

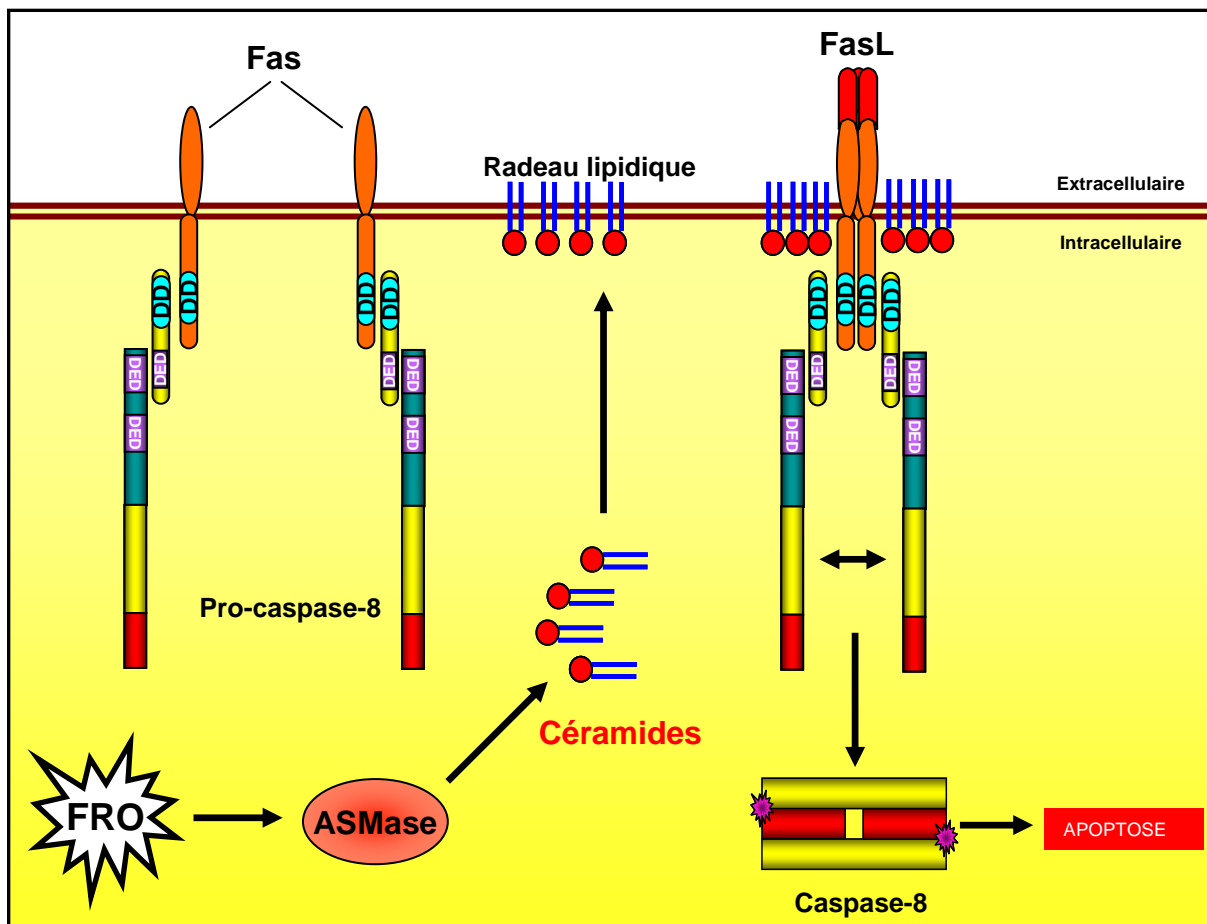
## Chapitre III - L'apoptose des granulocytes neutrophiles et éosinophiles

La taille de chaque sous-population hématopoïétique 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. L'importance de l'apoptose dans le maintien de l'homéostasie hématopoïétique est évidente lorsqu'on observe les conséquences désastreuses de sa dérégulation. Une induction inappropriée de l'apoptose est associée à la pathogenèse du syndrome d'immunodéficience acquise (sida) alors qu'une apoptose inefficace est associée à l'inflammation, aux maladies auto-immunitaires et au développement de néoplasies hématologiques (Lepine et Messner, 1983 ; Ameisen *et al.*, 1995 ; Fisher *et al.*, 1995 ; Simon et Blaser, 1995).

De toutes les cellules du système immunitaire, ce sont les granulocytes qui possèdent la durée de vie la plus courte, allant de 6 à 18 heures pour les neutrophiles et de 24 à 72 heures pour les éosinophiles. Ces courtes durées de vie s'expliquent par le fait que les granulocytes circulant rentrent en apoptose **spontanément** dès leur libération dans la circulation sanguine (ou même déjà avant) sans recevoir de signal extérieur. Cette mort constitutive constitue la grande spécificité des granulocytes par rapport aux autres types cellulaires. Cette inclination à "mourir" spontanément peut être seulement retardée ou accélérée par différents médiateurs. Il est donc important de comprendre que, plus que dans les autres types cellulaires, l'intégration des signaux de mort mais aussi de survie est importante et doit être finement régulée. Nombre de molécules régulent l'apoptose des granulocytes de façon plus ou moins spécifique. En effet, une fois recrutés dans les tissus, les granulocytes ont un temps de vie plus long. La durée de leur survie dans les tissus n'est pas précisément connue car cela dépend surtout de l'environnement local dans lequel ils se trouvent et de la balance entre les facteurs pro- et anti-apoptotiques présents dans cet environnement. *In vitro*, les granulocytes peuvent être maintenus en vie plusieurs jours en les exposant à diverses cytokines et on peut supposer que des temps de survie similaires peuvent être observés quand ils sont exposés à des agents identiques dans les tissus (Steinbach *et al.*, 1979 ; Broide *et al.*, 1992 ; Desreumaux *et al.*, 1992 ; Lee *et al.*, 1993 ; Haslett *et al.*, 1994 ; Girard *et al.*, 1996 ; Dibbert *et al.*, 1999 ; Yousefi *et al.*, 1997). De tels facteurs ralentissent mais n'empêchent pas l'apoptose ; les granulocytes finissent par devenir apoptotiques et sont éliminés du site par les macrophages tissulaires ou d'autres cellules phagocytaires. Les granulocytes apoptotiques sont incapables de réaliser leurs activités habituelles comme la chimiotaxie, la dégranulation, l'adhérence, la phagocytose et l'activation de la flambée oxydative (Dransfield *et al.*, 1994 ; Haslett *et al.*, 1994 ; Gasmir *et al.*, 1996 ; Stringer *et al.*, 1996).

### III.1. Changements morphologiques des granulocytes apoptotiques

Comme toutes les cellules apoptotiques, les granulocytes exhibent les mêmes modifications de la surface cellulaire ; ceux-ci favorisent la reconnaissance des granulocytes apoptotiques par les cellules phagocytaires (Stern *et al.*, 1992 ; Savill *et al.*, 1993 ; Stern *et al.*, 1996 ; Sexton *et al.*, 2004). Ainsi, leur membrane plasmique perd l'asymétrie phospholipidique ; la phosphatidylsérine, normalement présente sur le feuillet interne de la membrane, est externalisée et permet la reconnaissance de la cellule apoptotique par les macrophages (Savill et Haslett, 1995). Comme déjà mentionné, ces changements maintiennent la membrane plasmique intègre qui continue, du moins durant les premières phases de l'apoptose, d'assurer sa fonction de barrière de façon à ce que les composants cellulaires, comme les protéases,



**Figure 16. Modèle proposé expliquant l'apoptose spontanée des neutrophiles.**

La génération spontanée de FRO active la ASMase et mène à l'accumulation membranaire de céramides. Ces céramides s'accumulent et forment des radeaux lipidiques. Ces micro-domaines facilitent le recrutement et l'assemblage des récepteurs membranaires à DD. Une fois les complexes DISC formés, les pro-caspases-8 sont activées et le processus de mort entamé (d'après Scheel-Toellner, 2004b).

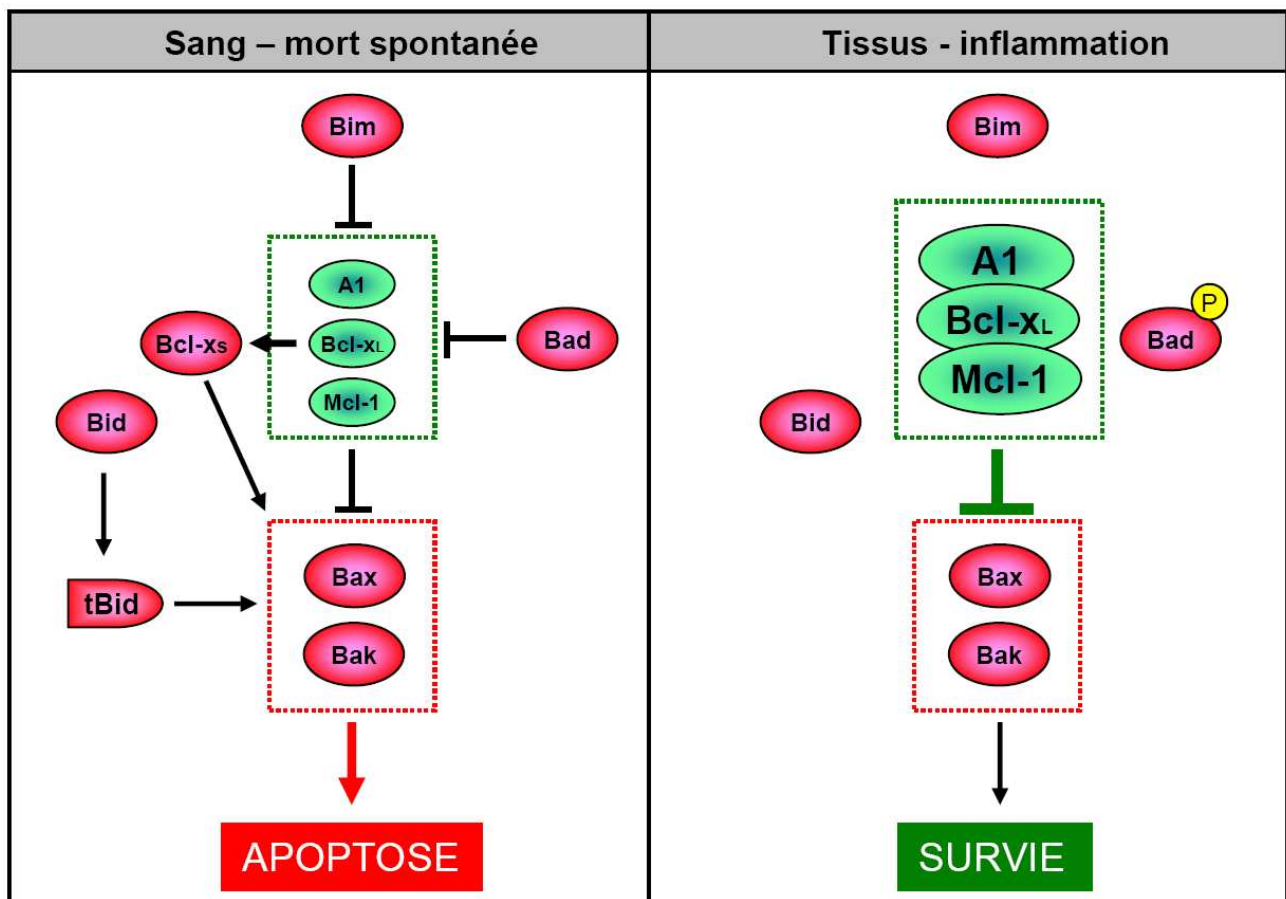
soient retenus à l'intérieur des granulocytes apoptotiques. Si la cellule mourait par nécrose et que sa membrane plasmique se rompait, ces composants cytoplasmiques seraient alors relâchés dans l'espace tissulaire. Vu la concentration granulocytaire importante pouvant être mesurée lors d'une inflammation, le déversement des contenus cytoplasmiques submergerait les mécanismes locaux de protection contre les protéinases et les substances oxydantes extracellulaires, ce qui donnerait lieu à de nombreux dégâts tissulaires (Edwards et Hallett, 1997). L'apoptose des granulocytes, suivie de leur phagocytose par les macrophages, les fibroblastes ou les cellules épithéliales, constitue donc un mécanisme sécurisant pour l'enlèvement des granulocytes du site de l'inflammation sans induire de dommages aux tissus environnants (Stern *et al.*, 1992 ; Savill *et al.*, 1989 ; Hall *et al.*, 1994 ; Stern *et al.*, 1996 ; Sexton *et al.*, 2004). Ces mécanismes sont donc cruciaux pour la résolution de l'inflammation.

### **III.2. Apoptose spontanée des granulocytes**

Actuellement, deux hypothèses moléculaires ont été proposées pour expliquer le caractère spontané et constitutif de la mort des granulocytes. D'une part, l'hypothèse extrinsèque où le processus de mort serait déclenché par la liaison de ligands spécifiques (solubles ou membranaires) à des récepteurs trans-membranaires exprimés à la surface des granulocytes. Ces récepteurs, tels que Fas ou TNFR, appartiennent à la super-famille des récepteurs du TNF. La liaison du ligand à son récepteur provoque la trimérisation du récepteur et le recrutement des protéines adaptatrices FADD ou TRADD. Ce processus induit l'activation de la caspase-8 (Chinnaiyan *et al.*, 1995). La caspase-8 active à son tour d'autres caspases, comme entre autres la caspase effectrice-3, qui provoqueront la diminution des fonctions cellulaires et l'acquisition du phénotype apoptotique. Dans les neutrophiles, il a été montré que le recrutement et la trimérisation des récepteurs à DD par la formation de micro-domaines lipidiques (viz. les radeaux lipidiques) étaient facilités par l'accumulation de céramides (Grassme *et al.*, 2003). Comme le modélise la figure 16, il a été montré que ces céramides sont générées suite à l'activation de l'ASMase par des FRO (Scheel-Toellner *et al.*, 2004a ; 2004b). Cependant, ce modèle extrinsèque de l'induction de l'apoptose spontanée par l'activation des récepteurs de mort comme Fas ou TNFR dans les neutrophiles reste très controversé. En effet, il semblerait que l'induction de l'apoptose du neutrophile par ces voies soit un mécanisme purement anti-inflammatoire visant à réduire le nombre de neutrophiles au site de l'inflammation ainsi que la libération du contenu des granules neutrophiliques (Fecho et Cohen, 1998 ; Hannah *et al.*, 1998 ; Savill *et al.*, 2002).

La voie d'activation extrinsèque des caspases-8 via le recrutement des récepteurs membranaires à DD ne constitue pas l'explication de la mort spontanée des éosinophiles (Liles *et al.*, 1996). En effet, Liles et collaborateurs ont montré que des éosinophiles fraîchement isolés du sang et placés en culture n'expriment pas spontanément du FasL (Liles *et al.*, 1996). Aucun des récepteurs à DD et aucun de leurs ligands n'est constitutivement exprimé à la surface des éosinophiles vieillissants.

L'autre hypothèse proposée, dite intrinsèque, s'explique par l'apparition progressive au cours du temps d'un déséquilibre spontané entre facteurs cellulaires pro- et anti-apoptotiques et ce, en faveur des facteurs pro-apoptotiques. Les molécules régulatrices de l'apoptose que sont les membres de la famille Bcl-2 sont particulièrement impliquées dans l'apparition de ce déséquilibre pro-apoptotique intrinsèque. Etant donné que la durée de vie des deux types de



**Figure 17. Membres Bcl-2 exprimés dans les neutrophiles.**

Gauche : Dans des conditions non-inflammatoires, les neutrophiles expriment majoritairement les molécules pro-apoptotiques Bax, Bak, Bid, Bim, Bad et Bcl-x<sub>S</sub> (en rouge). Par contre, les membres anti-apoptotiques A1, Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 (en vert) sont peu exprimés dans les neutrophiles matures. De plus Bad et Bim neutralisent leur activité anti-apoptotique. Bid est tronqué lors de l'apoptose et peut participer à la libération mitochondriale de facteurs pro-apoptotiques. Droite : Dans des conditions inflammatoires, le niveau d'expression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 est plus élevé. Dans ces conditions, Bad est phosphorylé et inactif, Bid n'est pas clivé, Bim non activé et Bcl-x<sub>S</sub> non-exprimé (d'après Bureau *et al.*; 2002 ; Simon, 2003).

granulocytes, neutrophiles et éosinophiles, est différente, il est probable que les mécanismes moléculaires impliqués le sont également.

### **III.2.1. Spécificités moléculaires de l'apoptose spontanée des neutrophiles**

Le modèle intrinsèque fait intervenir l'activation de la caspase-9 via la perte d'une activité inhibitrice de l'apoptose au niveau de la mitochondrie, en impliquant notamment les membres de la famille Bcl-2. Les neutrophiles expriment des membres pro-apoptotiques (Bax, Bik, Bad, Bak, Bid, *etc*) et anti-apoptotiques (A1, Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1, *etc*). La figure 17 modélise la régulation de l'apoptose par les protéines de la famille Bcl-2 dans les neutrophiles. En effet, il existe différentes preuves pour suggérer que le déclenchement ou non de l'apoptose du neutrophile repose sur les changements modifiant l'équilibre des expressions relatives de ces protéines. Ces cellules expriment aussi bien l'ARNm codant pour Mcl-1 que sa protéine (Moulding *et al.*, 1998 ; Leuenroth *et al.*, 2000a ; 2000b ; Moulding *et al.*, 2001).. Mcl-1 semble jouer un rôle important dans l'apoptose du neutrophile. Ainsi, des agents qui accélèrent l'apoptose des neutrophiles diminuent les taux de Mcl-1, alors que des agents qui retardent leur apoptose augmentent ou maintiennent les taux de Mcl-1. De plus, des expériences permettant d'inhiber spécifiquement Mcl-1 dans les neutrophiles par des séquences oligodésoxyribonucléiques antisens montrent une apoptose accélérée de ces cellules (Moulding *et al.*, 2000). Notre équipe et d'autres ont montré que le membre Bcl-x<sub>L</sub> était exprimé dans les neutrophiles sanguins. Nous avons de plus montré que le niveau de Bcl-x<sub>L</sub> était maintenu grâce à une activité constitutive du facteur nucléaire (NF)-κB. Enfin, nous avons montré que l'inhibition de NF-κB, induisait un épissage alternatif de l'ARNm codant pour Bcl-x<sub>L</sub> vers une forme courte pro-apoptotique, Bcl-x<sub>S</sub> (Bureau *et al.*, 2002). Des niveaux élevés d'expression des membres pro-apoptotiques Bad, Bid et Bax ont été observés dans les neutrophiles normaux, ce qui pourrait expliquer leur courte période de vie (Dibbert *et al.*, 1999 ; Weinmann *et al.*, 1999 ; Moulding *et al.*, 2001). Ces membres sont, quant à eux, généralement localisés sous une forme inactive dans le cytoplasme des cellules non apoptotiques. Cependant, en présence de stimuli pro-apoptotiques, ces protéines pro-apoptotiques peuvent se relocaliser au niveau de la mitochondrie où elles exercent leurs effets apoptotiques (voir figure 17) (Zha *et al.*, 1996 ; Hsu *et al.*, 1997 ; Wolter *et al.*, 1997 ; Gross *et al.*, 1998 ; Puthalakath *et al.*, 1999). Ainsi, par exemple, la protéine Bad, est séquestrée, phosphorylée, dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 (del Peso *et al.*, 1997 ; Blume-Jensen *et al.*, 1998 ; Harada *et al.*, 1999). Suite à un stimulus pro-apoptotique, Bad est déphosphorylé, libéré, et va se relocaliser dans la membrane mitochondriale. De même, le clivage de Bid favorise l'oligomérisation et l'insertion de Bax dans la membrane mitochondriale (Li *et al.*, 1998). Comme décrit plus haut ces protéines pro-apoptotiques favorisent ainsi la libération du cytochrome c et l'activation de la caspase-9 via la formation de l'apoptosome. Ce complexe multi-protéique va à son tour activer les caspases effectrices-3, -6 et -7, déclenchant le programme de mort cellulaire (Borner et Monney, 1999 ; Kitanaka et Kuchino, 1999). Le rôle des caspases dans l'apoptose spontanée des neutrophiles reste sujet à débats. En effet, il a été montré que des neutrophiles exhibaient les stigmates morphologiques et biochimiques de l'apoptose alors qu'ils avaient été traités avec des inhibiteurs spécifiques des caspases (Harter *et al.*, 2001 ; Mecklenburgh *et al.*, 2002). En outre, il a été montré que d'autres mécanismes, indépendants des caspases, peuvent induire l'apoptose des neutrophiles. Ainsi, des études ont notamment démontré que les FRO produits par la chaîne respiratoire de la mitochondrie pouvaient induire la mort du neutrophile par une voie indépendante des caspases mais encore inconnue à l'heure actuelle (Maianski *et al.*, 2003). Enfin d'autres types de caspases pourraient être impliquées comme par exemple la caspase-10 (Goepel *et al.*, 2004).

Plusieurs observations ont permis de conclure que les calpaïnes, cystéines protéases n'appartenant pas à la famille des caspases, jouaient un rôle dans la régulation de l'apoptose des neutrophiles. En effet, des études ont montré que l'inhibition des calpaïnes par des inhibiteurs spécifiques bloquait l'apoptose des neutrophiles et que l'inhibition de la calpstatine, un inhibiteur endogène des calpaïnes, accélérât leur apoptose (Knepper-Nicolai *et al.*, 1998 ; Squier *et al.*, 1999). La calpaïne-1 a été identifiée comme l'isoforme critique ayant pour cible Bax (Gao et Dou, 2000 ; Altnauer *et al.*, 2004). Ces événements, se passant en amont de la mitochondrie, apparaissent être essentiels pour la libération du cytochrome c et de la protéine Smac et pour l'activation subséquente de la caspase-3 dans les neutrophiles. La calpaïne-1 représente donc un élément précoce important dans la cascade des événements pro-apoptotiques dans les neutrophiles.

### **III.2.2. Spécificités moléculaires de l'apoptose spontanée des éosinophiles**

Bien que les caspases-3, -6, -7, -8 et -9 aient été détectées dans les éosinophiles et que l'apoptose spontanée des éosinophiles puisse être ralentie par l'utilisation d'inhibiteurs de caspases, il a été montré que les caspases-3 et -8 ne sont pas nécessaires à la mort spontanée des éosinophiles (Zangrilli *et al.*, 2000 ; Daigle et Simon, 2001a ; Dewson *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2003). Dans les éosinophiles, le processus exact d'activation des caspases menant au délabrement cellulaire caractéristique de l'apoptose reste à découvrir.

L'apparition progressive et spontanée d'un déséquilibre intrinsèque entre molécules anti- et pro-apoptotiques pourrait expliquer l'apoptose spontanée des éosinophiles. Parmi ces facteurs, des membres de la famille Bcl-2 ont été identifiés dans les éosinophiles ; tant des protéines pro-apoptotiques (Bax et Bid) qu'anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1, A1) (Druihe *et al.*, 1998a ; 1998b ; Dewson *et al.*, 1999 ; 2000 ; Zangrilli *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2003). Comme dans les neutrophiles, la protéine pro-apoptotique Bax existe sous deux formes, cytosolique (Bax<sub>c</sub>) ou membranaire (Bax<sub>m</sub>), discernables par immunodétection. Il a été montré que les éosinophiles de la circulation expriment de grandes quantités de Bax et que la forme Bax<sub>m</sub> augmente progressivement et spontanément au cours du temps. De plus, sa relocalisation au niveau de la membrane mitochondriale en altère la perméabilité et la structure, facilite la libération de facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome c depuis l'espace inter-membranaire mitochondrial vers le cytosol et accélère l'activation des caspases-9 et -3 (Dewson *et al.*, 2001). Les éosinophiles de la circulation expriment de grandes quantités de Bcl-x<sub>L</sub>. Il a été montré que le niveau d'expression de Bcl-x<sub>L</sub> diminue progressivement à mesure que les éosinophiles, placés en culture, vieillissent.

D'autres familles de molécules semblent impliquées dans l'apparition d'un déséquilibre apoptotique intrinsèque. Ces molécules sont décrites dans l'article de synthèse présenté en annexe (Seumois *et al.*, L'apoptose de l'éosinophile : cible d'intérêt thérapeutique dans le traitement de l'inflammation allergique, soumis pour publication à la Revue Médicale de Liège, 2007)

### **III.3. Régulation de l'apoptose des neutrophiles**

Comme cité précédemment, le neutrophile circulant est la cellule immune possédant la plus courte durée de vie (entre 6 et 18 h). Une fois ces cellules recrutées dans les tissus enflammés, leur durée de vie est allongée suite à la présence dans leur environnement de facteurs anti-apoptotiques qui retardent l'apoptose constitutive de ces cellules. Une variété de cytokines pro-inflammatoires et d'autres facteurs sont capables de retarder l'apoptose des neutrophiles *in vitro* comme par exemple l'IL-1 $\beta$ , l'IL-2, l'IL-4, l'IL-15, l'IFN- $\gamma$ , le G-CSF, le GM-CSF, et le LPS (Brach *et al.*, 1992 ; Colotta *et al.*, 1992 ; Klebanoff *et al.*, 1992 ; Pericle *et al.*, 1994 ; Girard *et al.*, 1996 ; 1997 ; Moulding *et al.*, 1998). Les glucocorticoïdes, alors qu'ils ont un effet inverse sur les éosinophiles, peuvent retarder l'apoptose des neutrophiles (Cox, 1995 ; Meagher *et al.*, 1996). Bien que de nombreuses études aient démontré l'effet pro-apoptotique du TNF- $\alpha$  sur les neutrophiles, des résultats opposés ont également été publiés (Colotta *et al.*, 1992 ; Takeda *et al.*, 1993 ; Watson *et al.*, 1996 ; Keel *et al.*, 1997 ; Murray *et al.*, 1997). Cette controverse peut s'expliquer par le fait que les effets du TNF- $\alpha$  sur la survie des neutrophiles dépendent de la concentration en TNF- $\alpha$  ainsi que la durée de stimulation et de la capacité fonctionnelle initiale des neutrophiles avant leur exposition au TNF- $\alpha$  (Murray *et al.*, 1997 ; Salamone *et al.*, 2001 ; Van den Berg *et al.*, 2001) ainsi que sur leur état d'activation (Kilpatrick *et al.*, 2002). Ainsi, le TNF- $\alpha$  induit rapidement l'apoptose dans une sous-population de neutrophiles sanguins mais retarde l'apoptose des cellules survivantes (Murray *et al.*, 1997).

Une autre cytokine anti-apoptotique importante de l'apoptose du neutrophile est le GM-CSF. En effet, il a été montré que l'augmentation du délai de l'apoptose du neutrophile par le GM-CSF serait due à une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 et Bcl-x<sub>L</sub> (Moulding *et al.*, 1998 ; Epling-Burnette *et al.*, 2001) et à une diminution de l'expression de la protéine Bax (Weinmann *et al.*, 1999). De plus, sous GM-CSF, la voie PKB/Akt est activée, ce qui provoque la phosphorylation de Bad et son inhibition consécutive à sa séquestration cytoplasmique par la protéine 14-3-3 (del Peso *et al.*, 1997 ; Blume-Jensen *et al.*, 1998). La figure 17 (panneau de droite) modélise le changement dans l'expression des protéines de la famille Bcl-2 dans les neutrophiles placés en contact de médiateurs de l'inflammation (Simon, 2003).

Contrairement à ce qui a été observé pour d'autres types cellulaires, l'hypoxie peut retarder l'apoptose des neutrophiles (Hannah *et al.*, 1995). De même, des anti-oxydants ajoutés au milieu de culture *in vitro* peuvent prolonger la survie des neutrophiles. La survie des neutrophiles pourrait donc dépendre des conditions locales d'oxygénation. Ces considérations sont très importantes sachant que les tissus infectés ou enflammés possèdent invariablement des tensions en oxygène faibles comparativement à celles observées dans la circulation.

L'apoptose peut être également inhibée par les IAP. Celles-ci inhibent directement les caspases ou activent NF- $\kappa$ B, un facteur transcriptionnel impliqué dans les réponses immunes et inflammatoires et qui joue un rôle très important dans l'expression de gènes anti-apoptotiques (Salvesen et Duckett, 2002).

Il a également été démontré que le déclenchement des mécanismes d'adhésion cellulaire stimulait des signaux intracellulaires résultant en une augmentation de la survie du neutrophile (Ginis et Faller, 1997 ; Kilpatrick *et al.*, 2002). Ces phénomènes sont d'une extrême importance car l'augmentation de la survie des neutrophiles lorsqu'ils sont recrutés au site inflammatoire augmente leur capacité à accomplir leurs fonctions cytotoxiques. Cependant, cela veut aussi dire

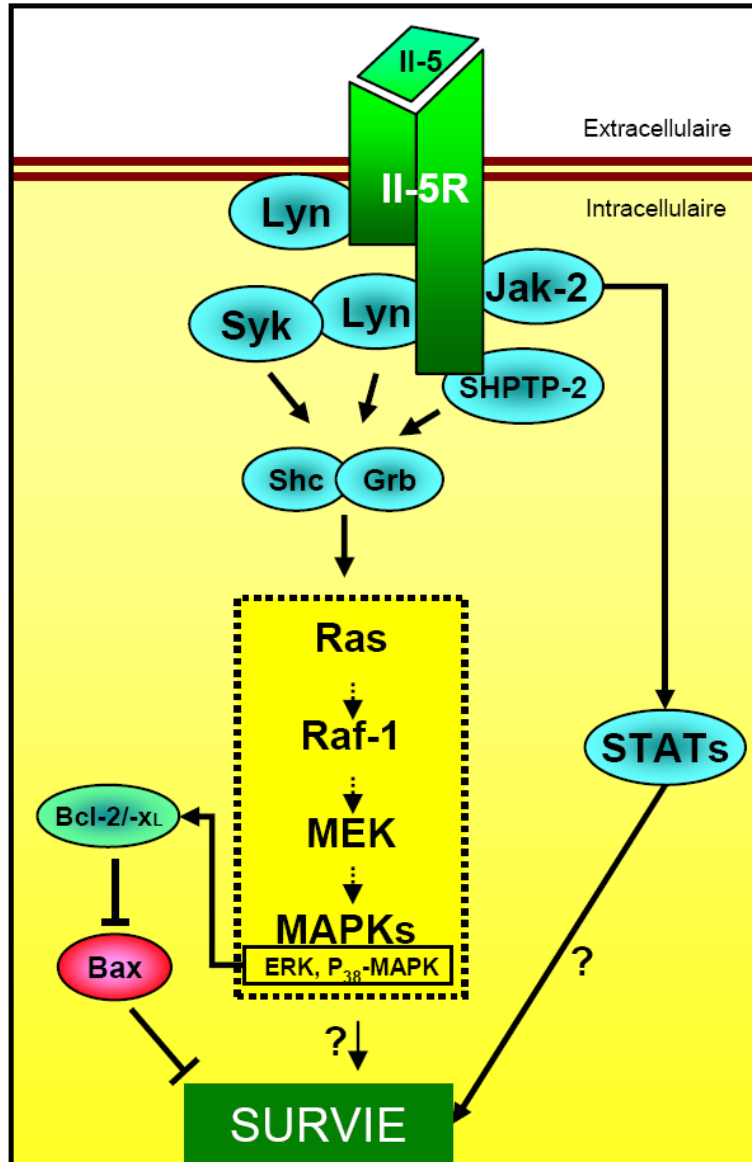


Figure 18. Représentation simplifiée des mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction de la survie des éosinophiles par l'IL-5 (? : a été démontré dans d'autres types cellulaires mais pas dans l'éosinophile) (d'après Seumois *et al.*, 2007, soumis pour publication à la Revue Médicale de Liège).



que, dans les maladies inflammatoires, ces cellules ont une capacité accrue à endommager les tissus environnants par sécrétion de leur arsenal cytotoxique avant d'être phagocytés par les macrophages.

### **III.4. Régulation de l'apoptose des éosinophiles**

De nombreux médiateurs de l'inflammation sont connus pour moduler la durée de vie des éosinophiles. L'article de synthèse présenté en annexe résume l'état des connaissances liées à la modulation de la durée de vie des éosinophiles humains (Seumois *et al.*, L'apoptose de l'éosinophile : cible d'intérêt thérapeutique dans le traitement de l'inflammation allergique, soumis pour publication à la Revue Médicale de Liège, 2007).

#### **III.4.1. Le GM-CSF et l'Il-5**

Les cytokines ayant un effet anti-apoptotique sur les éosinophiles les plus étudiées à l'heure actuelle sont le GM-CSF et l'Il-5. Ces deux cytokines sont impliquées dans la réponse immune allergique orchestrée par les lymphocytes T auxiliaires de type 2 (LTh<sub>2</sub>). L'Il-5 a une action spécifique sur les éosinophiles contrairement au GM-CSF qui est impliqué dans des mécanismes de différenciation et d'activation d'autres types cellulaires (Holgate, 1999). La production autocrine d'Il-5 et de GM-CSF par les éosinophiles est induite et ne s'observe que dans un contexte inflammatoire. Les récepteurs pour ces cytokines sont des dimères composés d'une sous unité  $\beta$  commune et d'une sous-unité  $\alpha$  spécifique pour chacune des cytokines (van der Bruggen et Koenderman, 1996 ; Giembycz et Lindsay, 1999 ; Geijsen *et al.*, 2001). *Ex vivo*, il a été montré que les niveaux d'expression de l'Il-5 et du GM-CSF sont plus importants dans les voies aériennes de patients asthmatiques que chez des sujets sains et sont positivement corrélés avec la fréquence des éosinophiles non apoptotiques ainsi qu'avec le degré de sévérité de l'asthme (Kankaanranta *et al.*, 2000 ; Duncan *et al.*, 2003). Comme le modélise la figure 18, la sous-unité  $\beta$  commune aux récepteurs des deux cytokines est étroitement associée avec des protéines tyrosine-kinases : Lyn, Syk et Jaks (*c-jun activated kinases*). Les Jaks sont des protéines qui activent par phosphorylation les facteurs de transcription STATs (*Signal transducer and activator of transduction*) (Kisseleva *et al.*, 2002 ; Wong *et al.*, 2002). Il a été décrit que l'Il-5 active les facteurs de transcription STAT-1, -3 et -5 dans les éosinophiles (van der Bruggen *et al.*, 1995 ; Ogata *et al.*, 1997). Cependant, le rôle des STATs dans l'apoptose des éosinophiles reste à découvrir.

Dans les éosinophiles, il a été montré que le signal transmis par l'Il-5 active différentes protéines de la famille des MAPKs, telles que ERK (*Extracellular-regulated kinase*) via la cascade d'activation Ras-Raf-1-MEKK (*Mitogen-activated protein kinase kinase*) (Pazdrak *et al.*, 1995 ; 1997 ; Bates *et al.*, 1998). Cependant, le rôle anti-apoptotique de la voie des MAPKs dans l'éosinophile est sujet à controverse (Kankaanranta *et al.*, 1999 ; Miike *et al.*, 1999 ; Adachi *et al.*, 2000 ; Ishihara *et al.*, 2001).

La protéine phospho-tyrosine phosphatase SH2 (SHPTP-2) et les protéines associées Grb2 et Shc participent également à la transmission du signal induit par l'Il-5 (Pazdrak *et al.*, 1997 ; Bates *et al.*, 1998). L'inhibition de l'expression de SHPTP-2 par l'utilisation de séquences désoxyribonucléotidiques antisens, inhibe l'activité ERK et la survie des éosinophiles stimulés par l'Il-5, ce qui apporte un élément supplémentaire à la thèse impliquant ERK dans le

signal de survie induit par l'Il-5 (Pazdrak *et al.*, 1997). Alors que la voie de signalisation impliquant la protéine kinase phosphatidyl-inositol-3 (PI3K) et la PKB/Akt est connue pour son rôle anti-apoptotique dans d'autres types cellulaires tels que les neutrophiles (Fiévez, 2005), et bien qu'il ait été montré que l'Il-5 et le GM-CSF active ces kinases dans les éosinophiles, il semble que cette voie de signalisation ne joue pas de rôle dans la survie induite par l'Il-5 et le GM-CSF (Hiraguri *et al.*, 1997).

*In vitro*, il a été montré que le délai de survie induit par un traitement à l'Il-5 ou au GM-CSF se transmet via l'augmentation du niveau d'expression de Bcl-2 et de Bcl-x<sub>L</sub>. Cependant, cette expression augmentée de Bcl-2 et de Bcl-x<sub>L</sub> est sujet à controverse. *Ex vivo*, il a été montré que les éosinophiles isolés à partir d'expectorations induites de patients souffrant d'asthme et de syndrome hyperéosinophilique expriment un niveau de Bcl-2 élevé et que, dans l'asthme, ce niveau d'expression était corrélé avec le taux d'Il-5 et avec la sévérité de la maladie (Zhang *et al.*, 2000). Le traitement d'éosinophiles avec l'Il-5 ou le GM-CSF ne modifie pas le niveau d'expression de Mcl-1 et de Bax mais inhibe leur relocalisation membranaire mitochondriale, la libération de cytochrome c et l'activation consécutive des caspases-9, -3, -7, -6, -8 (Ochiai *et al.*, 1997 ; Dibbert *et al.*, 1998 ; Druilhe *et al.*, 1998a ; Zangrilli *et al.*, 2000 ; Dewson *et al.*, 2001).

#### **III.4.2. Les membres de la famille du TNF- $\alpha$**

Plusieurs membres de la famille des récepteurs au TNF sont associés au contrôle de la survie des éosinophiles. Parmi ces récepteurs, Fas est le plus étudié. Comme déjà mentionné plus haut, plusieurs membres de cette famille sont caractérisés par un motif extracellulaire riche en résidus cystéines et par un domaine intracellulaire DD. *In vitro*, l'activation de Fas avec un anticorps agoniste ou avec la forme soluble de son ligand spécifique, sFasL, induit l'apoptose des éosinophiles via l'activation des caspases-8 et -3. Il a été montré que la mitochondrie ne participe pas à la transmission du signal de mort induit par Fas (Letuve *et al.*, 2001). L'effet pro-apoptotique de l'interaction Fas/FasL peut être ralenti par un traitement à l'Il-5 et par l'élévation des taux intracellulaires de monoxyde d'azote (NO) ou d'adenosine/guanosine mono-phosphate (AMP/GMP) cycliques (Hebestreit *et al.*, 1998). L'induction de l'apoptose par Fas a également été mise en évidence *ex vivo* par l'étude de polypes nasaux et *in vivo* dans des poumons de souris (Hebestreit *et al.*, 1996 ; Dibbert *et al.*, 1998 ; Yamashita *et al.*, 1999). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques et de séquences nucléotidiques antisens a montré que le signal induit par Fas provoque la phosphorylation de plusieurs protéines intracellulaires dont la protéine tyrosine kinase Lyn (Simon *et al.*, 1998). Un processus de résistance ou de désensibilisation à l'activation de Fas a été observé dans l'étude de l'éosinophilie associée au développement de polypes nasaux. Cette accoutumance peut s'expliquer comme étant une conséquence de l'exposition continue des éosinophiles à des cytokines éosinophilactiques, dont l'Il-5.

Les deux types de récepteurs au TNF- $\alpha$ , TNF-RI et -RII, sont exprimés constitutivement à la surface des éosinophiles isolés à partir du sang d'individus sains et asthmatiques (Giembycz et Lindsay, 1999). Le TNF- $\alpha$  induit deux signaux distincts et antagonistes dans les éosinophiles placés en culture. D'une part, un signal anti-apoptotique médié par l'activation de NF- $\kappa$ B et l'expression autocrine augmentée de GM-CSF. D'autre part, un effet pro-apoptotique indépendant de NF- $\kappa$ B (Peacock *et al.*, 1999 ; Tsukahara *et al.*, 1999 ; Ward *et al.*, 1999 ; Temkin et Levi-Schaffer, 2001). Il est probable qu'*in vivo*, le contexte inflammatoire régule et oriente la réponse de l'éosinophile au TNF- $\alpha$ . Plusieurs récepteurs trans-membranaires pour les TRAIL ont été identifiés à la surface des éosinophiles : (i) TRAIL-RI

(DR4), récepteur trans-membranaire avec un domaine intracellulaire DD ; (ii) TRAIL-R3 (DcR1) et TRAIL-R4 (DcR2), récepteurs trans-membranaires avec une forme tronquée du domaine intracellulaire décrits comme des leurres compétitifs empêchant TRAIL de se lier (Daigle et Simon, 2001b). Comme pour le TNF- $\alpha$ , l'effet de TRAIL sur la survie d'éosinophiles placés en culture est fonction du contexte cytokinique. En effet, il a été montré que les éosinophiles traités uniquement avec TRAIL ont leur durée de vie augmentée alors que dans un contexte pro-inflammatoire, associé à des cytokines anti-apoptotiques comme le GM-CSF, l'IL-5 ou l'IFN- $\gamma$ , TRAIL s'oppose au délai de l'apoptose induit par ces cytokines (Daigle et Simon, 2001b). Enfin, les éosinophiles isolés à partir de sang ou de tissu de patients asthmatiques expriment du CD40 à leur surface et l'activation subséquente de ce récepteur augmente leur survie (Ohkawara *et al.*, 1996).