

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

Orientation :	Médecine vétérinaire
Titre de la thèse en français :	Identification de nouveaux mécanismes régulateurs de l'apoptose des granulocytes
Titre de la thèse en anglais :	Identification of new regulatory mechanisms of granulocyte apoptosis
Candidat :	Grégory SEUMOIS
Promoteur :	Professeur Pierre LEKEUX
Co-promoteur :	Professeur Fabrice BUREAU
Département et Service :	Département des sciences fonctionnelles, Service de Physiologie, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique
Date de la défense publique :	20 juin 2007
Composition du Jury :	Antoine N., Bours V., Bureau F., Burvenich C., Clercx C., Desmecht D., Godeau J.-M., Grobet L., Lekeux P., Louis R., Vanderplasschen A.

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

Les neutrophiles et éosinophiles sont les deux principaux types de leucocytes polymorphonucléaires ou granulocytes. Cellules effectrices de l'immunité innée complètement différenciées au niveau de la moelle osseuse, les granulocytes se retrouvent dans la circulation depuis laquelle ils sont soit recrutés par chimiotactisme vers les tissus enflammés, soit meurent spontanément au bout de quelques heures par un processus de mort cellulaire programmée appelé apoptose (Giembycz *et al.*, 1999 ; Fiévez *et al.*, 2005). Le développement d'un processus inflammatoire est caractérisé par une accumulation de granulocytes au site de l'inflammation. Une production accrue de facteurs de survie, entraînant un délai de l'apoptose des

granulocytes, est en partie responsable de cette accumulation (Bousquet *et al.*, 1990 ; Brach *et al.*, 1992 ; Lee *et al.*, 1993). Par contre, la diminution de la concentration en cytokines comme elle survient lors de la phase de résolution de l'inflammation, ou l'expression de médiateurs anti-inflammatoires, accélère l'apoptose des granulocytes (Savill, 1997). En outre, il a été montré que l'induction thérapeutique de la mort des granulocytes réduit l'inflammation. La régulation de la vie des granulocytes par les mécanismes de l'apoptose apparaît donc comme un mécanisme majeur dans le maintien d'un équilibre judicieux reliant leur fonction de cellules effectrices dans la défense de l'organisme et le renouvellement sécurisé de ces cellules potentiellement dangereuses pour l'organisme. Cependant, les mécanismes

moléculaires exacts impliqués dans la régulation du processus d'apoptose des granulocytes restent à découvrir.

L'objectif général de mes travaux de doctorat a été d'identifier de nouveaux mécanismes régulateurs de l'apoptose des granulocytes. Mes questions ont été : (i) les céramides, seconds messagers impliqués dans la régulation de la survie cellulaire, interviennent-ils dans le contrôle de l'apoptose spontanée des neutrophiles ? et (ii) par quels mécanismes moléculaires la stimulation de CD40, exprimé à la surface des éosinophiles au site de l'inflammation, prolonge-t-elle la durée de vie de ces cellules ?

RÉSULTATS

Les céramides sont des seconds messagers impliqués dans plusieurs pro-

cessus biologiques dont l'apoptose (Hannun, 1996). En mesurant par spectrométrie de masse (Fillet *et al.* 2002), l'évolution au cours du temps du taux intracellulaire des différents types de céramides, nous avons observé que les taux des céramides de type C-16 et C-24 augmentent spontanément à mesure que les neutrophiles, placés en culture, vieillissent. Cette accumulation précède l'entrée des cellules en apoptose ainsi que l'activation des enzymes responsables de la dégradation protéolytique des composants cellulaires, les caspases-8, -9 et -3. En traitant les granulocytes avec des inhibiteurs spécifiques des différentes voies de biosynthèse des céramides, nous avons montré que les céramides sont générés dans les neutrophiles par la voie *de novo* à partir de la condensation de l'acide aminé sérine et d'un groupement acyle, dérivé d'un acide gras, couplé au coenzyme A. Par contre, nous avons montré que l'autre voie majeure de biosynthèse des céramides appelée «voie de recyclage de la sphingomyéline» n'est pas impliquée dans l'accumulation des céramides C-16 et C-24. Grâce à l'utilisation de molécules pharmacologiques, nous avons montré que l'augmentation ou la diminution des taux endogènes de C-16 et C-24 augmente et diminue, respectivement, les taux d'apoptose et d'activation des caspases-8, -9 et -3 dans les neutrophiles. Ces résultats ont été confirmés en ajoutant, au milieu de culture, des céramides C-16 et/ou C-24 exogènes. En effet, ce traitement augmente significativement le taux d'apoptose des neutrophiles. Enfin, nous avons traité des neutrophiles avec du GM-CSF (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor), une cytokine connue pour son effet anti-apoptotique sur les granulocytes. Le GM-CSF bloquait l'accu-

mulation des céramides C-16 et C-24 dans les neutrophiles. Au contraire, lorsque des neutrophiles étaient traités avec le ligand de Fas, une molécule pro-apoptotique, les taux endogènes des céramides C-16 et C-24 n'étaient pas modifiés.

L'interaction de CD40 avec son ligand (CD40L) joue un rôle co-stimulateur entre différents types de cellules immunes et induit un signal d'activation, de survie ou de prolifération (Grewal et Flavell, 1998). Les effets de cette stimulation sont multiples et fonction des types cellulaires concernés. Ohkawara *et al.* (1996) ont montré que CD40 est induit à la surface des éosinophiles et que son induction prolonge la durée de vie des éosinophiles. Dans un premier temps, nous avons confirmé les résultats d'Ohkawara *et al.* (1996) en mesurant une augmentation significative de l'expression du gène codant pour CD40, ainsi qu'une augmentation de l'expression membranaire de CD40, lorsque des éosinophiles isolés à partir de sang d'individus sains ou de patients asthmatiques étaient cultivés pendant 48 heures. Nous n'avons pas détecté d'expression de CD40 dans les neutrophiles. Cependant, et contrairement aux résultats d'Ohkawara *et al.* (1996), nous avons montré que l'expression de CD40 à la surface des éosinophiles est spontanée et n'est pas influencée par un traitement avec des médiateurs pro-inflammatoires tels que le GM-CSF, l'IFN γ ou les complexes immuns d'immunoglobulines A. Nous montrons également que les éosinophiles expriment constitutivement CD40L à leur surface. La mesure de l'expression de CD40 et CD40L à la surface des éosinophiles a été réalisée par des expériences d'immunodétection par cytométrie en flux et par western blot. Après 48 h de culture, la stimu-

lation de CD40 par une forme soluble recombinante humaine de CD40L ou par la fixation d'un anticorps agoniste réduisait de manière statistiquement significative le taux d'apoptose des éosinophiles. Nous avons également montré, par RT-PCR et immunodétection, que l'engagement de CD40 induit l'expression génique et protéique de c-IAP2, membre anti-apoptotique de la famille des protéines inhibitrices de l'apoptose. Nous avons confirmé ce résultat en supprimant l'induction de l'expression de c-IAP2 par la transfection d'éosinophiles, stimulés par CD40L après 48 h de culture, avec de courts fragments oligodeoxynucléotidiques de séquence inverse (antisens) à la séquence de l'ARNm codant pour c-IAP2. Ce «knockdown» de c-IAP2 a aboli, de manière statistiquement significative, l'augmentation de survie consécutive à l'engagement de CD40 dans les éosinophiles, démontrant le rôle majeur de c-IAP2 dans la transmission de ce signal anti-apoptotique. Enfin, *ex vivo*, nous avons montré par immunodétection de type western blot, qu'il existe une forte corrélation entre le pourcentage d'éosinophiles et le niveau d'expression protéique de c-IAP2 et CD40 dans les fractions cellulaires de sputums induits chez des patients asthmatiques. Ce résultat suggère que ce mécanisme joue un rôle dans l'inflammation allergique.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Afin d'éviter la perte de leur contenu cytoplasmique cytotoxique potentiellement dangereux pour l'organisme, le taux de renouvellement des granulocytes est rapide. Très tôt après leur libération dans la circulation, les granulocytes entament spontanément un processus physiologique de mort ou apoptose. Les cellules montrant

les signes précoces de l'apoptose sont rapidement éliminées de la circulation par les macrophages spléniques. S'ils ne sont pas activés et recrutés vers un site inflammatoire, la durée de demi-vie des granulocytes dans le sang ne dépasse pas les 12 heures (Savill *et al.*, 1989). Bien que jouant un rôle central dans le contrôle du nombre des granulocytes dans l'organisme, les mécanismes moléculaires de l'apoptose des granulocytes restent élusifs. Actuellement, l'apoptose spontanée des neutrophiles est essentiellement expliquée par la diminution progressive de la protéine anti-apoptotique de la famille Bcl-2, Mcl-1. Plus récemment, Zhu et collaborateurs (2006) ont montré que la désactivation de la voie des protéines PI3K/Akt joue un rôle dans l'apoptose des neutrophiles. Nous apportons une nouvelle alternative, en démontrant le rôle des céramides de types C-16 et C-24 dans l'activation des caspases-8,-9 et-3 et l'induction de l'apoptose des neutrophiles. Comme c'est le cas dans d'autres types cellulaires, nous montrons que ces céramides s'accumulent au cours du temps via la voie de synthèse *de novo*. Dans d'autres types cellulaires, cette accumulation a lieu suite à un stimulus par différents facteurs endogènes (comme le TNF- α , des lymphotoxines, interactions cellulaires,...) ou exogènes (comme des drogues cytotoxiques telles que la daunorubicine, l'étoposide,...). Dans les neutrophiles, cet événement est spontané. Des investigations supplémentaires sont nécessaires notamment pour identifier les signaux initiateurs de cette accumulation de céramides.

Par ailleurs, au niveau du site inflammatoire, la durée de vie des neutrophiles est augmentée par la présence de différents médiateurs dont la cyto-

kine pro-inflammatoire GM-CSF (Moulding *et al.*, 1998). Nous montrons que cette cytokine abroge l'accumulation des céramides C-16 et C-24 et prolonge la durée de vie des neutrophiles. Les mécanismes moléculaires par lesquels le GM-CSF agit dans les neutrophiles sont multiples et non encore complètement élucidés. Le GM-CSF impliquerait notamment l'activation de protéine tyrosine kinase, de *mitogen-activated protein kinases*, des Janus kinase/STAT et PI3-Kinase. Ici encore, nous apportons une nouvelle explication à l'effet anti-apoptotique du GM-CSF sur l'apoptose des neutrophiles. De plus amples informations sont nécessaires pour mieux comprendre l'importance de notre découverte parmi les événements moléculaires associés à l'effet anti-apoptotique du GM-CSF sur les neutrophiles. Par contre, l'absence de modification des taux de céramides C-16 et C-24 par traitement avec FasL, une molécule connue pour induire l'apoptose des neutrophiles, suggère que les mécanismes de mort induite par FasL sont indépendants de l'accumulation de céramides.

Les proportions relatives en neutrophiles ou en éosinophiles au niveau des sites inflammatoires sont fonction du type d'inflammation. Ainsi, on distingue des inflammations neutrophiliques telles que la bronchopneumopathie chronique obstructive et des inflammations à éosinophiles souvent caractéristiques des inflammations allergiques telles que l'asthme ou la rhinite allergique (Louis *et al.*, 2000). Comme les neutrophiles et les éosinophiles sont différemment sensibilisés en fonction du type d'inflammation, ils répondent également différemment aux différents facteurs régulateurs de leur durée de vie tant endo-

gènes (comme le TNF- α , l'IL-5...) qu'exogènes (les glucocorticoïdes, la cyclosporine A). D'un point de vue thérapeutique, il semble donc intéressant de pouvoir identifier des cibles différentielles pour chacun des types de granulocytes. Dans notre seconde étude, nous identifions une nouvelle voie régulatrice de l'apoptose spécifique des éosinophiles, à savoir la voie CD40/CD40L inductrice de l'expression de la protéine inhibitrice de l'apoptose c-IAP2 (Yang et Li, 2000), et apportons les évidences de l'existence d'un mécanisme similaire *in vivo* en particulier dans l'inflammation allergique. Des études complémentaires sont nécessaires, notamment pour identifier les causes de l'induction de l'expression de CD40 à la surface des éosinophiles.

L'interaction CD40/CD40L est impliquée dans plusieurs événements participant au développement et au maintien de l'inflammation allergique, telle que l'activation des cellules dendritiques et l'induction de la commutation isotypique vers des immunoglobulines E par les lymphocytes B. CD40L est exprimé par différentes cellules immunes dont les lymphocytes T. Les lymphocytes T auxiliaires de type 2 sont actuellement reconnus comme les chefs d'orchestre de la réaction allergique (Holgate, 1999). Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de l'interaction CD40L exprimé par les lymphocytes T avec le CD40 exprimés par les éosinophiles sur la survie ou l'activation de ces dernières et/ou inversement. Enfin, l'inflammation éosinophilique a été étudiée par plusieurs équipes dans des modèles de souris déficientes pour les gènes codants pour CD40 et CD40L (Hogan *et al.*, 1997 ; Lei *et al.*, 1998) et à la lumière de nos résultats *in vitro* et *ex vivo*, ces résultats soutiennent

désormais un modèle où l'interaction CD40/CD40L n'intervient pas au début du développement de l'éosinophilie provoquée après l'exposition à un allergène, mais est plutôt requise pour le maintien de cette inflammation. Dès lors, CD40, CD40L et c-IAP2 peuvent être considérés comme des cibles pharmacologiques clés en vue de contrôler plus efficacement l'inflammation allergique.

En conclusion, ces travaux de doctorat ont permis d'identifier de nou-

veaux signaux régulateurs de l'apoptose des granulocytes. La première étude a démontré que les céramides de type C-16 et C-24 générés via la voie *de novo* participent à l'apoptose spontanée des neutrophiles en agissant en amont des caspases-8, -9 et -3. D'autre part, cette étude suggère que le GM-CSF exerce son effet anti-apoptotique en partie via cette accumulation de céramides. La seconde étude a démontré un mécanisme spécifique dans la régulation de l'apoptose des

éosinophiles. D'une part, les éosinophiles expriment spontanément CD40 à leur surface et, d'autre part, la stimulation de CD40 s'oppose à la mort des éosinophiles via l'induction de c-IAP2. Dans cette deuxième étude, nous avons également montré que ce mécanisme pouvait être impliqué *in vivo*, en particulier dans l'inflammation allergique des voies respiratoires.

REFERENCES

- BOUSQUET J., CHANEZ P., LACOSTE J.Y., BARNEON G., GHAVANIAN N., ENANDER I., VENGE P., AHLSTEDT S., SIMONY-LAFONTAINE J., GODARD P. Eosinophilic inflammation in asthma. *N. Engl. J. Med.*, 1990, **323**, 1033-1039.
- BRACH M.A., DEVOS S., GRUSS H.J., HERRMANN F. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood*, 1992, **80**, 2920-2924.
- FILÉVEZ L., SEUMOIS G., LEKEUX P., BUREAU F. L'apoptose du neutrophile. *Ann. Méd. Vét.*, 2005, **149**, 10-19.
- GIEMBYCZ M.A., LINDSAY M.A. Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacol. Rev.*, 1999, **51**, 213-340.
- FILLET M., VAN HEUGEN J.C., SERVAIS A.C., DE GRAEVE J., CROMMEN J. Separation, identification and quantitation of ceramides in human cancer cells by liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 2002, **949**, 225-233.
- GREWAL I.S., FLAVELL R.A. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 1998, **16**, 111-135.
- HANNUN Y.A. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science*, 1996, **274**, 1855-1859.
- HOGAN S.P., MOULD A., KIKUTANI H., RAMSAY A.J., FOSTER P.S. Aeroallergen-induced eosinophilic inflammation, lung damage, and airways hyperreactivity in mice can occur independently of IL-4 and allergen-specific immunoglobulins. *J. Clin. Invest.*, 1997, **99**, 1329-1339.
- HOLGATE S.T. The epidemic of allergy and asthma. *Nature*, 1999, **402**, B2-B4.
- LEE A., WHYTE M.K., HASLETT C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J. Leukoc. Biol.*, 1993, **54**, 283-288.
- LEI X.F., OHKAWARA Y., STAMPFLI M.R., MASTRUZZO C., MARR R.A., SNIDER D., XING Z., JORDANA M. Disruption of antigen-induced inflammatory responses in CD40 ligand knockout mice. *J. Clin. Invest.*, 1998, **101**, 1342-1353.
- LOUIS R., LAU L.C., BRON A.O., ROLDAAN A.C., RADERMECKER M., DJUKANOVIC R. The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000, **161**, 9-16.
- MOULDING D.A., QUAYLE J.A., HART C.A., EDWARDS S.W. Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. *Blood*, 1998, **92**, 2495-2502.
- OHKAWARA Y., LIM K.G., XING Z., GLIBETIC M., NAKANO K., DOLOVICH J., CROITORU K., WELLER P.F., JORDANA M. CD40 expression by human peripheral blood eosinophils. *J. Clin. Invest.*, 1996, **97**, 1761-1766.
- SAVILL J.S., WYLLIE A.H., HENSON J.E., WALPORT M.J., HENSON P.M., HASLETT C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.*, 1989, **83**, 865-875.

SAVILL J. Apoptosis in resolution of inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, 1997, **61**, 375-380.

YANG Y.L., LI X.M. The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell. Res.*, 2000, **10**, 169-177.

ZHU D., HATTORI H., JO H., JIA Y., SUBRAMANIAN K.K., LOISON F., YOUJ., LEY., HONCZARENKO M., SILBERSTEIN L., LUO H.R. Deactivation of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate/Akt signaling mediates neutrophil spontaneous death. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 2006, **103**, 14836-14841.

PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE

BUREAU F.*, SEUMOIS G.*, JASPAR F., VANDERPLASSCHEN A., DETRY B., PASTORET P-P., LOUIS R., LEKEUX P. CD40 engagement enhances eosinophil survival through induction of cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression: Possible involvement in allergic inflammation (* co-premiers auteurs) *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2002, **110**, 443-449.

SEUMOIS G., FILLET M., GILLET L., FACINETTO., DESMET C., FRANCOIS C., DEWALS B.,

OURY C., VANDERPLASSCHEN A., LEKEUX P., BUREAU F. *De novo* C₁₆- and C₂₄-ceramide generation contributes to spontaneous neutrophil apoptosis. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, **81**, 1477-1486.

SEUMOIS G., FIEVEZ L., LOUIS R., LEKEUX P., BUREAU F. L'apoptose de l'éosinophile : cible d'intérêt thérapeutique dans le traitement de l'inflammation allergique. *Revue Med. Liège*, Soumis pour publication.

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été partiellement financée par l'Union Chimique Belge Pharma (UCB Pharma, Belgium).