérence puisse être médié par le TNF α** .

I.3. Absence d'effet du VIP sur l'expression des molécules d'adhérence à la surface des PN

- ✓ Afin d'évaluer l'effet du VIP sur l'expression de CD62L et du CD11b, les échantillons de sang total ont été incubés à 37°C pendant 45 minutes en présence de VIP à concentration croissante (10^{-11} à $5 \cdot 10^{-6}$ M).

	CD62L (MFI)	CD11b (MFI)
4°C (état basal)	122 ± 4	102 ± 34
PBS	97 ± 21	558 ± 156
VIP		
10^{-11} M	74 ± 10	703 ± 97
10^{-10} M	71 ± 8	680 ± 116
10^{-9} M	72 ± 12	681 ± 133
10^{-8} M	71 ± 11	681 ± 81
10^{-7} M	78 ± 6	635 ± 87
10^{-6} M	89 ± 21	630 ± 116
$5 \cdot 10^{-6}$ M	78 ± 16	633 ± 74
TNF α (5 ng/ml)	10 ± 2 *	1745 ± 145*

Tableau V : Effet du VIP à différentes concentrations sur l'expression de CD62L et du CD11b à la surface des PN dans le sang total.

Les valeurs sont exprimées en moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) et les résultats en moyenne ± SEM (n=3).

** : significativement différent par rapport à l'échantillon traité par le PBS (p<0.05).*

Aucun effet direct du VIP sur l'expression de CD62L et du CD11b n'a pu être mis en évidence et ce, quelle que soit la concentration de VIP utilisée. De plus, nous n'avons pas observé d'effet modulateur du VIP en modifiant le temps d'incubation (15 à 120 min). Enfin, aucun effet du VIP n'a été observé sur PN isolés (données non montrées).

- ✓ Par ailleurs, le VIP étant rapporté comme ayant des fonctions anti-inflammatoires, nous avons voulu déterminer si le VIP, dépourvu d'effet direct sur l'expression des molécules d'adhérence, modulait l'effet activateur du TNF α sur les PN. Pour ce faire, l'expression de CD62L et du CD11b a été étudiée après prétraitement des

échantillons de sang total par le VIP (10^{-11} à 5.10^{-6} M) puis stimulation par le TNF α (5 ng/ml).

	CD62L (MFI)	CD11b (MFI)
4°C (état basal)	93 ± 10	68 ± 11
PBS	49 ± 7	800 ± 14
VIP		
VIP 10^{-11} M + TNF α	7 ± 1*	1464 ± 109*
VIP 10^{-10} M + TNF α	6 ± 1*	1471 ± 118*
VIP 10^{-9} M + TNF α	6 ± 1*	1505 ± 120*
VIP 10^{-8} M + TNF α	6 ± 1*	1487 ± 122*
VIP 10^{-7} M + TNF α	6 ± 1*	1491 ± 106*
VIP 10^{-6} M + TNF α	6 ± 1*	1501 ± 104*
VIP 5.10^{-6} M + TNF α	6 ± 1*	1450 ± 120*
TNF α (5 ng/ml)	5 ± 1*	1495 ± 124*

Tableau VI : Influence du VIP sur l'effet modulateur du TNF sur l'expression de CD62L et du CD11b à la surface des PN dans le sang total.

Les valeurs sont exprimées en moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) et les résultats en moyenne ± SEM (n=3).

* : significativement différent par rapport à l'échantillon traité par le PBS (p<0.05).

Nous avons ainsi constaté que le VIP, quels que soient la concentration et le temps d'incubation utilisés, **ne modifiait pas l'effet modulateur du TNF sur l'expression des molécules d'adhérence à la surface des PN.**

II. Absence d'effet du VIP et de la leptine sur l'explosion oxydative des PN

- ✓ Après charge en présence de DHE, les échantillons de sang total ont été prétraités en présence de PBS, de leptine (5-10000 ng/ml) ou de VIP (10^{-11} - 5.10^{-6} M) pendant 45 à 120 minutes à 37°C, puis incubés en présence de PBS ou de fMLP (10^{-6} M) pendant 5 min.

Comme le montre le Tableau VII, nous avons constaté que :

- La leptine et le VIP n'exercent aucun effet direct sur la production de FRO par les PN.
- La leptine et le VIP n'exercent aucun effet de « priming » sur la production de FRO par les PN en réponse à la stimulation par le fMLP.

- ✓ Par ailleurs, le prétraitement des échantillons de sang total en présence de VIP ne diminue par l'effet de priming exercé par le TNF α (5 ng/ml, 30 min) sur l'explosion oxydative des PN en réponse au fMLP (10^{-6} M, 5 min) et ce, quelles que soient les concentrations de VIP et les temps d'incubation.

	Contenu en ethidium (MIF)	
	PBS	fMLP
PBS	17 ± 3	46 ± 12
Leptine (10 000 ng/ml)	17 ± 4	49 ± 18
VIP (5.10 ⁻⁶ M)	10 ± 3	12 ± 2
TNFα (5 ng/ml)	20 ± 9	171 ± 29*
VIP + TNFα		159 ± 29*

Tableau VII. Effet de la leptine et du VIP sur l'explosion oxydative des PN

Les valeurs sont exprimées en moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) et les résultats en moyenne ± SEM (n= 7.)

* : significativement différent par rapport à l'échantillon traité par du PBS après charge en DHE et non stimulé par du fMLP (p<0.05).

III. Effet de la leptine et du VIP sur la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires.

Les concentrations de cytokines présentes dans les surnageants de culture cellulaire, obtenus après des temps d'incubation variables (1, 4 et 18h) en présence de LPS (10 ng/ml), de leptine (10000 ng/ml) ou de VIP (5.10⁻⁶ M), ont été mesurées par cytométrie en flux par la technique BD® « Cytometric Bead Array ».

	IL-8	IL-1β	IL-6	IL-10	TNFα	IL-12p70
T0	<20	<20	<20	<20	<20	<20
PBS						
T1h	123	44	<20	<20	<20	<20
T4h	182	29	<20	<20	<20	<20
T18h	302	36	<20	<20	<20	<20
LPS						
T1h	263	377	42	42	108	157
T4h	2908	461	1890	60	668	180
T18h	25028	383	4152	256	217	88
Leptine						
T1h	183	50	<20	<20	84	<20
T4h	4277	98	1614	<20	740	21
T18h	17316	108	2479	112	146	<20
VIP						
T1h	157	22	<20	<20	<20	<20
T4h	57	43	<20	<20	<20	<20
T18h	211	40	<20	<20	<20	<20

Tableau VIII. Effet de la leptine (10000 ng/ml) et du VIP (5.10⁻⁶ M) sur la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires en fonction du temps d'incubation (1h, 4h, 18h).

Les valeurs sont exprimées en pg/ml. (n=1)

Nous observons (Tableau VIII) que :

- Le LPS (contrôle positif) induit la synthèse d'IL-8, d'IL-6, de TNF α , d'IL-1 β , d'IL-12p70 et d'IL-10

- **La leptine induit la synthèse d'IL-8, d'IL-6, de TNF α** et, dans une moindre mesure, la synthèse d'IL-10 et d'IL-1 β . La synthèse de TNF α s'observe à partir d'1 heure d'incubation, pour atteindre un maximum à 4 d'incubation avant de diminuer pour 18 heures d'incubation, une cinétique comparable ayant été obtenue avec le LPS.

- Le VIP n'exerce aucun effet sur la production des cytokines pro- et anti-inflammatoires testées, dans les conditions expérimentales utilisées.

Ces résultats devront être confirmés sur un nombre plus important d'expériences.

IV. Effet différentiel de la leptine et du VIP sur l'apoptose des PN

IV.1. La leptine inhibe l'apoptose des PN dans le sang total

- ✓ Les échantillons de sang total ont été incubés en présence de PBS, de GM-CSF (1000 pg/ml), de TNF α (5ng/ml) ou de leptine (5 à 10000 ng/ml) pendant 6h. L'apoptose des PN a été évaluée par la mesure, par cytométrie en flux, du pourcentage de cellules totales annexine V⁺ et du pourcentage de cellules DiOC6^{low}.

	Cellules annexine V ⁺ (%)	Cellules DiOC6 ^{low} (%)
PBS	12.9 ± 0.9	9.0 ± 1.4
Leptine (ng/ml)		
50	17.0 ± 1.5	
100	16.5 ± 1.6	
500	12.6 ± 2.0	
1000	10.1 ± 0.9	
5000	7.1 ± 0.7	
10000	6.5 ± 0.8 *	5.9 ± 0.5
GM-CSF (1000 pg/ml)	3.2 ± 0.5 *	5.2 ± 1.3
TNF α (5 ng/ml)	6.8 ± 1.4	

Tableau IX. Effet de la leptine à différentes concentrations sur l'apoptose des PN dans le sang total après 6 h d'incubation.

Les valeurs sont exprimées en pourcentage de PN annexine V⁺ et de cellules DiOC6^{low}. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=7 et 3 respectivement).

* : *significativement différent par rapport à l'échantillon incubé en présence de PBS ($p < 0.05$).*

Concernant **l'évaluation du pourcentage de PN annexine V⁺**, le Tableau IX montre que :

- en accord avec les résultats précédemment rapportés dans la littérature sur PN isolés (Colotta, 1992), le GM-CSF diminue l'apoptose des PN dans le sang total (pourcentage d'inhibition : 73%) ;

- le TNF α exerce également un effet inhibiteur sur l'apoptose ;

- **à fortes concentrations (10000 ng/ml), la leptine inhibe de façon significative l'apoptose des PN. Le pourcentage d'inhibition obtenu est de 46%**, non significativement différent de celui observé après incubation en présence de GM-CSF, mais néanmoins inférieur.

Des taux similaires d'inhibition de l'apoptose ont été observés au stade d'apoptose précoce (cellules annexine V⁺/7AAD⁻; données non montrées). Par ailleurs, une étude cinétique a été réalisée afin de déterminer la durée d'incubation pour laquelle la leptine exerçait un effet inhibiteur maximal sur l'apoptose des PN. Cette étude a montré que la leptine n'inhibait pas l'apoptose des PN après 3h d'incubation, mais induisait 44% d'inhibition après 6 h, atteignant un maximum d'inhibition (62%) après 12h d'incubation. Néanmoins, pour des raisons pratiques, les différentes études d'apoptose ont été poursuivies en utilisant 6 heures d'incubation.

Des résultats analogues ont été obtenus à l'aide du marqueur DiOC6 lors de **l'évaluation du potentiel transmembranaire mitochondrial**. Nous avons ainsi constaté une **diminution du pourcentage de cellules DiOC6^{low} sous l'effet de la leptine**, indiquant l'implication des mitochondries dans la modulation de l'apoptose par la leptine.

- ✓ Ayant précédemment montré que l'effet de la leptine sur l'expression des molécules d'adhérence à la surface des PN était médié en partie par le TNF α , nous avons recherché l'implication de ce médiateur dans l'effet anti-apoptotique de la leptine.
- L'étude de l'apoptose des PN après isolement et purification a montré une accélération de l'apoptose spontanée par rapport aux résultats observés sur sang total. Par ailleurs, **l'effet anti-apoptotique de la leptine, observé sur sang total, n'était plus retrouvé sur PN isolés**, confirmant l'hypothèse selon

laquelle la leptine pourrait exercer son effet sur l'apoptose de façon indirecte (Tableau X).

	Cellules annexine V ⁺ (%)
PBS	30.7 ± 2.9
Leptine (ng/ml)	
50	28.5 ± 2.7
100	31.0 ± 1.3
500	27.9 ± 2.2
1000	32.9 ± 3.9
5000	33.1 ± 3.1
10000	36.8 ± 3.7
GM-CSF (1000 pg/ml)	14.1 ± 2.3 *

Tableau X. Effet de la leptine sur l'apoptose des PN après isolement et purification

Les valeurs sont exprimées en pourcentage de PN annexine V⁺ et les résultats en moyenne ± SEM (n=4).

* significativement différent par rapport à l'échantillon incubé en présence de PBS (p<0.05).

- Par ailleurs, nous avons constaté que **l'effet protecteur exercé par la leptine à fortes concentrations (10000 ng/ml) sur l'apoptose des PN dans le sang total était conservé en présence d'anticorps neutralisants anti-GM-CSF (20µg/ml) ou anti-IL-8 (5µg/ml)**, obtenant des pourcentages d'inhibition de l'apoptose de 55% et 52% respectivement. Par contre, cet effet protecteur n'est plus observé lorsque les échantillons de sang total sont incubés en présence d'anticorps neutralisants anti-TNFα (10µg/ml).

Ces résultats suggèrent donc que l'effet anti-apoptotique exercé par la leptine soit médié par le TNFα.

	PBS	Ac anti-GM-CSF	Ac anti-IL8	Ac anti-TNF
PBS	15.8 ± 1.5	18.3 ± 1.4	27.7 ± 1.9	19.0 ± 2.1
Leptine	6.4 ± 0.6*	8.3 ± 0.3*	13.4 ± 0.8*	15.4 ± 1.0

Tableau XI. Implication du TNFα dans l'effet modulateur de la leptine (10000 ng/ml) sur l'apoptose des PN

Les valeurs sont exprimées en pourcentage de PN annexine V⁺ et les résultats en moyenne ± SEM (n=3).

* : significativement différent par rapport à l'échantillon incubé en présence PBS (p<0.05).

IV.2. Le VIP augmente l'apoptose des PN après isolement et purification

- ✓ Nous avons dans un premier temps étudié l'effet du VIP sur l'apoptose des PN dans le sang total. Nous avons observé que le pourcentage de cellules annexine V⁺, obtenu après incubation du sang total en présence de VIP (5.10⁻⁶ M) pendant 6 h, n'était pas significativement différent de celui obtenu en présence de PBS. **Cette absence d'effet du VIP sur l'apoptose des PN dans le sang total a été observé** quels que soient la concentration de VIP utilisée (10⁻¹¹-10⁻⁶M) et le temps d'incubation (3, 6, 12 et 24h).

De même, nous n'avons pas observé de différence significative entre les échantillons incubés en présence de VIP et ceux incubés en présence de PBS en ce qui concerne le pourcentage de cellules DiOC6^{low} (Tableau XII).

	Cellules annexine V ⁺ (%)	Cellules DiOC6 ^{low} (%)
PBS	11.5 ± 0.8	7.8 ± 2.2
VIP10 ⁻¹⁰ M	14.6 ± 0.9	10.3 ± 2.9
VIP10 ⁻⁹ M	15.5 ± 1.2	9.7 ± 2.6
VIP10 ⁻⁸ M	16.7 ± 2.0	10.3 ± 3.1
VIP10 ⁻⁷ M	14.4 ± 1.6	10.0 ± 2.9
VIP10 ⁻⁶ M	13.9 ± 2.0	10.1 ± 3.2
VIP 5.10 ⁻⁶ M	13.1 ± 1.9	8.9 ± 3.2
GM-CSF (1000pg/ml)	3 ± 0.2*	3.4 ± 0.7

Tableau XII. Effet du VIP sur l'apoptose des PN dans le sang total après 6 heures d'incubation

Les valeurs sont exprimées en pourcentage de PN annexine V⁺ et de Cellules DiOC6^{low}.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=6 et 4 respectivement).

** significativement différent par rapport à l'échantillon incubé en présence PBS (p<0.05).*

- ✓ **Par contre, lorsque l'étude de l'apoptose a été réalisée à partir de PN isolés et purifiés, nous avons observé que l'incubation des PN en présence de VIP pendant 6 heures augmentait le pourcentage de PN en apoptose** (Tableau XIII).

	Cellules annexine V ⁺ (%)	Cellules DiOC6 ^{low} (%)
PBS	30.6 ± 2.5	27.4 ± 6.2
VIP10 ⁻¹⁰ M	33.2 ± 1.5	25.5 ± 7.6
VIP10 ⁻⁹ M	32.9 ± 2.7	22.4 ± 6.7

VIP10 ⁻⁸ M	32.1 ± 2.2	22.2 ± 6.3
VIP10 ⁻⁷ M	32.5 ± 3.4	28.8 ± 8.3
VIP10 ⁻⁶ M	49.8 ± 5.2*	39.9 ± 11.9
VIP 5.10 ⁻⁶ M	52.2 ± 7.1*	46.8 ± 11.5
GM-CSF (1000pg/ml)	15.5 ± 2.0	16.2 ± 5.0

Tableau XIII. Effet du VIP sur l'apoptose des PN isolés et purifiés

Les valeurs sont exprimées en pourcentage de PN annexine V⁺ et de Cellules DiOC6^{low}.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=4 et 5 respectivement).

** significativement différent par rapport à l'échantillon incubé en présence PBS (p<0.05).*

Cet effet pro-apoptotique du VIP s'observe à fortes concentrations, 5.10⁻⁶ et 10⁻⁶ M, obtenant un pourcentage de cellules annexine V⁺ 1.7 et 1.6 fois plus élevé que le pourcentage obtenu en présence de PBS, respectivement. Cet effet est associé à une **perte du potentiel transmembranaire mitochondrial**, observant en effet une augmentation du pourcentage de cellules DiOC6^{low} sous l'effet du VIP.

- ✓ Le VIP exerce un effet pro-apoptotique direct sur les PN, cet effet étant observé sur PN isolés, mais non retrouvé dans des conditions de sang total. **L'effet pro-apoptotique du VIP sur les PN pourrait être contrebalancé par l'induction de facteurs anti-apoptotiques dans le sang circulant**, tels que le GMCSF ou le TNF α, ce dernier exerçant un effet anti-apoptotique sur les PN dans nos conditions opératoires. Nous avons néanmoins constaté, lors d'une expérience préliminaire réalisée dans des conditions de sang total, l'absence d'effet des anticorps neutralisants anti-GM-CSF (20μg/ml) et anti-TNFα (10μg/ml), le VIP restant dépourvu d'effet pro-apoptotique sur les PN (données non montrées).

Des études complémentaires devront être réalisées afin de mieux définir les conditions opératoires ou de rechercher l'implication d'un autre facteur anti-apoptotique.

- ✓ Par ailleurs, **l'apparition de l'effet pro-apoptotique du VIP pourrait nécessiter une étape préalable d'activation du PN**. En effet, les procédures d'isolement des PN sont susceptibles de stimuler les cellules, pouvant expliquer que le VIP présente un effet sur PN isolés, non retrouvé dans des conditions de sang total. Nous avons donc étudié, dans des conditions de sang total, l'effet du VIP sur l'apoptose des PN après une étape préalable d'activation.
 - Nous avons dans un premier temps recherché un facteur capable d'activer les PN tout en étant dépourvu d'effet sur l'apoptose.

Résultats

Ne pouvant utiliser le LPS, connu pour ses propriétés anti-apoptotiques sur les PN, ni le TNF α , décrit dans certaines études comme facteur anti-apoptotique et exerçant un effet inhibiteur sur l'apoptose des PN dans nos conditions opératoires, nous avons étudié l'effet du fMLP (10^{-6} M) et du PMA (0,5 à 100 ng/ml) sur l'apoptose des PN après 6 heures d'incubation. Nous avons ainsi constaté que le fMLP exerce un effet anti-apoptotique sur les PN, alors que le PMA exerce à fortes concentrations (5 à 100 ng/ml) un effet pro-apoptotique majeur. Néanmoins, l'apoptose des PN n'est pas modifiée pour des concentrations de PMA de 0,1 et 0,5 ng/ml, cette dernière ayant été finalement retenue pour la stimulation des PN (données non montrées).

- Par la suite, nous avons déterminé si l'apparition de l'effet pro-apoptotique du VIP nécessitait une étape préalable d'activation des PN. Le sang total a été incubé pendant 5 minutes en présence de PMA (0,5 ng/ml), puis l'effet du VIP sur l'apoptose des PN a été étudié après 6 heures d'incubation.

	PBS	PMA (0.5 ng/ml)
PBS	10.1 \pm 0.7	13.9 \pm 2.2
VIP (5.10^{-6} M)	12.9 \pm 2.1	22.2 \pm 2.6*

Tableau XIV. Effet d'une étape préalable d'activation du PN sur l'effet pro-apoptotique du VIP

Les valeurs sont exprimées en pourcentage de PN annexine V⁺.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=3).

** significativement différent par rapport à l'échantillon stimulé en présence de PBS puis incubé en présence VIP (p<0.05).*

Nous avons ainsi constaté un effet pro-apoptotique du VIP sur des PN préalablement activés par le PMA. **Le VIP augmenterait donc l'apoptose de PN préactivés, soulignant l'intérêt de ce neuropeptide en tant que médiateur anti-inflammatoire.** Cet effet pro-apoptotique du VIP sur PN préactivés s'observe à fortes concentrations (5.10^{-6} M), des résultats non significatifs ayant été obtenus à concentrations plus faibles (données non montrées).

- ✓ L'effet du VIP sur l'apoptose des PN s'observe à fortes concentrations, 5.10^{-6} M. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que cet effet fasse intervenir, non pas le récepteur VPAC1, décrit à la surface des PN et de forte affinité pour le VIP, mais un autre récepteur comme PAC1, de faible affinité pour le VIP et de forte affinité

pour le PACAP. Nous avons donc étudié l'effet du PACAP (Neosystem, 10^{-10} à 5.10^{-6} M) sur l'apoptose des PN dans des conditions de sang total après 6 heures d'incubation.

Des résultats préliminaires, obtenus lors d'une expérience ont mis en évidence un effet pro-apoptotique du PACAP, qu'il nous faudra confirmer lors d'expériences ultérieures (Tableau XV)

	Cellules annexineV ⁺ (%)
PBS	6.0
PACAP (ng/ml)	
10^{-10} M	6.1
10^{-9} M	10.8
10^{-8} M	18.0
10^{-7} M	18.2
10^{-6} M	19.7
5.10^{-6} M	22.4
GM-CSF (1000 pg/ml)	1.7

Tableau XV. Effet du PACAP sur l'apoptose des PN dans le sang total
Les valeurs sont exprimées en pourcentage de PN annexine V⁺ (n=1).

IV.3. Effet du VIP sur l'expression des molécules de la famille Bcl-2

La détermination de l'intégrité membranaire mitochondriale a montré l'implication des mitochondries dans la modulation de l'apoptose par le VIP. C'est pourquoi nous avons étudié la modulation des protéines de la famille Bcl-2 sous l'effet de cette molécule.

Dans des conditions expérimentales réalisées à partir de PN isolés et purifiés, nous n'avons **pas observé d'effet modulateur du VIP sur l'expression des molécules anti-apoptotiques Mcl-1 et A1, et l'expression des molécules pro-apoptotiques Bad et Bax.** Des expériences ultérieures à l'aide d'un anticorps spécifique reconnaissant la forme active de Bax (témoignant de sa translocation à la membrane mitochondriale) devront être effectuées.

DISCUSSION

Nos résultats montrent l'absence d'effet de la leptine sur l'explosion oxydative des PN. Par contre, la leptine diminue l'expression de la L-sélectine CD62L et augmente l'expression du CD11b à la surface des PN, ce qui témoigne de son effet activateur sur les PN. De plus, la leptine inhibe l'apoptose des PN dans le sang total. L'effet anti-apoptotique exercé par la leptine, de même que l'effet modulateur sur l'expression des molécules d'adhérence à la surface des PN, ne sont pas observés lorsque les PN sont isolés de leur environnement circulant et sont par ailleurs diminués en présence d'un anticorps anti-TNF α . Ceci suggère l'implication du TNF α dans l'action de la leptine sur les PN. En outre, nous avons mis en évidence l'induction par la leptine de la synthèse de différentes cytokines par les cellules de l'environnement, en particulier le TNF α .

En ce qui concerne le VIP, nous avons montré que celui-ci n'exerce aucun effet sur l'explosion oxydative, ni sur l'expression des molécules d'adhérence à la surface des PN. Par contre, le VIP présente, à l'inverse de la leptine, un effet pro-apoptotique direct sur les PN isolés, associé à une perte du potentiel transmembranaire mitochondrial. De plus, alors qu'aucun effet direct du VIP sur l'apoptose des PN n'a été mis en évidence dans le sang total, nous avons observé que le VIP augmente l'apoptose des PN dans le sang total après préactivation par le PMA.

Une des particularités de notre étude est d'avoir été effectuée dans des conditions de sang total, grâce à l'utilisation de la cytométrie en flux, qui permet une analyse individuelle des cellules. Ceci permet en effet d'éviter les procédures d'isolement, qui induisent l'expression à la surface des PN de molécules non détectées dans le sang circulant et qui pourraient de ce fait altérer les réponses cellulaires. Ceci permet également d'être plus proche des conditions physiologiques. Il a notamment été rapporté le rôle des interactions cellulaires et des composants plasmatiques (cytokines, récepteurs solubles des cytokines, antagonistes) dans le maintien de la viabilité des PN (Hodge, 2000). Cependant, l'étude des fonctions des PN dans les conditions de sang total ne nous permet pas d'écarter la possible contribution des autres cellules sanguines, en particulier les monocytes, sur les effets observés, notamment par la

libération de différentes cytokines ou facteurs de survie. Ceci nous a donc conduit à effectuer en parallèle certaines études sur PN hautement purifiés.

Nos résultats concernant l'effet modulateur de la leptine sur l'expression des molécules d'adhérence à la surface des PN sont en accord avec les travaux de Zarkesh-Esfahani et al. Ces auteurs ont en effet rapporté que, dans des conditions de sang total, la leptine augmentait de façon dose-dépendante l'expression du CD11b à la surface du PN, alors qu'aucun effet n'était observé sur PN isolés. L'effet modulateur observé sur sang total était en partie neutralisé par un récepteur soluble du TNF α . De plus, l'addition de monocytes à une suspension de PN purifiés permettait de restaurer l'activation du PN par la leptine. Ainsi, l'effet activateur exercé par la leptine sur les PN humains serait indirect, en grande partie médié par le TNF α , sécrété par les monocytes (Zarkesh-Esfahani, 2004). De plus, notre étude associe à l'effet de la leptine sur l'expression du CD11b un effet parallèle sur l'expression de la L-sélectine à la surface des PN.

A l'inverse, et en accord avec les études précédentes (Kinhult, 2002), nous n'avons pas retrouvé d'effet du VIP sur l'expression des molécules d'adhérence à la surface des PN, que ce soit sur PN isolés ou dans des conditions de sang total.

Nous n'avons pas mis en évidence d'effet direct ni du VIP ni de la leptine sur l'explosion oxydative des PN. Concernant le VIP, ce résultat est en accord avec les études antérieures effectuées sur PN isolés (Pedrera, 1994 ; Lopez-Gonzalez, 1994). Par contre, d'autres auteurs ont rapporté un effet direct de la leptine sur la production de FRO. Ainsi, Caldefie-Chezet et al ont montré, en utilisant la technique de chimioluminescence, que l'incubation de PN isolés, pendant 3 heures en présence de leptine, induisait une augmentation de la production de FRO (Caldefie-Chezet, 2001). Cette même équipe a constaté, par la technique d'oxydation de la dichlorofluoresceine en cytométrie en flux, que la leptine, après 3 h d'incubation, augmentait la production d'H₂O₂ par les PN isolés (Caldefie-Chezet, 2003). Ces discordances pourraient être en rapport avec des différences méthodologiques et notamment le fait que ces études ont été réalisées après isolement des PN par différentes procédures susceptibles d'activer les PN.

Caldefie-Chezet et al ont en outre rapporté l'absence d'effet modulateur de la leptine sur l'explosion oxydative des PN en réponse à une stimulation par le PMA (Caldefie-Chezet, 2003). Les travaux concernant l'effet du VIP sur l'explosion oxydative des PN en réponse au fMLP ou au PMA ont, quant à eux, donné lieu à des résultats controversés. Ainsi, certains auteurs ont montré que le VIP inhibe la production d'O₂^{•-} par les PN en réponse à la

stimulation par le fMLP (Kurosawa, 1993). A l'inverse, d'autres auteurs rapportent un effet de priming du VIP sur l'explosion oxydative des PN en réponse à une stimulation par le PMA et le fMLP (Pedrera, 1994 ; Lopez-Gonzalez, 1994). Nos résultats obtenus sur sang total montrent l'absence d'effet de la leptine et du VIP sur la production de FRO en réponse au fMLP. Comme cela a été précisé ci-dessus, les discordances observées pourraient être d'ordre méthodologique.

Nous avons montré que la leptine inhibe l'apoptose des PN dans le sang total. En effet, la leptine diminue de façon significative le pourcentage de cellules annexine V⁺ par rapport au contrôle incubé en présence de PBS. Afin de déterminer l'implication éventuelle d'autres médiateurs inflammatoires dans cet effet, nous avons dans un premier temps étudié l'effet de la leptine sur l'apoptose des PN isolés. Nous avons tout d'abord constaté, en accord avec des études antérieures (Hodge, 2000 ; François, 2005), une accélération de l'apoptose spontanée par rapport aux résultats observés sur sang total, qui pourrait être en rapport avec des artéfacts de stimulation. De plus, nous n'avons pas pu retrouver, dans ces conditions, l'effet anti-apoptotique de la leptine observé sur sang total. Par ailleurs, l'effet protecteur exercé par la leptine sur l'apoptose des PN dans le sang total est diminué par l'addition d'un anticorps neutralisant anti-TNF α . Ceci suggère l'implication du TNF α dans cet effet, sans toutefois exclure la participation d'autres médiateurs proinflammatoires, qu'il nous faudra déterminer. Les études concernant l'effet du TNF α sur l'apoptose des PN ont donné lieu à des résultats controversés, selon les conditions expérimentales utilisées, en particulier la durée d'incubation et la concentration de TNF utilisées (Van den Berg, 2001 ; Salamone, 2004). Dans des conditions de sang total et après incubation en présence de TNF α (5 ng/ml) pendant 6 heures, nous montrons clairement un effet anti-apoptotique du TNF α . L'inhibition de cet effet en présence d'un anticorps neutralisant anti-TNF témoigne de son caractère spécifique.

Bruno et al ont récemment rapporté un effet anti-apoptotique de la leptine sur les PN. Ces auteurs ont en effet montré que la leptine activait les voies de signalisation PI3K et MAPK, conduisant à une inhibition de la voie mitochondriale de l'apoptose ; cet effet anti-apoptotique a été observé sur PN isolés (Bruno, 2005). Ces résultats sont en désaccord avec ceux que nous avons obtenu sur PN isolés : l'effet anti-apoptotique décrit par ces auteurs pourrait être lié à la présence de monocytes contaminants, aucune technique de purification des PN en présence de billes magnétiques n'ayant été effectuée lors de cette étude.

A l'inverse de la leptine, nous avons mis en évidence un effet pro-apoptotique du VIP. Cet effet est observé uniquement sur PN isolés. L'absence d'effet du VIP dans les conditions

de sang total pourrait s'expliquer par la possible intervention d'autres médiateurs, jouant un rôle en tant que facteurs de survie, tels que le TNF α ou le GM-CSF, contrebalançant ainsi l'effet pro-apoptotique du VIP. Des résultats préliminaires, obtenus au cours d'une expérience, ont néanmoins montré l'absence de modification de l'effet du VIP lors d'un prétraitement par un anticorps anti-TNF α ou anti-GM-CSF. Par ailleurs, l'apparition de l'effet pro-apoptotique du VIP pourrait nécessiter une étape préalable d'activation du PN, les procédures d'isolement des PN étant susceptibles de stimuler les cellules. Nous avons ainsi constaté que, dans des conditions de sang total, le VIP exerçait un effet pro-apoptotique sur des PN préalablement activés par le PMA.

L'apoptose peut être initiée par deux voies principales : la voie des récepteurs de mort (extrinsèque) et la voie mitochondriale (intrinsèque), la voie mitochondriale semblant la plus sollicitée au sein du PN. Dans la voie mitochondriale, la cascade de caspases est initiée par une dépolarisation de la membrane mitochondriale et le relargage de facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome C, conduisant à l'activation de la caspase 3 et déclenchant le programme de mort (Simon, 2003). Le relargage mitochondrial de cytochrome C est contrôlé par les molécules de la famille Bcl-2. En particulier, une augmentation du taux intracellulaire de la molécule anti-apoptotique Mcl-1 a été impliquée dans la survie des PN induite par des cytokines proinflammatoires telles que le GM-CSF, l'IL-1, le TNF α et l'IL-15 (Moulding, 2001 ; Edwards, 2003 ; Simon, 2003). De plus, notre équipe a récemment montré une augmentation de Mcl-1 induite par les agonistes des TLR (François, 2005). Cette augmentation était associée à une augmentation du taux de A1, le seul autre facteur anti-apoptotique à avoir été impliqué, à ce jour, dans la survie des PN.

Par ailleurs, une régulation rapide de la survie des PN peut faire intervenir la phosphorylation du facteur pro-apoptotique Bad. En effet, une fois phosphorylé, celui-ci est séquestré par la protéine 14-3-3 dans le cytoplasme, devenant incapable d'interagir avec les molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ces dernières peuvent se lier à Bax, bloquant son activité pro-apoptotique et conduisant ainsi à la survie cellulaire (Cowburn, 2002 ; Simon, 2003).

En outre, les molécules de la famille Bcl2 impliquées dans l'induction de l'apoptose des PN, telles que Bax ou Smac /Diablo, peuvent également être modulées par des facteurs de survie. En effet, la molécule pro-apoptotique Bax, présente dans le cytosol des cellules intactes, subit au cours de l'apoptose une translocation vers la mitochondrie. Elle peut alors être intégrée dans la membrane externe mitochondriale et faciliter le relargage de facteurs pro-

apoptotiques dans le cytosol. Ce phénomène n'est possible qu'après clivage et activation d'une autre molécule de la famille Bcl2, Bid. Bid, protéine de 22 kDa, est clivée par la caspase 8 en un fragment de 15 kDa, tBid, qui possède une activité pro-apoptotique : tBid interagit en effet avec Bax et modifie sa conformation, conduisant à son oligomérisation et à son ancrage dans la membrane externe mitochondriale. Par ailleurs, Bid peut subir une translocation vers la mitochondrie et induire des effets similaires à ceux de Bax : les interactions Bid/Bax apparaissent comme étant critiques pour la perméabilisation mitochondriale. Enfin, une translocation de tBid vers la mitochondrie peut également survenir, tBid étant capable d'induire directement le relargage de cytochrome C. Une réduction de l'apoptose des PN induite par le G-CSF s'accompagne d'une inhibition du clivage de Bid, d'une diminution de la translocation de Bid et de Bax vers la mitochondrie, conduisant à une diminution de l'activation des caspases (Maiani, 2004b). La perméabilisation mitochondriale s'accompagne de la libération de facteurs pro-apoptotiques autres que le cytochrome C, en particulier Smac/Diablo. Smac/Diablo inactive les protéines cytosoliques IAPs (Inhibitor of apoptosis proteins), qui inhibent elles-mêmes les caspases au sein de cellules non apoptotiques. La survie des PN induite par le G-CSF est associée à une inhibition du relargage cytosolique de Smac/Diablo, cette dernière restant localisée dans la mitochondrie (Maiani, 2004b).

Nous n'avons pas observé de modulation du taux des molécules anti-apoptotiques Mcl-1 et A1 et ni des molécules pro-apoptotiques Bad et Bax induites par le VIP. Ce dernier résultat est en accord avec les études antérieures préalablement réalisées sur la régulation de la survie des PN. En effet, la plupart des études indiquent que les taux des molécules pro-apoptotiques restent assez constants au sein des PN, que ces cellules vieillissent naturellement ou que leur apoptose soit expérimentalement accélérée ou retardée (Edwards, 2003). Des expériences ultérieures devront déterminer le rôle potentiel joué par le VIP sur la translocation de Bax à la membrane mitochondriale ainsi que sur la libération mitochondriale de la molécule pro-apoptotique Smac/Diablo

L'effet modulateur exercé par la leptine sur l'expression des molécules d'adhérence à la surface des PN, de même que son effet protecteur sur l'apoptose, ont été observés à fortes concentrations (10000 ng/ml). De telles concentrations, très nettement supérieures aux concentrations sériques, d'environ 5 à 8 ng/ml dans les conditions physiologiques, peuvent-elles être observées in vivo ? Des taux sériques de leptine supérieurs à 400 ng/ml ont été rapportés chez des enfants présentant une insuffisance rénale chronique. De plus, des taux de leptine supérieurs à 700 ng/ml ont été mesurés chez des sujets obèses traités par de la leptine

(Zarkesh-Esfahani, 2004 ; Bruno, 2005). Par ailleurs, des taux élevés de leptine pourraient être trouvés au niveau des sites inflammatoires, qui contiennent des adipocytes produisant de la leptine. En outre, la nécessité d'utiliser de fortes doses de leptine pourrait s'expliquer par la demi-vie courte de cette molécule et par une fixation non spécifique de la leptine sur différentes protéines sanguines. L'utilisation de molécules marquées permettrait de résoudre cette dernière hypothèse. Enfin, les PN expriment uniquement à leur surface ObRa, isoforme court du récepteur de la leptine, moins efficace dans la transduction du signal que l'isoforme long ObRb (Zarkesh-Esfahani, 2004 ; Bruno, 2005). Ceci pourrait expliquer la faible sensibilité des PN vis à vis de la leptine.

De façon similaire, les effets exercés par le VIP sur l'apoptose des PN sont là encore observés à fortes doses ($5 \cdot 10^{-6}$ et 10^{-6} M). Différentes hypothèses permettent d'expliquer les résultats obtenus, en particulier la demi-vie très brève du VIP ou une fixation non spécifique à différentes protéines sanguines. De plus, l'effet du VIP pourrait ne pas faire intervenir les récepteurs classiques (VPAC1 et VPAC2) mais le récepteur PAC1. En effet, ce récepteur présente une affinité 300 à 1000 fois plus élevée pour le PACAP que pour le VIP, ce qui expliquerait les doses très élevées de VIP à utiliser. Des résultats préliminaires, obtenus lors d'une expérience, ont mis en évidence un effet pro-apoptotique du PACAP sur les PN, cet effet ayant été observé pour de plus faibles concentrations (10^{-8} M). Ces résultats, qui devront être confirmés lors d'expériences ultérieures, pourraient suggérer l'implication d'un récepteur de faible affinité pour le VIP, tel que PAC1, dans l'effet du VIP sur les PN. Néanmoins, le récepteur PAC1 n'a pas été mis en évidence, à ce jour, à la surface des PN, ces derniers exprimant uniquement le récepteur VPAC1 à leur surface (Harfi, 2005). De plus, des études récentes ont décrit le PACAP comme une molécule pro-inflammatoire pour les PN (Harfi, 2004, 2005). D'autres études seront nécessaires afin de tester cette hypothèse.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Un des points marquants de notre travail est la mise en évidence de l'effet différentiel du VIP et de la leptine sur l'apoptose des PN. La comparaison des effets de ces deux neuropeptides sur l'apoptose des PN, dans le sang total et sur PN isolés de leur environnement sanguin, a montré, de façon originale, que la leptine exerce un effet anti-apoptotique médié, au moins en partie, par la libération de TNF α par les cellules de l'environnement, alors que le VIP accélère l'entrée en apoptose des PN par un effet direct, puisque uniquement observé sur PN isolés. L'effet anti-apoptotique exercé par la leptine permet ainsi de prolonger la survie des PN et d'assurer une destruction efficace des pathogènes. A l'inverse, le VIP, rapporté comme médiateur anti-inflammatoire, augmente l'apoptose des PN, jouant ainsi un rôle dans la résolution de l'inflammation. Des études ultérieures devront préciser si l'effet pro-apoptotique du VIP est contre-balancé par l'induction de facteurs anti-apoptotiques dans le sang circulant. Quoiqu'il en soit, cet effet pro-apoptotique du VIP nécessite une étape préalable d'activation du PN. Nous rechercherons les mécanismes impliqués dans cet effet et notamment le rôle éventuel de la libération mitochondriale de la molécule pro-apoptotique Smac/Diablo. Enfin, les résultats que nous avons récemment obtenus, montrant un effet pro-apoptotique du PACAP, apparenté au VIP, devront être confirmés lors d'expériences ultérieures et nous conduiront à étudier l'expression du récepteur PAC1 à la surface des PN.

BIBLIOGRAPHIE

- Akgul, C., Moulding, D.A. and Edwards, S.W.; Molecular control of neutrophil apoptosis; *FEBS Letters*; 2001, 487: 318-322
- Ali, H., Richardson, R.M., Haribabu, B. and Nyderman, R. ; Chemoattractant receptor cross-desensitization; *J. Biol. Chem.*, 1999, 274: 6027-6030
- Anders, H.J., Rihl, M., Heufelder, A., Loch, O. and Schattenkirchner, M.; Leptin serum levels are not correlated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis; *Metabolism.* ; 1999, 48(6): 745-748.
- Andrews, T. and Sullivan, K.E.; Infections in Patients with Inherited Defects in Phagocytic Function; *Clin. Microbiol. Rev.*, 2003, 16(4): 597–621
- Barbier, M., Cherbut, C., Aubé, A.C., Blottière, H.M. and Galmiche, J.P.; Elevated plasma leptin concentrations in early stages of experimental intestinal inflammation in rats; *Gut*; 1998, 43: 783-790
- Bengis-Garber, C. and Gruener, N.; Protein Kinase A downregulates the phosphorylation of p47 Phox in human neutrophils: a possible pathway for inhibition of the respiratory burst; *Cell. Signal.*; 1996, 8(4): 291-296
- Bjørbæk, C., El-Haschimi, K., Frantz, J.D. and Flier, J.S.; The Role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance; *J. Biol. Chem.*; 1999, 274 (42): 30059-30065
- Bokarewa, M., Bokarew, D., Hultgren, O. and Tarkowski, A.; Leptin consumption in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis; *Ann. Rheum. Dis.*; 2003, 62 (10): 952-956
- Bondesson, L., Norolind, K., Liden, S., Gafvelin, G., Theodorsson, E. and Mutt, V. ; Dual effects of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) on leucocytes migration; *Acta Physiol. Scand.*; 1991, 141 (4): 477-481
- Bruno, A., Conus, S., Schmid, I. and Simon, H.U.; Apoptotic pathways are inhibited by leptin receptor activation in neutrophils; *J. Immunol.*; 2005, 174: 8090-8096
- Buttke, T.M. and Sandstrom, P.A.; Oxidative stress as a mediator of apoptosis; *Immunol. Today*; 1994, 15(1): 7-10
- Caldefie-Chezet, F., Poulin, A. and Vasson, M-P.; Leptin regulates functional capacities of polymorphonuclear neutrophils; *Free Radic. Res.*; 2003, 37 (8): 809-814
- Caldefie-Chezet, F., Poulin, A., Tridon, A., Sion, B. and Vasson, M-P.; Leptin: a potential regulator of polymorphonuclear neutrophil bactericidal action ?; *J. Leukoc. Biol.*; 2001, 69: 414-418

Bibliographie

- Carballo, M., Conde, M., El Bekay, R., Martín-Nieto, J., Camacho, M.J., Monteseirín, J., Conde, J., Bedoya, F.J. and Sobrino, F.; Oxidative stress triggers STAT3 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation in human lymphocytes; *J. Biol. Chem.*; 1999, 274 (25): 17580-17586
- Carolan, E.J. and Casale T.B; Effects of neuropeptides on neutrophil migration through noncellular and endothelial barriers; *J. Allergy Clin. Immunol.*; 1993, 92 (4): 589-598
- Chalasani, N., Crabb, D.W., Cummings, O.W., Kwo, P.Y., Asghar, A., Pandya, P.K. and Considine, R.V.; Does leptin play a role in the pathogenesis of human non alcoholic steatohepatitis?; *Am. J. Gastroenterol.*; 2003, 98: 2771-2776
- Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S. and Mantovani, A.; Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products; *Blood*, 1992, 8: 2012-2020
- Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L., and Caro, J.F.; Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans; *N. Engl. J. Med.*, 1996, 334: 292-295
- Conus, S., Bruno, A. and Simon, H.U.; Leptin is an eosinophil survival factor; *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2005, 116: 1228-1234
- Cowburn, A.S., Cadwallader, K.A., Reed, B.J., Farahi, N. and Chilvers, E.R.; Role of PI3-kinase-dependent Bad phosphorylation and altered transcription in cytokine-mediated neutrophil survival; *Blood*; 2002, 100: 2607-2616
- Dang, P.M.C, Dewas, C., Gaudry, M., Fay, M., Pedruzzi, E., Gougerot-Pocidalo, M.A. and El Benna, J.; Priming of human neutrophil respiratory burst by Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor (GM-CSF) involves partial phosphorylation of p47^{phox}; *J. Biol. Chem.*; 1999, 274 (29): 20704-20708
- DeLeo, F.R., Allen, L.A., Apicella, M. and Nauseef, W.M.; NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis; *J Immunol*; 1999, 163: 6732-6740.
- Delgado, M.; VIP: a very important peptide in T helper differentiation; *TRENDS in Immunology*; 2003a, 24 (5): 221-224
- Delgado, M. and Ganea, D.; Vasoactive intestinal peptide prevents activated microglia-induced neurodegeneration under inflammatory conditions : potentiel therapeutic role in brain trauma; *FASEB J.*; 2003b, 17 (13): 1922-1924
- Delgado, M., Garrido, E., De La Fuente, M. and Gomariz, R.P.; Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP-38) stimulates rat peritoneal macrophage functions; *Peptides*, 1996, 17 (7): 1097-1105

Bibliographie

- Delgado, M., Munoz-Elias E.J., Gomariz, R.P. and Ganea, D.; Vasoactive Intestinal Peptide and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide prevent inducible Nitric Oxide Synthase transcription in macrophages by inhibiting NF- κ B and IFN Regulatory Factor 1 activation; *J. Immunol.*; 1999a, 162: 4685-4696
- Delgado, M., Pozo, D., Martinez, C., Leceta, J., Calvo, J.R., Ganea, D. and Gomariz, R.P.; Vasoactive Intestinal Peptide and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide inhibit endotoxin-induced TNF α production by macrophages : in vitro and in vivo studies; *J. Immunol.*; 1999b, 162: 2358-2367
- Dewas, C., Dang, P.M.C., Gougerot-Pocidallo, M.A. and El-Benna, J.; TNF α induces phosphorylation of p47^{phox} in human neutrophils: partial phosphorylation of p47^{phox} is a common event of priming of human neutrophils by TNF α and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor; *J. Immunol.*; 2003, 171: 4392-4398.
- Dixit, V.D., Mielenz, M., Taub, D.D. and Parvizi, N.; Leptin induces growth hormone secretion from peripheral blood mononuclear cells via a protein kinase C- and nitric oxide-dependent mechanism; *Endocrinology*; 2003, 144 (12): 5595-5603
- Djanani, A.M. and Kahler, ChM.; Modulation of inflammation by vasoactive intestinal peptide and bombesin : lack of effects on neutrophil apoptosis; *Acta Med Austriaca*, 2002, 29 (3): 93-96
- Downey, G.P., Fukushima, T., Fialkow, L. and Waddell T.K.; Intracellular signaling in neutrophil priming and activation; *Semin. Cell. Biol.*; 1995, 6(6):345-356
- Edwards, S.W., Moulding, D.A., Derouet, M and Moots, R.J.; Regulation of neutrophil apoptosis; *Chem. Immunol. Allergy*; 2003, 83: 204-224
- El Benna, J., Faust, L.R.P., Johnson, J.L. and Babior, B.M.; Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47^{phox} as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase ; *J. Biol. Chem.*; 1996, 271(11): 6374-6378.
- El Benna, J., Dang, P.M.C., Gaudry, M., Fay, M., Morel, F., Hakim, J. and Gougerot-Pocidallo, M.A.; Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67^{PHOX} during neutrophil activation; *J. Biol. Chem.*; 1997, 272: 17204-17208
- Elbim, C., Bailly, S., Chollet-Martin, S., Hakim, J. and Gougerot-Pocidallo, M.A.; Differential priming effects of pro-inflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial N-Formyl peptides; *Infect. Immun.*; 1994, 62 (6): 2195-2201
- Elbim, C., Chollet-Martin, S., Bailly, S., Hakim, J. and Gougerot-Pocidallo, M.A.; Priming of polymorphonuclear neutrophils by tumor necrosis factor alpha in whole blood:

- identification of two polymorphonuclear neutrophil subpopulations in response to formyl-peptides; *Blood*; 1993, 82(2): 633-640
- Elbim, C., Lefebvre, M., Hakim, J. and Gougerot-Pocidalò, M.A.; Effects of pentoxifylline on human polymorphonuclear neutrophil responses to TNF in whole blood; *Eur. Cytokine Netw.*; 1995, 6 (2): 113-120
 - Elbim, C., Reglier, H., Fay, M., Delarche, C., Andrieu, V., El Benna, J. and Gougerot-Pocidalò, M.A.; Intracellular pool of IL-10 receptors in specific granules of human neutrophils: differential mobilization by proinflammatory mediators; *J. Immunol.*; 2001, 166: 5201-5207.
 - El Zein, N., Corazza, F. and Sariban, E.; The neuropeptide Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Protein is a physiological activator of human monocytes; *Cellular Signaling*; 2006, 18: 162-173
 - Faggioni, R., Feingold, K.R. and Grunfeld, C.; Leptin in regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition; *FASEB J.*; 2001, 15: 2565-2571
 - Fantuzzi, G. and Faggioni, R.; Leptin in the regulation of immunity, inflammation and hematopoiesis; *J. Leukoc. Biol.*; 2000, 68: 437-446
 - Ferguson, S.S.G.; Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis : the role in receptor desensitization and signaling; *Pharmacological reviews*; 2001, 53: 1-24.
 - François, S., El Benna, J., Dang, P.M.C., Pedruzzi, E., Gougerot-Pocidalò, M.A. and Elbim, C.; Inhibition of neutrophil apoptosis by TLR agonists in whole blood: involvement of the Phosphoinositide 3-kinase/Akt and NF- κ B signaling pathways, leading to increased levels of Mcl-1, A1, and Phosphorylated Bad; *J. Immunol.*; 2005, 174: 3633-3642
 - Frühbeck, G.; Intracellular signalling pathways activated by leptin; *Biochem. J.*; 2006, 393: 7-20
 - Ganea, D. and Delgado, M.; Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as modulators of both innate and adaptative immunity; *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*; 2002, 13 (3): 229-237
 - Gougerot-Pocidalò, M.A.; Polynucléaires neutrophiles humains; *Revue Française des Laboratoires*; 2002, 341: 43-51
 - Gougerot-Pocidalò, M.A., Fay, M., Roche, Y. and Chollet-Martin, S.; Mechanisms by which oxidative injury inhibits the proliferative response of human lymphocytes to PHA. Effect of the thiol compound 2-mercaptoethanol; *Immunology*; 1988, 64(2): 281-288

Bibliographie

- Gougerot-Pocidalò, M.A., Roche, Y., Fay, M., Perianin, A. and Bailly, S.; Oxidative injury amplifies interleukin-1-like activity produced by human monocytes; *Int. J. Immunopharmacol.*, 1989, 11(8):961-969
- Gualillo, O., Eiras, S., Lago, F., Diéguez, C., Casanueva, F.F.; Elevated serum leptin concentrations induced by experimental acute inflammation; *Life Sci.*; 2000, 67(20): 2433-2441.
- Harbecke, O., Liu, L., Karlsson, A. and Dahllgren, C.; Desensitization of the fMLP-induced NADPH-oxidase response in human neutrophils is lacking in okadaic acid-treated cells; *J Leukoc Biol.* 1997,61:753-58.
- Harfi, I., Corazza, F., D'Hondt, S. and Sariban, E. ; Differential calcium regulation of proinflammatory activities in human neutrophils exposed to the neuropeptide Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Protein; *J. Immunol.*; 2005, 175: 4091-4102
- Harfi, I., D'Hondt, S., Corazza, F. and Sariban, E. ; Regulation of human polymorphonuclear leukocytes functions by the neuropeptide Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide after activation of MAPKs; *J. Immunol.*; 2004, 173: 4154-4163
- Hodge, G., Hodge, S and Han, P.; Increased levels of apoptosis of leukocyte subsets in cultured PBMCs compared to whole blood as shown by annexin V binding: relevance to cytokine production; *Cytokine*; 2000, 12: 1763-1768
- Homburg, C.H., de Haas, M., von dem Borne, A.E., Verhoeven, A.J., Reutelingsperger, C.P. and Roos, D.; Human neutrophils lose their surface Fc γ RIII and acquire annexin V binding sites during apoptosis in vitro; *Blood*; 1995, 85 (2): 532-540
- Howard, J.K., Lord, G.M., Matarese, G., Vendetti, S., Ghatei, M.A., Ritter, M.A., Lechler, R.I. and Bloom, S.R.; Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in *ob/ob* mice; *J Clin Invest*, 1999, 104 (8): 1051-1059
- Jope, R.S., Song, L., Grimes, C.A. and Zhang, L.; Oxidative stress oppositely modulates protein tyrosine phosphorylation stimulated by muscarinic G protein-coupled and epidermal growth factor receptors; *J. Neurosci. Res.*; 1999, 55(3): 329-340
- Khwaja, A, Carver, J.E. and Linch, D.C.; Interactions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF), granulocyte CSF, and tumor necrosis factor alpha in the priming of the neutrophil respiratory burst; *Blood*; 1992, 79(3): 745-753
- Kim, Y., Lee, B.D., Kim, O., Bae, Y.S., Lee, T., Suh, P.G. and Ryu, S.H.; Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide 27 is a functional ligand for Formyl Peptide Receptor-Like 1; *J. Immunol.*; 2006, 176: 2969-2975

Bibliographie

- Kinhult, J., Egesten, A., Uddman, R. and Cardell, L.O.; PACAP enhances the expression of CD11b, CD66b and CD63 in human neutrophils; *Peptides*; 2002, 23: 1735-1739
- Kinhult, J., Uddman, R., Laan, M., Lindén, A. and Cardell, L.O.; Pituitary adenylate cyclase-activating peptide inhibits neutrophil chemotaxis; *Peptides*; 2001, 22: 2151-2154
- Kurosawa, M. and Ishizuka, T.; Inhibitory effects of vasoactive intestinal peptide on superoxide anion formation by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-activated inflammatory cells in vitro; *Int. Arch. Allergy Immunol.* ; 1993, 100 (1): 28-34
- Laburthe, M., Couvineau, A. and Marie, J.C.; VPAC receptors for VIP and PACP; *Receptors and Channels*; 2002, 8: 137-153
- La Cava, A. and Matarese, G.; The weight of leptin in immunity; *Nat. Rev. Immunol.*; 2004, 4 (12) : 371-379
- Li, N. and Karin, M.; Is NF- κ B the sensor of oxidative stress?; *FASEB J.*, 1999, 13: 1137-1143.
- Loffreda, S., Yang, S.Q., Lin, H.Z., Karp, C.L., Brengman, M.L., Wang, D.J., Klein, A.S., Bulkley, G.B., Bao, C., Noble, P.W., Lane, M.D. and Diehl, A.M.; Leptin regulates proinflammatory immune responses; *FASEB J.*; 1998, 12: 57-65
- Lopez-Gonzalez, M.A. and Lucas, M.; Priming effect of vasoactive intestinal peptide on the respiratory burst of neutrophils non-mediated by plasma membrane receptors; *Experientia*; 1994, 50 (5): 486-488
- Lucas, M., Stuart, L.M.; Savill, J. and Lacy-Hulbert, A.; Apoptotic Cells and Innate Immune Stimuli Combine to Regulate Macrophage Cytokine Secretion; *J. Immunol.*; 2003, 171: 2610-2615
- Matarese, G., Moschos, S. and Mantzoros, C.S.; Leptin in immunology; *J. Immunol.*; 2005, 173: 3137-3142
- Maianski, N.A., Maianski, A.N., Kuijpers, T.W. and Roos, D.; Apoptosis of neutrophils; *Acta Haematol*; 2004a, 111: 56-66
- Maianski, N.A., Roos, D. and Kuijpers, T.W.; Bid truncation, Bid/Bax targeting to the mitochondria, and caspase activation associated with neutrophils apoptosis are inhibited by Granulocyte Colony-Stimulating Factor; *J. Immunol*; 2004b, 172: 7024-7030
- Martinez, C., Delgado, M., Pozo, D., Leceta, J, Calvo, J.R., Ganea, D. and Gomariz, R.P.; VIP and PACAP enhance IL-6 release and mRNA levels in resting peritoneal macrophages: in vitro and in vivo studies; *Journal of Neuroimmunology*; 1998, 85: 155-167

Bibliographie

- Martinez, C., Juarranz, Y., Abad, C., Arranz, A., Miguel, B.G., Rosignoli, F., Leceta, J. and Gomariz, R.P. ; Analysis of the role of the PAC1 receptor in neutrophil recruitment, acute-phase response, and nitric oxide production in septic shock; *J. Leukoc. Biol.*; 2005, 77:729-738
- Moore, S.I., Huffnagle, G.B., Chen, G.H., White, E.S. and Mancuso, P.; Leptin modulates neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*; *Infection and Immunity*, 2003, 71 (7): 4182-4185
- Moulding, D.A., Akgul, C., Derouet, M., White, M.R.H. and Edwards S.W.; BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis; *J. Leukoc. Biol.*; 2001, 70(5): 783-792
- Murphy, W.J. and Longo, D.L.; Growth hormone as an immunomodulating therapeutic agent; *Immunol. Today*; 2000, 21(5):211-213
- Murphy, W.J., Durum, S.K. and Longo, D.L.; Differential effects of growth hormone and prolactin on murine T cell development and function; *J.Exp. Med.*, 1993, 178(1):231-236.
- Murray, J., Barbara, J.A.J., Dunkley, S.A., Lopez, A.F., Van Ostade, X., Condliffe, A.M., Dransfield, I., Haslett, C. and Chilvers, E.R.; Regulation of neutrophil apoptosis by Tumor Necrosis Factor- α : Requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro; *Blood*, 1997, 90: 2772-2783
- Otero, M., Lago, R., Lago, F., Casanueva, F., Dieguez, C., Gomez-Reino, J.J. and Gualillo, O.; Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights; *FEBS Letters*; 2005, 579: 295-301
- Ottonello, L., Gnerre, P., Bertolotto, M., Mancini, M., Dapino, P., Russo, R., Garibotto, G., Barreca, T. and Dallegri, F.; Leptin as a uremic toxin interferes with neutrophil chemotaxis; *J. Am. Soc. Nephrol*; 2004, 15 (9): 2366-72
- Ozata, M., Ozdemir, I.C. and Licinio, J.; Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects; *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 1999, 84: 3686-3695
- Pedrera, C., Lucas, M., Bellido, L. and Lopez-Gonzalez, M.A.; Receptor-independent mechanisms are involved in the priming of neutrophil's oxidase by vasoactive intestinal peptide; *Regulatory Peptides*; 1994, 54: 505-511
- Perianayagam, M.C., Balakrishnan, V.S., Pereira, B.J. and Jaber B.L.; C5a delays apoptosis of human neutrophils via an extracellular signal-regulated kinase and Bad-mediated signalling pathway; *Eur. J. Clin. Invest.*; 2004, 34(1): 50-56.

Bibliografie

- Pozo, D.; VIP- and PACAP-mediated immunomodulation as prospective therapeutic tools; *TRENDS in Molecular Medicine*; 2003, 9 (5): 211-217
- Pozo, D. and Delgado, M.; The many faces of VIP in neuroimmunology: a cytokine rather a neuropeptide; *FASEB. J.*; 2004, 18: 1325-1334
- Raso, G.M., Pacilio, M., Esposito, E., Coppola, A., Di Carlo, R. and Meli, R.; Leptin potentiates IFN- γ -induced expression of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in murine macrophage J774A.1; *Br. J. Pharmacol.*; 2002, 137: 799-804
- Rothe, G. and Valet, G.; Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-Dichlorofluorescein; *J. Leukoc. Biol.*; 1990, 47: 440-448
- Salamone, G., Trevani, A., Martinez, D., Vermeulen, M., Gamberale, R., Fernandez-Calotti, P., Raiden, S. and Giordano, M.; Analysis of the mechanisms involved in the stimulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor- α ; *Immunology*; 2004, 113: 355-362
- Sanchez-Margalet, V., Martin-Romero, C., Santos-Alvarez, J., Goberna, R., Najib, S., and Gonzales-Yanes, C. ; Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells : mechanisms of action ; *Clin. Exp. Immunol.*, 2003, 133: 11-19
- Santos-Alvarez, J., Goberna, R. and Sanchez-Margalet, V.; Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes; *Cell. Immunol.*; 1999, 194 (1): 6-11
- Savill, J.; Apoptosis in resolution of inflammation; *J. Leukoc. Biol.*; 1997a, 61: 375-380
- Savill, J.; Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis; *Br. Med. Bull.*; 1997b, 53 (3): 491-508
- Savill, J. and Haslett, C.; Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation; *Semin. Cell. Biol.*; 1995, 6: 385-393
- Schols, A.M.W.J., Creutzberg, E.C., Buurman, W.A., Campfield, L.A., Saris, W.H.M., and Wouters, E.F.M.; Plasma Leptin Is Related to Proinflammatory Status and Dietary Intake in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease; *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*; 1999, 160 (4): 1220-1226
- Sergejeva, S., Hoshino, H., Yoshihara, S., Kashimoto, K., Lötvall, J. and Lindén, A.; A synthetic VIP peptide analogue inhibits neutrophil recruitment in rats airways in vivo; *Regulatory Peptides*; 2004, 117: 149-154
- Shapiro, H.M.; Membrane potential estimation by flow cytometry; *Methods*; 2000, 21: 271-279

Bibliografie

- Siegmund, B., Sennello, J.A., Jones-Carson, J., Gamboni-Robertson, F., Lehr, H.A., Batra, A., Fedke, I., Zeitz, M. and Fantuzzi, G.; Leptin receptor expression on T lymphocytes modulates chronic intestinal inflammation in mice; *Gut*; 2004, 53: 965-972
- Simon, H.U.; Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation; *Immunological Reviews*; 2003, 193: 101-110
- Sitaraman, S., Liu, X., Charrier, L., GU, L.H., Ziegler, T.R., Gewirtz, A. and Merlin, D.; Colonic leptin: source of a novel proinflammatory cytokine involved in IBD; *FASEB. J.*; 2004, 18 (6): 696-698
- Sonoda, Y., Watanabe, S., Matsumoto, Y., Aizu-Yokota, E. and Kasahara, T.; FAK is the upstream signal protein of the phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt survival pathway in Hydrogen Peroxide-induced apoptosis of a human glioblastoma cell line; *J. Biol. Chem.*; 1999, 274(15): 10566-10570
- Steensma, D., Timm, M. and Witzig, T.; Flow cytometric methods for detection and quantification of apoptosis; *Methods Mol. Med.*; 2003, 85: 323-332
- Takabatake, N., Nakamura, H., Abe, S., Hino, T., Saito, H., Yuki, H., Kato, S. and Tomoike H.; Circulating Leptin in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease; *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*; 1999, 159 (4): 1215-1219
- Taub, D.D., Tsarfaty, G., Lloyd, A.R., Durum, S.K., Longo, D.L. and Murphy, W.J.; Growth hormone promotes human T cell adhesion and migration to both human and murine matrix proteins in vitro and directly promotes xenogeneic engraftment; *J. Clin. Invest.*; 1994, 94(1): 293-300.
- Tennenberg, S.D., Solomkin, J.S.; Activation of neutrophils by cachectin/tumor necrosis factor: priming of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced oxidative responsiveness via receptor mobilization without degranulation; *J. Leukoc. Biol.*; 1990, 47(3): 217-223
- Uygun, A., Kadayifci, A., Yesilova, Z., Erdil, A., Yaman, H., Saka, M., Deveci, M.S., Bagci, S., Gulsen, M., Karaeren, N. and Dagalp, K.; Serum leptin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis; *Am. J. Gastroenterol.* ; 2000, 95(12): 3584-3589
- Van den Berg, J.M., Weyer, S., Weening, J.J., Roos, D. and Kuijpers, T.W.; Divergent effects of tumor necrosis factor alpha on apoptosis of human neutrophils; *J. Leukoc. Biol.*; 2001, 69 (3): 467-473
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutelingsperger, C.; A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V; *J. Immunol. Methods*; 1995, 184: 39-51

Bibliographie

- Vogt, M., Bauer, M.K.A, Ferrari, D. and Schulze-Osthoff, K.; Oxidative stress and hypoxia/reoxygenation trigger CD95 (APO-1/Fas) ligand expression in microglial cells; *FEBS Lett.*; 1998, 429(1): 67-72.
- Ward, R.A., Nakamura, M., and McLeish, K.R.; Priming of the neutrophil respiratory burst involves p38 Mitogen-activated Protein Kinase-dependent exocytosis of flavocytochrome *b*₅₅₈-containing granules, *J. Biol. Chem.*; 2000, 275 (47): 36713-36719
- Whyte, M.K.B., Meagher, L.C., MacDermot, J. and Haslett, C.; Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis; *J. Immunol.*; 1993, 150: 5124-5134.
- Yamaguchi, M., Saeki, S., Yamane, H., Okamura, N. and Ishibashi, S.; Hyperphosphorylated p47-phox lost the ability to activate NADPH Oxidase in guinea pig neutrophils; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* ; 1995, 216(1): 203-208
- Yee, J. and Christou, N.V.; Neutrophil priming by lipopolysaccharide involves heterogeneity in calcium-mediated signal transduction. Studies using fluo-3 and flow cytometry ; *J. Immunol.*; 1993, 150(5): 1988-1997
- Yuo, A., Kitagawa, S., Kasahara, T., Matsushima, K., Saito, M. and Takaku, F.; Stimulation and priming of human neutrophils by interleukin-8: cooperation with tumor necrosis factor and colony-stimulating factors; *Blood*, 1991, 78(10): 2708-2714.
- Zarkesh-Esfahani, H., Pockley, A.G., Wu, Z., Hellewell, P.G., Weetman, A.P. and Ross, R.J.M.; Leptin indirectly activates human neutrophils via induction of TNF α ; *J. Immunol.*; 2004, 172: 1809-1814
- Zarkesh-Esfahani, H., Pockley, G., Metcalfe, R.A., Bidlingmaier, M., Wu, Z., Ajami, A., Weetman, A.P., Strasburger, C.J. and Ross, R.J.M.; High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes; *J. Immunol.*; 2001, 167: 4593-4599