

# THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

## Résumé

---

<b>Orientation :</b>	Santé et Productions animales
<b>Titre de la thèse en français :</b>	Rôles du facteur de transcription STAT5 dans l'homéostasie des neutrophiles et l'inflammation
<b>Titre de la thèse en anglais :</b>	Roles of the STAT5 transcription factor in neutrophil homeostasy and inflammation
<b>Candidat :</b>	Laurence Fiévez
<b>Promoteur :</b>	Prof. Pierre Lekeux
<b>Co-promoteur :</b>	Dr. Fabrice Bureau
<b>Département et Service:</b>	Département des Sciences fonctionnelles, Service de Physiologie
<b>Date de la défense publique :</b>	le 21 juin 2006
<b>Composition du Jury :</b>	<i>Membres extérieurs à la faculté :</i> G. Van Loon, C.M. Marr, D. Soyeur, E. Van Erck <i>Membres internes à la faculté de Médecine vétérinaire :</i> H. Amory, T. Art, K. Mc Entee, P. Lekeux, D. Sertheyn, P. Gustin, C. Cambier, D. Peeters

### DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

Le neutrophile ou leucocyte polymorphonucléaire est la cellule blanche la plus abondante du sang. Ces cellules sont totalement différenciées et possèdent un temps de demi-vie très court (6-7 heures) si elles ne sont pas recrutées au site de l'inflammation. Les neutrophiles sont les premiers leucocytes attirés au site inflammatoire où ils s'accumulent en grand nombre et exercent une variété de réponses cellulaires contre les micro-organismes et les particules étrangères. L'abondance des neutrophiles dans le sang ainsi que l'efficacité de leur recrutement et de leur action anti-microbienne en font la première ligne de défense du système immunitaire inné.

En condition normale, la taille de chaque sous-population hématopoïétique,

y compris celle des neutrophiles, est contrôlée par un équilibre continu entre d'une part, le renouvellement et la différenciation des cellules souches et d'autre part, la mort des cellules par apoptose, un processus physiologique de mort programmée cellulaire. Cependant, en condition de stress ou de granulopoïèse d'urgence, cet équilibre est rompu et la prolifération neutrophilique l'emporte sur l'apoptose qui peut par ailleurs être retardée jusqu'à parfois plus de 48 heures.

Ces deux phénomènes parallèles et complémentaires sont dus principalement à la production augmentée des cytokines GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) et G-CSF. Le GM-CSF et le G-CSF sont connus pour activer les facteurs de transcription STAT3 et STAT5 (signal transducteur et activateur de

transcription) dans les neutrophiles. Si le rôle négatif joué par STAT3 dans la granulopoïèse est bien connu (Lee *et al.*, 2002), le rôle joué par STAT5 reste encore flou. En effet, des études ont montré que la surexpression d'un dominant négatif pour STAT5 dans des cellules de la moelle inhibait la formation de colonies induites par le G-CSF (Ilaria *et al.*, 1999) et d'autres que la quantité de neutrophiles était faible dans le sang de souris sauvages irradiées létalement et reconstituées avec des cellules de souris déficientes pour STAT5 (Snow *et al.*, 2002; Bunting *et al.*, 2002), suggérant un rôle de régulateur positif de STAT5 dans la granulopoïèse. Cependant, rien n'a réellement été démontré.

C'est pourquoi nous avons décidé dans ce travail d'étudier globalement le rôle de STAT5 dans l'homéostasie

des neutrophiles. Ainsi, la première partie de ce travail étudiera le rôle joué par STAT5 dans un cas particulier d'adaptation inflammatoire induite par des expositions répétées à l'ozone. La deuxième étude portera sur l'étude du rôle de STAT5 dans l'apoptose des neutrophiles chez le cheval poussif, un modèle animal d'asthme humain. Le troisième volet de ce travail étudiera le rôle de STAT5 dans l'apoptose des neutrophiles en utilisant comme outil la souris déficiente pour STAT5. Enfin, la dernière partie de ce travail concernera le rôle de STAT5 dans l'homéostasie du neutrophile en situation de repos et de stress en utilisant également la souris déficientes pour STAT5.

## RÉSULTATS

Première étude : réduction de l'accumulation des granulocytes dans le poumon durant l'adaptation à l'ozone. L'hypothèse était que les mécanismes menant à la survie augmentée des granulocytes au site inflammatoire étaient peut-être défectueux dans le processus d'adaptation à l'O<sub>3</sub>.

Des veaux ont été exposés répétitivement à l'O<sub>3</sub> et une mesure de la fonction pulmonaire, des échantillons sanguins ainsi qu'un BAL ont été réalisés sur chaque animal à différents points du protocole. Les résultats montrent que l'inflammation pulmonaire induite par l'O<sub>3</sub> n'est ni associée à une modification d'expression des membres prototypiques de la famille Bcl-2 ni à une augmentation de survie des cellules inflammatoires au site de l'inflammation.

Deux questions: 1) le stress oxydatif exogène est-il capable d'induire directement l'apoptose des granulocytes ? et/ou 2) est-il capable de s'opposer aux effets de cytokines anti-apoptotiques comme le GM-CSF ? Des gra-

nulocytes humains ont été cultivés en présence ou en absence de doses croissantes d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et/ou de GM-CSF. Le traitement à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoque une diminution de la survie des granulocytes de manière dose-dépendante et inhibe de plus, l'effet anti-apoptotique du GM-CSF. L'étude du niveau d'expression de membres types de la famille Bcl-2 et des facteurs de transcription impliqués dans leur expression montre que le stress oxydatif exogène induit l'apoptose des granulocytes en réprimant la transcription de Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub>, même en présence de cytokines anti-apoptotiques.

Deuxième étude : augmentation de la survie des granulocytes pulmonaires dans un modèle animal d'asthme : évidence pour un rôle d'une voie de signallement passant par STAT5 et induite par le GM-CSF.

Deux questions : 1) Les granulocytes issus du BAL des chevaux atteints d'obstruction récurrente des voies respiratoires (ORVR) présentent-ils une apoptose retardée par rapport à ceux isolés du BAL des chevaux sains et 2) STAT5 est-il impliqué dans l'apoptose des granulocytes dans ce modèle animal d'asthme.

L'analyse des résultats concernant l'apoptose des différentes populations de granulocytes montrent que les granulocytes du BAL des chevaux malades présentent une apoptose retardée par rapport aux granulocytes du sang des chevaux malades et sains ainsi que ceux du BAL des chevaux sains. L'ajout d'anticorps dirigés contre le récepteur au GM-CSF dans le milieu de culture des granulocytes isolés du BAL des chevaux malades induit une augmentation de l'apoptose de ces cellules après 48h. De plus, l'ajout de GM-CSF dans le milieu de culture de ces cellules ne permet pas d'in-

duire une augmentation de survie supplémentaire chez les granulocytes du BAL des chevaux malades alors que ce traitement induit une augmentation significative de la survie dans les granulocytes du sang des chevaux sains et malades suggérant que les granulocytes présents au site de l'inflammation sont activés de façon maximale par le GM-CSF.

Le GM-CSF induisant l'activation de STAT5 dans les granulocytes humains, nous avons étudié son niveau d'activation dans les granulocytes du BAL de chevaux malades et du sang de chevaux sains et malades. Le niveau d'activité de STAT5 est faible dans les granulocytes du sang des chevaux sains et malades alors que celui-ci est très élevé dans les granulocytes isolés du BAL des chevaux malades. L'ajout d'anticorps dirigés contre le récepteur au GM-CSF provoque une réduction de l'activité de STAT5 dans les granulocytes du BAL des chevaux malades. Ces résultats montrent que la survie des granulocytes est augmentée dans les poumons des chevaux atteints d'ORVR et suggèrent un rôle important de STAT5 activé par le GM-CSF dans ce délai de l'apoptose.

Troisième étude : Etude du rôle de STAT5 dans le délai de l'apoptose des neutrophiles lors d'une inflammation. Dans cette étude, des souris sauvages et des souris déficientes pour STAT5 ont été nébulisées avec du LPS pendant 2 heures et un BAL a été réalisé avant ainsi qu'un et deux jours après la nébulisation. Les résultats montrent une augmentation significative du nombre de neutrophiles dans le BAL des 2 types de souris. Néanmoins, le nombre de neutrophiles est plus élevé dans le BAL des souris déficientes. Une des hypothèses possible de cette différence pourrait être une augmentation de la survie de ces cellules chez

les souris déficientes. Cependant, l'étude du degré d'apoptose des neutrophiles pendant ce protocole montre que le taux d'apoptose des neutrophiles dans les souris déficientes est, contrairement à ce que l'on pouvait penser, supérieur à celui observé chez les souris sauvages.

Cette étude démontre donc le rôle indispensable de STAT5 dans le délai de l'apoptose des neutrophiles.

Quatrième étude : Etude de l'implication de STAT5 dans l'homéostasie du neutrophile.

Des études ont montré que, bien que STAT5 favorise la survie des cellules progénitrices hématopoïétiques, les souris déficientes en STAT5 développent une neutrophilie. De même, dans l'étude précédente, nous avons montré que les souris déficientes en STAT5 développaient une inflammation plus importante que les souris sauvages alors que le taux d'apoptose de leurs neutrophiles était quant à lui supérieur à celui des neutrophiles des souris sauvages. Dans cette étude, nous avons donc voulu élucider ces phénomènes contradictoires en étudiant le rôle de STAT5 dans l'homéostasie des neutrophiles. Cette étude nous a permis de montrer que les cellules endothéliales du foie (CEF) des souris déficientes en STAT5 sécrétaient de façon autonome de grandes quantités de G-CSF permettant aux progéniteurs de cellules myéloïdes de compenser leur manque de réponse à ce facteur de survie. Cependant, quand on injecte des cytokines pro-inflammatoires, les souris mutantes ne peuvent pas augmenter plus leur production de neutrophiles et sont alors incapables de maintenir l'homéostasie neutrophilique. Dans les souris sauvages, la stimulation inflammatoire induit une dégradation rapide

de STAT5 dans les CEF, la production de G-CSF par les CEF et d'autres types cellulaires et donc la mobilisation et l'expansion soutenues de neutrophiles à la survie augmentée. Cette étude démontre que STAT5 est un facteur ambivalent. Ainsi, dans les cellules de la lignée granulocytaire, il exerce une fonction anti-apoptotique indispensable au maintien de l'homéostasie neutrophilique, spécialement pendant la réponse inflammatoire. Dans les CEF, STAT5 régule négativement la granulopoïèse en réprimant l'expression du G-CSF. Nous montrons que l'enlèvement de ce frein imposé par STAT5 contribue à l'induction de la granulopoïèse d'urgence.

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Des études réalisées, il ressort que le facteur transcriptionnel STAT5 possède un rôle très important dans l'homéostasie du neutrophile. En effet, nous avons démontré que premièrement, il était essentiel pour le délai de l'apoptose de ces cellules. Deuxièmement, nous montrons que ce facteur joue un rôle ambivalent dans la granulopoïèse. En effet, au niveau des granulocytes, il joue un rôle dans la prolifération puisque les cellules progénitrices des souris déficientes en STAT5 prolifèrent moins en réponse au G-CSF que les cellules issues des souris sauvages ; ces cellules prolifèrent quand-même suggérant que STAT5 n'est cependant pas indispensable pour la prolifération des cellules granulocytaires ; nous montrons également de plus qu'il n'est pas requis pour la différenciation granulocytaire puisque les souris déficientes produisent des granulocytes fonctionnelles. Enfin, nous démontrons qu'au niveau des CEF, il joue un rôle de régulateur négatif de la granulopoïèse en répri-

mant la production de G-CSF par ces cellules. Nous montrons que l'enlèvement de ce frein imposé par STAT5 contribue à l'induction de la granulopoïèse d'urgence.

L'apoptose est un mécanisme souvent impliqué dans les maladies inflammatoires telles que la fibrose cystique, la fibrose idiopathique, la pneumonie, les cancers du poumon associés à une neutrophilie ou encore la dermatite atopique. L'ensemble de ce travail nous permet de penser qu'un ciblage spécifique de STAT5 dans les neutrophiles chez les patients atteints de ces maladies pourrait constituer une source de thérapie potentielle. De même, une thérapie génique visant à induire spécifiquement STAT5 dans les CEF pourrait contribuer à la résolution de l'inflammation dans ces maladies. Cette étude montre que cette inhibition et/ou cette induction devrait être absolument spécifique puisque STAT5 joue des rôles diamétralement opposés dans les deux types cellulaires.

## REFERENCES

- BUNTING K.D., BRADLEY H.L., HAWLEY T.S., MORIGGL R., SORRENTINO B.P., IHLE J.N. Reduced lymphomyeloid repopulating activity from adult bone marrow and fetal liver of mice lacking expression of STAT5. *Blood*, 2002, **99**, 479-487.
- ILARIA R.L. JR, HAWLEY R.G., VAN ETEN R.A. Dominant negative mutants implicate STAT5 in myeloid cell proliferation and neutrophil differentiation. *Blood*, 1999, **93**, 4154-4166.
- LEE C.K., RAZ R., GIMENO R., GERTNER., WISTINGHAUSEN B., TAKESHITA K., DEPINHO R.A., LEVY D.E. STAT3 is a negative regulator of granulopoiesis but is not required for G-CSF-dependent differentiation. *Immunity*, 2002, **17**, 63-72.
- SNOW J.W., ABRAHAM N., MA M.C., ABBEY N.W., HERNDIER B., GOLDSMITH M.A. STAT5 promotes multilineage hematolymphoid development in vivo through effects on early hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 2002, **99**, 95-101.
- PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE**
- FIÉVEZ L., KIRSCHVINK N., DOGNÉ S., JASPAR F., MERVILLE M.-P., BOURS V., LEKEUX P., BUREAU F. Impaired accumulation of granulocytes in the lung during ozone adaptation. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, **31**, 633-641.
- TURLEJ R., FIÉVEZ L. (co-premier auteur), SANDERSEN C., DOGNÉ S., KIRSCHVINK N., LEKEUX P., BUREAU F. Enhanced survival of lung granulocytes in an animal model of asthma : evidence of a role for GM-CSF-activated STAT5 signalling pathway. *Thorax*, 2001, **56**, 696-702.
- FIÉVEZ L., DESMET C., HENRY E., HEGENBARTH S., GARZÉ V., PAJAK B., BEX F., MÉLOTTE D., BOUTET P., GILLET L., VANDERPLASSCHEN A., KNOLLE P.A., MOSER M., LEO O., LEKEUX P., BUREAU F. STAT5 is an ambivalent regulator of neutrophil homeostasis. Soumis dans *Immunity*.
- FIÉVEZ L., DESMET C., MÉLOTTE D., LEKEUX P., BUREAU F. STAT5 is essential for neutrophil apoptosis delay during inflammation. En préparation.
- FIÉVEZ L., SEUMOIS G., LEKEUX P., BUREAU F. L'apoptose du neutrophile. *Ann. Méd. Vét.*, 2005, **149**, 10-19.

## REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée grâce aux financements octroyés par le Ministère de la Région Wallonne, l'Union Chimique Belge Pharma et le Fonds pour la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture.