

Granules azurophiles	Granules spécifiques	Granules tertiaires	Vésicules de sécrétion
Membrane	Membrane	Membrane	Membrane
CD63 CD68 V-type H ⁺ -ATPase	CD11b Antigènes CD15 CD66 CD67 Cytochrome b Récepteur au fMLP (f-Met-Leu-Pro) Fibronectine-R Sous-unité α de protéine G Laminine-R Antigène NB 1 Protéine 19 kD Protéine 155 kD Rap1, Rap2 SCAMP Thrombospondine-R TNF-R Activateur de plasminogène-R de type urokinase VAMP-2 Vibronectine-R	CD11b Cytochrome b Enzyme déacétylant le diacylglycérol Récepteur au fMLP SCAMP Activateur de plasminogène-R de type urokinase VAMP-2 (<i>Vesicle-associated membrane protein-2</i>) V-type H ⁺ -ATPase	Phosphatase alcaline Récepteur de C3b Cytochrome b CD11b CD14 CD16 Récepteur au fMLP SCAMP (<i>Secretory carrier membrane protein</i>) Activateur de plasminogène-R de type urokinase V-type H ⁺ -ATPase VAMP-2 CD10 CD13 CD45 Récepteur de C1q DAF (<i>Decay-accelerating factor</i>)
Matrice		Matrice	Matrice
Glycerophosphatase- β acide Mucopolysaccharide acide α 1-antitrypsine α -mannosidase Azurocidine/CAP37/ Protéine liant l'héparine Protéine BPI Glycerophosphatase- β Glucuronidase- β Cathepsines Défensines Elastase Lysozyme Myéloperoxydase N-acétyl- β -glucosaminidase Protéinase-3 Sialidase Protéines ubiquitines	Matrice Microglobuline- β_2 Collagénase Gélatinase hCAP-18 Histaminase Héparanase Lactoferrine Lysozyme NGAL (<i>Neutrophil gelatinase associated lipocalin</i>) Activateur de plasminogène de type urokinase Sialidase SGP 28 (<i>Secondary granule protein</i>) Protéine liant la vitamine B12	Acétyltransferase Microglobuline- β_2 Gélatinase Lysozyme	Protéines plasmatiques (y compris la tetranectine)
Tableau II. Liste non exhaustive du contenu en protéines des granules et des vésicules de sécrétion des neutrophiles humains (d'après Borregaard et Cowland, 1997 ; Fiévez, 2006).			

les molécules oxydantes, ces antibiotiques endogènes peuvent être délivrés directement aux microbes séquestrés dans les phagolysosomes mais peuvent être également sécrétés à l'extérieur de la cellule pour inactiver les microbes restés dans le milieu extracellulaire. Dans les phagolysosomes, l'activité de certains canaux à ions acidifie le milieu interne du phagolysosome et active consécutivement de nombreux enzymes lytiques.

Outre leur rôle de cellules phagocytaires, les neutrophiles sont capables, une fois stimulés et en fonction du type de pathogène, de "dégranuler", c'est-à-dire de libérer le contenu de leurs granules dans le milieu extracellulaire. Cette dégranulation se déroule dans un ordre précis : d'abord les vésicules de sécrétion, puis les granules tertiaires et les granules spécifiques et enfin les granules azurophiles. Le tableau II répertorie de façon non exhaustive le contenu en protéines des granules des neutrophiles humains. Les granules tertiaires renferment de la gélatinase qui clive spécifiquement les molécules de collagène de type IV et V (Weiss et Peppin, 1986 ; Shapiro, 1998). Les granules spécifiques contiennent des substances anti-microbiennes principalement destinées à une action extracellulaire:

- La cathelicidine hCAP (*Human cathelicidin antimicrobial protein*)-18, stockée sous forme inactive, est libérée et activée par l'élastase et agit contre les bactéries Gram positives et négatives (Turner *et al.*, 1998). Elle peut agir en synergie avec une autre protéine des granules spécifiques, la lactoferrine, qui possède également sa propre activité anti-microbienne (Zanetti *et al.*, 1997).
- La phospholipase A2 et des lysozymes également impliqués dans l'action anti-microbienne (Harwig *et al.*, 1995 ; Weinrauch *et al.*, 1996).
- Les métalloprotéases de matrice (MMP) connues pour leurs rôles dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Les neutrophiles contiennent notamment de la collagénase (MMP-8) qui dégrade spécifiquement le collagène de type I.

Enfin, les granules azurophiles renferment entre-autre :

- La protéine BPI (*Bactericidal/permeability increasing protein*), l'un des participants les plus actifs contre les infections bactériennes à bactéries Gram négatives. La BPI est également exprimée au niveau de la membrane cytoplasmique du neutrophile (Weersink *et al.*, 1993 ; Elsbach, 1998). Comme son nom l'indique, la liaison de cette protéine aux LPS bactériens cause une augmentation de la perméabilité de la membrane externe des bactéries ainsi que l'hydrolyse des phospholipases bactériennes.
- Les défensines sont également des composants majeurs des granules azurophiles et rendent la membrane des cellules cibles plus perméables (Ganz *et al.*, 1985 ; 1990).
- La cathepsine G, l'élastase ou la protéinase-3 (PR-3) (Salvesen *et al.*, 1987 ; Takahashi *et al.*, 1988 ; Bories *et al.*, 1989) qui sont des protéases. Les activités anti-microbiennes de la cathepsine G et de la PR-3 sont très élevées ; elles sont actives contre les bactéries Gram positives, les bactéries Gram négatives, les levures et les champignons. Le rôle anti-microbien de l'élastase a été découvert plus récemment. Cet enzyme dégraderait une protéine de la membrane externe hautement conservée chez les bactéries Gram négatives. En effet, une étude a montré que les souris déficientes en élastase présentaient une défense défectueuse contre les infections à bactéries Gram négatives mais pas contre les bactéries Gram positives (Belaouaj *et al.*, 1998).

FRO	PROPRIETES
Superoxyde (O₂^{•-})	Oxydant et réducteur léger avec une activité biologique limitée ; réduit des complexes ferriques pour permettre la production de radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton ; inactive les protéines Fe/S et relargue du fer ; perméabilité membranaire faible.
Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)	Agent oxydant ; réagit lentement avec les agents réducteurs comme les thiols, réagit avec le fer réduit et les sels de cuivre pour générer des radicaux hydroxyles ; réagit avec les protéines à hème et les peroxydases pour initier les réactions des radicaux et la peroxydation lipidique ; bonne perméabilité membranaire.
Radical hydroxyde (•OH)	Extrêmement réactif avec la plupart des molécules biologiques ; provoque des modifications de l'ADN et des ruptures de brins, l'inactivation d'enzymes et la peroxydation des lipides ; étendue d'action restreinte ; génère des radicaux secondaires.
Singlet d'oxygène (¹O₂)	Etat électroniquement excité de l'oxygène ; réagit avec plusieurs molécules biologiques, comme les lipides membranaires pour initier leur peroxydation.
Acide hypochloreux (HOCl)	Oxydant non radicalaire puissant d'un grand nombre de composés biologiques, mais plus sélectif que le radical hydroxyde ; préfère les substrats thiols et thioéthers ; convertit les amines en chloramines ; chlorine les phénols et les liaisons insaturées ; oxyde les centres ferriques ; bonne perméabilité membranaire.
Chloramines (R-NHCl)	Oxydants plus légers et de longévité plus grande que HOCl ; réagissent avec les thiols, les thioéthers, les centres ferriques ; toxicité variable en fonction de la polarité et de la perméabilité membranaire.
Oxyde nitrique (NO•)	Réagit très rapidement avec le peroxyde pour donner le peroxynitrite ; réaction avec l'oxygène favorisée à haute concentration en oxygène ; forme des complexes avec les protéines à hème ; inactive les centres FE/S ; forme des nitrosothiols.
Peroxynitrite (ONOO•)	Oxydant puissant instable de faible longévité ; propriétés similaires au radical hydroxyle ; hydroxyle et nitifie des composés aromatiques ; réagit rapidement avec les thiols ; se décompose en nitrate ; interagit avec le bicarbonate pour modifier la réactivité.
Tableau III. Liste non exhaustive et principales propriétés de différentes FRO (d'après Hampton et al., 1998a).	

1.2.1.1.3. Mécanismes cytotoxiques dépendant de l'oxygène

Conjointement aux mécanismes non oxydatifs, interviennent des mécanismes oxydatifs qui participent au processus de flambée oxydative. La plupart, si pas la totalité de l'oxygène consommé est converti en composés oxygénés hautement réactifs et toxiques tant pour les organismes ingérés que pour certaines cibles extracellulaires. Le tableau III répertorie de façon non exhaustive les principales FRO et leurs propriétés fonctionnelles. Ces mécanismes impliquent tout d'abord l'assemblage et l'activation du complexe enzymatique de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase au niveau de la membrane plasmique (action extracellulaire) et de la membrane phagolysosomiale (action intracellulaire). Suite à la stimulation de la cellule, les composants cytosoliques de la NADPH oxydase, à savoir $p40^{phox}$, $p47^{phox}$ et $p67^{phox}$ migrent vers la membrane plasmique et phagolysosomiale et se combinent avec un élément membranaire, le cytochrome b_{558} , pour donner la forme active de la NADPH oxydase (DeLeo et Quinn, 1996). Ce complexe enzymatique est capable de transférer un électron à une molécule d'oxygène (O_2) présent dans le milieu pour former un anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) (Babior, 1984). Cet anion superoxyde est en équilibre constant avec le radical perhydroxyle (HO_2^{\cdot}) qui est beaucoup plus oxydant que lui. L'anion superoxyde peut être alors transformé soit spontanément, soit par la superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Nathan, 1987). H_2O_2 peut à son tour être réduit en O_2 et en eau par la catalase. Le peroxyde d'hydrogène est transformé par la myéloperoxydase (MPO), présente dans les granules azurophiles, en acide hypochloreux (HOCl), un composé très toxique pour la plupart des micro-organismes mais de courte durée de vie. Il peut cependant réagir avec des amines primaires ou secondaires et former des N-chloramines plus stables (Rotrosen, 1992). En plus de son rôle dans la destruction des bactéries, HOCl provoque également des dommages tissulaires chez l'hôte. Il peut rapidement inactiver l' α 1-antiprotéinase qui est l'inhibiteur principal des sérines protéases mais également activer la collagénase et la gélatinase (Weiss *et al.*, 1985). HOCl peut réagir avec l'anion superoxyde pour former un radical hydroxyde ($\cdot OH$) qui est hautement réactif (Candeias *et al.*, 1993). Des dérivés azotés peuvent être également générés tels que des oxydes nitriques. Cependant, les résultats des différentes études portant sur la production d'oxyde nitrique (ou monoxyde d'azote) (NO) ou de peroxyde nitrique ($ONOO^{\cdot}$) par les neutrophiles sont à ce jour encore contradictoires et généralement négatifs mais cette voie nécessite d'être plus amplement étudiée (Schmidt *et al.*, 1989 ; Carreras *et al.*, 1994 ; Yan *et al.*, 1994). La figure 2 (voir page suivante) schématise les réactions enzymatiques, ou non, génératrices de FRO.

1.2.1.2. Fonction cytotoxique de l'éosinophile

Les éosinophiles sont capables de phagocyter des particules reconnues comme étant pathogéniques. Cependant, les cibles pathogènes reconnues par les éosinophiles sont de taille beaucoup plus grande que celle du micromètre (exemple : larves de parasites). Dès lors, leur activité phagocytaire est limitée et les éosinophiles libèrent directement le contenu de leurs granules dans le milieu extérieur. Les immunoglobulines jouent un rôle majeur dans l'activation des éosinophiles, notamment dans leur action anti-parasitaire. Des récepteurs aux IgA, -M, -D, -E, et -G ont été identifiés à la surface des éosinophiles (Capron *et al.*, 1988 ; Wardlaw *et al.*, 1995 ; Daeron, 1997 ; Kita et Gleich, 1997). Comme le neutrophile, l'éosinophile exerce son activité cytotoxique via des mécanismes non-oxydatifs et oxydatifs.

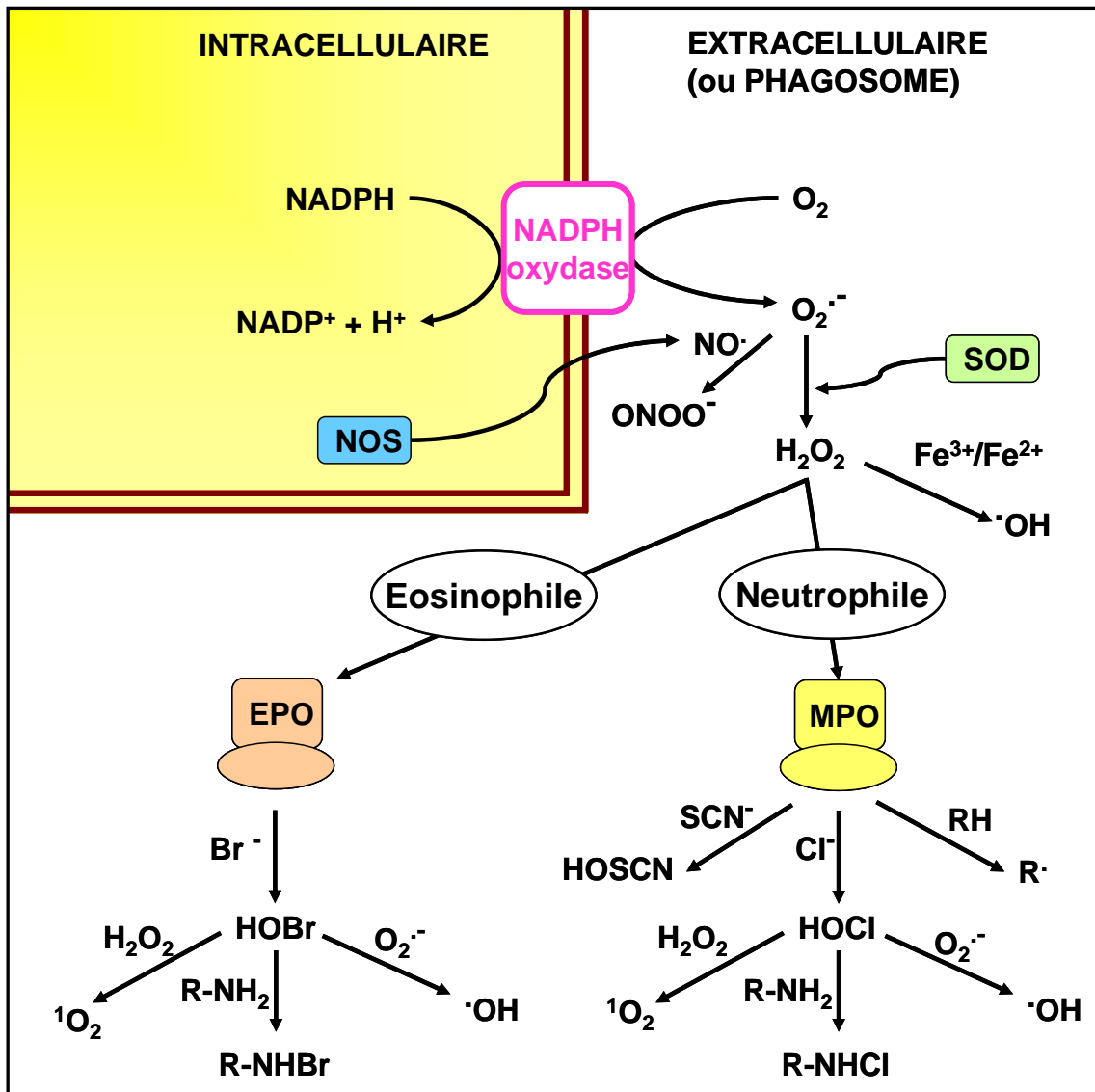


Figure 2. Les mécanismes oxydatifs des neutrophiles et des éosinophiles.

Schéma non exhaustif des réactions pouvant générer des molécules oxydantes dans les neutrophiles et les éosinophiles activés. NOS (*Nitric oxide synthase*), SOD (*Superoxyde dismutase*) (d'après Hampton *et al.*, 1998a ; Giembycz et Lindsay, 1999 ; Fiévez, 2006).

1.2.1.2.1. Mécanismes cytotoxiques indépendants de l'oxygène

Suite à leur activation par interaction de surface, les éosinophiles vont libérer le contenu de leurs granules. En fonction du stimulus et/ou de son intensité, on distingue 3 types de sécrétion du contenu des granules : par dégranulation *piecemeal* (sécrétion sélective de granules), par exocytose (fusion groupée des granules avec la membrane cellulaire) ou par cytolysse (rupture de la membrane cellulaire). Le tableau IV (voir page suivante) répertorie de façon non exhaustive le contenu en protéines des granules de l'éosinophile humain.

Parmi les molécules libérées, certaines sont spécifiques des éosinophiles :

- La MBP (*Major basic protein*), contenue dans les granules spécifiques. Cette protéine est riche en résidus lysine et arginine et possède un domaine hydrophobe (Kroegel *et al.*, 1987 ; Barker *et al.*, 1988 ; Wasmoen *et al.*, 1988). Leurs propriétés physico-chimiques sont semblables à celles des perforines des cellules NK (*Natural killer*), de certaines toxines animales comme la melittine ou le mastoparan (Perianin et Snyderman, 1989 ; Kroegel *et al.*, 1990). Elles s'insèrent dans la membrane cellulaire, s'oligomérisent, forment des canaux membranaires, déstabilisent l'équilibre électrostatique, et perturbent l'intégrité membranaire (Abu-Ghazaleh *et al.*, 1992). Il existe une association entre le taux de MBP au niveau des bronches, l'éosinophilie et la sévérité de l'asthme, ce qui suggère un rôle pour cette protéine dans la pathophysiologie de cette maladie (Busse et Sedgwick, 1991 ; Kroegel *et al.*, 1994a ; 1994b ; Streck et Leff, 1997 ; Busse et Lemanske, 2001).
- L'ECP (*Eosinophil cationic protein*) et l'EDN (*Eosinophil derived neurotoxin*) sont deux protéines à activité ribonucléasique faisant partie de la famille des ribonucléases A. Elles partagent une homologie de séquence de 88 % (Tai *et al.*, 1984 ; Rosenberg *et al.*, 1989 ; Sorrentino *et al.*, 1992 ; Venge, 1993 ; Watanabe *et al.*, 1995 ; Mosimann *et al.*, 1996).
- Les cristaux de Charcot-Leyden, présents dans les granules primaires, sont constitués suite à la cristallisation d'une protéine à activité lysophospholipase. Bien que représentant 10 % des protéines totales des éosinophiles, leur rôle précis reste à découvrir (Charcot et Robin, 1853 ; Leyden, 1872 ; Weller *et al.*, 1982 ; 1984).

2.1.2.2. Mécanismes cytotoxiques dépendant de l'oxygène

Les mécanismes cytotoxiques liés à la production de FRO par les éosinophiles font intervenir la NADPH oxydase comme pour les neutrophiles. Cependant, les granules spécifiques des éosinophiles contiennent en quantité importante (5 % du total de protéines) une protéine spécifique, l'EPO (*Eosinophil peroxydase*) qui catalyse la formation de radicaux libres d'oxygène (O[•]) ou de Bromure (Br[•]) (Voir figure 2).

1.2.2 Immunocompétence des granulocytes

Il est devenu de plus en plus évident que le rôle des granulocytes dans les défenses de l'hôte ne se limite pas à celui de cellules phagocytaires ou cytotoxiques. En effet, les granulocytes sont capables d'exprimer des gènes dont les produits sont étroitement impliqués dans le développement et le maintien de l'inflammation. Cette capacité à produire différents médiateurs indique que les granulocytes sont des cellules à fonction inflammatoire impliquées dans les

Granules spécifiques	Granules primaires	Petits granules	Corps lipidiques
Noyau			
MBP	Cristaux de	Acid phosphatase	Cyclooxygenase
Catalase	Charcot-Leyden	Arylsulphatase B	5-Lipoxygenase
Enoyl-CoA hydratase		Catalase	15-Lipoxygenase
3-Ketoacyl-CoA thiolase		Cytochrome b ₅₅₈	LTC ₄ synthase
b-glucuronidase		Elastase	EPO
Cathepsine D		ECP (matrice)	Esterase
GM-CSF			
Il-2			
Il-4			
Il-5			
RANTES			
<i>(Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted)</i>			
Type 2 Phospholipase A2			
BPI			
Matrice			
MBP			
ECP			
EDN			
EPO			
Lysozyme			
Phosphatase acide			
Arylsulphatase B			
Catalase			
Enoyl-CoA hydratase			
3-Ketoacyl-CoA thiolase			
β-glucuronidase			
Cathepsine D			
Elastase			
Il-6			
TNF-α			
Tableau IV. Liste non exhaustive du contenu en protéines des granules des éosinophiles humains (d'après Giembycz et Lindsay, 1999).			

premières phases d'activation et de recrutement cellulaires. De nombreuses études ont montré que les granulocytes étaient en réalité à la fois la cible et la source de nombreuses cytokines, chimiokines, médiateurs lipidiques et facteurs de croissance, exerçant ainsi leurs fonctions pro-inflammatoires par un processus d'autorégulation. En effet, les cytokines pro-inflammatoires amplifient certaines fonctions des granulocytes comme leur capacité d'adhésion aux cellules endothéliales et la production de FRO ; de même, les chimiokines agissent comme des attractants potentiels et favorisent la migration orientée des granulocytes vers le site inflammatoire. Ces cytokines et chimiokines peuvent agir comme agents activateurs des granulocytes. Le tableau V (voir page suivante) répertorie une liste non-exhaustive de médiateurs de l'inflammation produits par les granulocytes. Les neutrophiles et éosinophiles, en raison de leurs particularités intrinsèques, répondent différemment à certains médiateurs et il existe même des médiateurs qui leur sont spécifiquement destinés.

Par exemple, l'Il-8 est la première chimiokine produite par le neutrophile à avoir été étudiée. Les neutrophiles ne sont pas seulement les producteurs mais sont également la principale cible de cette cytokine, répondant à ce médiateur par chimiotaxie, relargage d'enzymes issues des granules, activité de flambée oxydative, régulation positive de l'expression de molécules d'adhésion à leur surface associée avec un capacité d'adhérence augmentée aux cellules endothéliales non stimulées (Oppenheim *et al.*, 1991 ; Baggiolini *et al.*, 1994). Les stimuli capables d'induire la production d'Il-8 par le neutrophile incluent non seulement les agonistes classiques des neutrophiles mais également beaucoup d'autres classes d'agents biologiques, comme des cytokines et des facteurs de croissance (TNF- α , Il-1 β , Il-15, GM-CSF, thrombopoïétine), des chimio-attractants (f-Met-Leu-Phe [fMLP], C5a, PAF, le leucotriène [LT] B₄), des microcristaux, des enzymes protéolytiques, des molécules de surface, des bactéries, des champignons, des protozoaires, des virus et des produits dérivés de ces micro-organismes (Cassatella, 1999).

En ce qui concerne l'éosinophile, l'éotaxine est une chimiokine qui joue un rôle central dans la biologie de ces cellules. Cette chimiokine a été associée dès sa découverte à l'éosinophile d'où sa dénomination. Le récepteur de cette chimiokine est le CCR-3 (*CC chemokine Receptor-3*) (Conesa *et al.*, 2003). L'éotaxine est en grande partie responsable du recrutement spécifique des éosinophiles lors des réactions inflammatoires (Hogan *et al.*, 2000 ; Zeibecoglou *et al.*, 2000 ; Conroy et Williams, 2001 ; Ferland *et al.*, 2001 ; Gouon-Evans et Pollard, 2001 ; Ye Y.L. *et al.*, 2002). Les cytokines Il-3, GM-CSF et Il-5 sont connues pour leur rôle primordial dans la régulation de l'éosinophile. L'Il-5 est particulièrement importante pour l'éosinopoïèse et la maturation de l'éosinophile dans la moelle osseuse. L'Il-5 joue également un rôle dans la survie de l'éosinophile, au site de l'inflammation. Les propriétés chimiotactiques et cytotoxiques sont aussi potentialisées par l'Il-5 (Guilbert *et al.*, 1999 ; Ferland *et al.*, 2001).

Enfin, les granulocytes possèdent également des propriétés immunorégulatrices. Elles sont en effet capables de synthétiser des cytokines impliquées à différentes étapes de la réponse immune (TNF- α , GM-CSF, Il-4, *etc*). Mais il a également été montré que sous certaines conditions les éosinophiles pouvait sécréter de l'Il-10, de l'Il-12 et de l'interféron (IFN)- γ , cytokines importantes dans la polarisation des lymphocyte T (Woerly *et al.*, 1999). Les éosinophiles sont également capable de se comporter en cellules présentatrice d'antigène (Del Pozo *et al.*, 1992 ; Liu *et al.*, 2006). Les neutrophiles quant à eux pourraient induire la maturation des cellules dendritiques par la production de TNF- α et interagir avec ces cellules par une liaison entre leurs complexes CD11b/CD18 et DC-SIGN (*Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin*) (van Gisbergen *et al.*, 2005). Dans les conditions appropriées, les neutrophiles peuvent modifier leur phénotype en diminuant l'expression des molécules de phagocytose et en

NEUTROPHILES	EOSINOPHILES
Cytokines	Cytokines
II-1 α , -1 β , -3, -6, -12, -18 IFN- α , - β , - γ II-1R _a GM-CSF G-CSF M-CSF Ligand de Fas (FasL) CD30L Oncostatine Neurotrophine	II-1 α , -2, -3, -4, -5, -6, -9, -10, -11, -12, -13, -16, -17 LIF (<i>Leukemia inhibitor factor</i>) IFN- γ TNF- α GM-CSF
Chimiokines	Chimiokines
Il-8 CINC (<i>Cytokine-induced neutrophil chemoattractant</i>) GRO- α , - β (<i>Growth-related gene product</i>) MIP-1 α , -1 β (<i>Macrophage inflammatory protein</i>) MCP-1 (<i>Monocyte chemoattractant protein</i>) MIG (<i>Monokine induced by IFN-γ</i>) IP-10 (<i>IFN-γinducible protein</i>)	Il-8 Eotaxine MIF-1 α (<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>) RANTES
Facteurs de croissance	Facteurs de croissance
VE-GF (<i>Vascular endothelium-growth factor</i>) HGF (<i>Hepathocyte growth factor</i>) TGF- α (<i>Tumoral growth factor</i>) SCF (<i>Stem cells factor</i>)	HB-EGF (<i>Heparin-binding EGF</i>) VE-GF PDGF (<i>Platelet-derived growth factor</i>) TGF- α , - β
Médiateurs lipidiques	Médiateurs lipidiques
LTA ₄ , B ₄ 5-HETE (<i>Hydroxyeicosatetraenoic acid</i>) Thromboxane (TX)A ₂ Prostaglandine (PG)E ₂ PAF	LTB ₄ , C ₄ TXA ₂ PGE ₂ Lipoxine (LX)A ₄ 5-HETE 15-HETE 5,15-di HETE 8,15-di HETE 14,15-di HETE 13-HODE (<i>Hydroxyoctadecadienoic acid</i>) PAF
Tableau V. Liste non exhaustive des médiateurs de l'inflammation sécrétés par les neutrophiles ou les éosinophiles (d'après Cassatella, 1999 ; Giembycz et Lindsay, 1999).	

exprimant les molécules nécessaires pour la présentation d'antigènes (Complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe II, CD80 et CD86) et migrer vers les organes lymphoïdes (Fanger *et al.*, 1997 ; Oehler *et al.*, 1998 ; Iking-Konert *et al.*, 2001 ; 2005). Neutrophiles et éosinophiles pourraient donc intervenir non seulement dans la réponse innée mais aussi dans l'élaboration de la réponse adaptative.

Les granulocytes sont également capable de synthétiser des facteurs de croissance et d'activation et de générer des produits qui participent à la cicatrisation, au remodelage tissulaire, et à l'angiogenèse (tels que les TGF [*Tumoral growth factor*] - α et - β , *etc*) (Benelli *et al.*, 2003 ; Chetta *et al.*, 2005 ; Puxeddu *et al.*, 2005 ; Torrego *et al.*, 2007).