
Discussion

Les granulocytes, neutrophiles et éosinophiles, sont des sentinelles de l'immunité innée. Ils participent activement à la défense de l'organisme contre les agressions extérieures (Lehrer *et al.*, 1988). Les granulocytes contiennent des granules, ou vésicules sécrétoires, contenant nombre d'enzymes lytiques et autres médiateurs de l'inflammation qui constituent l'arsenal fonctionnel des granulocytes (Borregarrd et Cowland, 1997 ; Giembycz et Lindsay, 1999). 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 entrent spontanément dans 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 (Savill *et al.*, 1989 ; Hall *et al.*, 1994 ; Stern *et al.*, 1992 ; 1996 ; Sexton *et al.*, 2004). 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 quelques heures (Savill *et al.*, 1989). L'apoptose constitue un processus nécessaire pour le maintien de l'homéostasie cellulaire dans des conditions physiologiques.

Les granulocytes jouent un rôle prépondérant dans le développement du processus inflammatoire. Bien que l'inflammation soit un processus physiologique, ce phénomène peut devenir néfaste en cas de persistance. Si le processus persiste, il s'amplifie par un mécanisme de réaction en chaîne causant de nombreux dégâts aux tissus environnants. Nombre de maladies ont pour origine un dérèglement ou une persistance aberrante de l'inflammation tissulaire: maladies inflammatoires chroniques (telle que la BPCO) (Barnes, 2003 ; Belvisi et Bottomley, 2003 ; Cataldo *et al.*, 2003), maladies parasitaires (Dombrowicz et Capron, 2001), maladies inflammatoires à composante allergique (telle que l'asthme) (Holgate, 1999), *etc.* Les maladies inflammatoires constituent l'une des premières causes mondiales de mortalité et de morbidité. Dans les pays en voie de développement, les maladies parasitaires représentent toujours un problème majeur de santé publique (Dombrowicz et Capron, 2001). Dans les pays industrialisés, la prévalence des maladies inflammatoires chroniques comme la BPCO et l'asthme ne cesse d'augmenter depuis ces dernières dizaines d'années (Dubois *et al.*, 1998 ; Lopez et Murray, 1998 ; Anto *et al.*, 2000 ; Viegi *et al.*, 2003). Il est donc de plus en plus urgent de pouvoir contrôler le processus inflammatoire afin de prévenir l'amplification néfaste de ce processus. Tout d'abord en luttant contre les causes de l'inflammation (pathogènes, allergènes, polluants, *etc.*). Ensuite, en agissant sur les mécanismes de l'inflammation en eux-mêmes, et notamment en ciblant les premières cellules recrutées, les granulocytes.

L'inflammation est caractérisée par une accumulation tissulaire de granulocytes. Plusieurs groupes de recherche ont mis en évidence une corrélation positive entre le nombre de cellules inflammatoires présente dans le tissu enflammé et la sévérité des signes cliniques associés à la maladie (Bousquet *et al.*, 1990 ; Denburg, 1996 ; Rothenberg, 1998 ; Vignola *et al.*, 1999). Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer cette accumulation cellulaire : une augmentation du recrutement tissulaire et/ou une régulation négative du processus de mort spontanée. Il a été montré, dans le cadre des maladies respiratoires chroniques, que les cellules inflammatoires pulmonaires sont réfractaires à l'apoptose, suggérant qu'une déficience dans les mécanismes menant à l'apoptose pourrait être impliquée dans la persistance de l'inflammation observée dans les maladies inflammatoires chroniques (Tsuyuki *et al.*, 1995 ; Woolley *et al.*, 1996 ; Vignola *et al.*, 1999 ; Kankaanranta *et al.*, 2000 ; Turlej *et al.*, 2001). Il a été observé que la production excessive de facteurs de survie est souvent associée à la persistance de l'inflammation. 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, conduit par contre à l'induction de l'apoptose des granulocytes. La résistance à l'apoptose des cellules inflammatoires pourrait donc jouer un rôle déterminant dans le développement et la persistance des maladies inflammatoires.

C'est dans la perspective de mieux comprendre les mécanismes moléculaires régulateurs de l'apoptose des granulocytes que se sont inscrits mes travaux de doctorat. Dans un premier temps nous avons investigué, *in vitro*, à partir de neutrophiles isolés de sang d'individus sains, les voies classiques de l'apoptose. Plusieurs tentatives d'inhibition pharmacologique des différentes espèces moléculaires impliquées dans les voies classiques de l'apoptose (caspases-8, -9, -3, -7, VDAC, ANT, Fas/FasL, TNFR/TNF- α , PPA2, PKC- α , - β , - δ , récepteurs aux benzo-diazépines, PI3K, *etc*) se sont révélées peu fructueuses (résultats non présentés dans le cadre de cette thèse). Ces travaux de *screening* nous ont permis de découvrir deux nouveaux mécanismes régulateurs de l'apoptose des granulocytes. La première étude proposée s'intéressait à l'apoptose spontanée des neutrophiles sanguins. La seconde démontre l'existence d'une voie anti-apoptotique inédite et spécifique dans les éosinophiles.

En l'absence de toute activation par des médiateurs de l'inflammation, les neutrophiles ont une durée de vie très courte, de l'ordre de quelques heures (Athens *et al.*, 1961). Bien que l'apoptose joue un rôle central dans le contrôle du nombre de neutrophiles dans l'organisme, les mécanismes moléculaires de l'apoptose des neutrophiles restent élusifs. Actuellement, l'apoptose spontanée des neutrophiles est essentiellement expliquée par un changement du niveau d'expression de certaines protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Simon, 2003). Plus récemment, Zhu et collaborateurs (2006) ont montré que la désactivation de la voie des protéines PI3K/Akt jouait un rôle dans l'apoptose des neutrophiles. Nous apportons une nouvelle alternative, en démontrant le rôle des céramides de type C₁₆ et C₂₄ dans l'activation des caspases-8,-9,-3 et l'induction de l'apoptose des neutrophiles. Nous montrons que ces deux types de céramides sont générés par la voie de synthèse *de novo* et s'accumulent au cours du temps dans les neutrophiles.

Les céramides ont été proposées pour participer indirectement à la mort spontanée des neutrophiles via la voie des récepteurs membranaires à DD (voir introduction chapitre III.2., p. 28, relatif à l'apoptose des granulocytes). Il a été montré que les céramides participent à la formation de radeaux lipidiques membranaires. De tels micro-domaines membranaires facilitent la trimérisation des récepteurs à DD et leur activation subséquente. La figure 16 (voir p.28) schématise le modèle proposé par Scheel-Toellner et collaborateurs (2004a ; 2004b). Modèle dans lequel les céramides seraient générées suite à l'activation de la ASMase par des FRO au niveau de la membrane plasmique. Nos résultats ne correspondent pas au modèle de Scheel-Toellner et collaborateurs (2004a ; 2004b). En effet, nous n'avons observé aucune accumulation des deux types de céramides, C₁₆ et C₂₄, suite à l'inhibition pharmacologique des deux types de SMases dans les neutrophiles. Plusieurs pistes peuvent être proposées pour expliquer ces différences de résultats. Premièrement, des détails techniques, comme par exemple les techniques de dosage des céramides utilisées. En effet, Scheel-Toellner et collaborateurs (2004a ; 2004b) ont utilisés une méthode indirecte basée sur un test enzymatique lié à la détection du DAG (*DAG assay*). Cette technique semble moins fiable que la spectrométrie de masse pour doser des céramides et peut générer des faux positifs (Gu *et al.*, 1997 ; Watts *et al.*, 1997). Deuxièmement, l'étude d'autres types cellulaires a rapporté que les céramides sont générées par la voie des ASMases exclusivement suite à un stress (Pena *et al.*, 1997 ; Marchesini et Hannun, 2004). Il est possible que les observations faites par Scheel-Toellner et collaborateurs

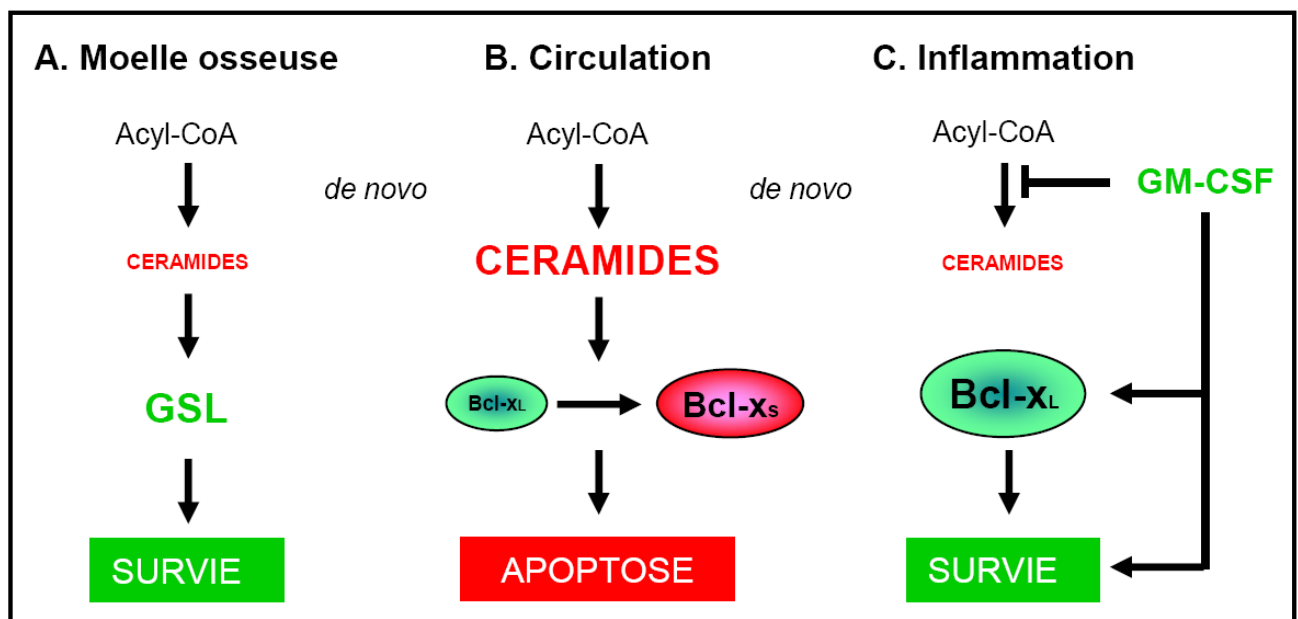


Figure 19. Nouveau modèle proposé pour expliquer l'apoptose spontanée des neutrophiles.

Les céramides sont générées constitutivement par la voie *de novo*. (A) Dans la moelle osseuse les céramides sont métabolisées en composés anti-apoptotiques (GSL). (B) Dans le sang, le catabolisme des céramides diminue et ces dernières s'accumulent dans la cellule. Cette accumulation induit l'apoptose notamment via l'induction de l'épissage alternatif de Bcl-x_L en Bcl-x_S. (C) Enfin au niveau du site de l'inflammation, les médiateurs de l'inflammation (tels que le GM-CSF) inhibent la synthèse des céramides parmi d'autres actions anti-apoptotiques.

(2004a ; 2004b) soient plutôt le fruit d'une réponse à un stress qu'une réelle explication au processus de mort spontanée tel qu'il pourrait être observé *in situ*.

Dans d'autres types cellulaires, l'accumulation de céramides via la voie *de novo* est induite suite à différents stimuli tant endogènes (TNF- α , lymphotoxines, interactions cellulaires, *etc*) qu'exogènes (daunorubicine, étoposide, *etc*) (Bose *et al.*, 1995 ; Paumen *et al.*, 1997 ; Xu *et al.*, 1998 ; Plo *et al.*, 1999 ; Perry *et al.*, 2000). Dans les neutrophiles, par contre, il a été montré que cette voie est déjà active lors de la différenciation cellulaire depuis le stade de myélocyte (Smolenska-Sym *et al.*, 2004). Cependant au cours de la différenciation des neutrophiles, les céramides générées ne s'accumulent pas, elles sont directement métabolisées en GSLs, en LCer, et en divers gangliosides (Smolenska-Sym *et al.*, 2004). Ces composés sont progressivement accumulés au niveau des membranes des granules en cours de constitution. Les effets biologiques de ces composés sont multiples. Ils participent notamment à l'activation de la NADPH oxydase et à la production de FRO via les voies impliquant les PI3K, p38 MAPK et PKC (Bleicher et Cabot, 2002 ; Iwabuchi et Nagaoka, 2002). Ces composés sont également connus pour participer à des processus pro-inflammatoires et anti-apoptotiques dans les neutrophiles et autres types cellulaires (Malisan et Testi 2002 ; Bektas et Spiegel, 2004). Il a été montré que le rapport entre céramides et GLS change au cours de la maturation du neutrophile (Nojiri *et al.*, 1985 ; Smolenska-Sym *et al.*, 2004). En effet, à mesure que les neutrophiles se différencient, l'utilisation des céramides pour la production de GLS se ralentit. Ceci suggère l'hypothèse que l'accumulation de céramides observée soit le fruit d'un ralentissement programmé des enzymes métabolisant les céramides. Certaines études ont d'ailleurs montré que l'accumulation des céramides est potentialisée par une baisse parallèle de l'activité de la glucosylcéramide synthase (Bourteele *et al.*, 1998 ; Tepper *et al.*, 2000 ; Turzanski *et al.*, 2005), freinant ainsi leur conversion en GCer. Cette hypothèse explique d'autant plus les résultats obtenus avec l'inhibiteur de la glucosylcéramide synthase (PPMP) sur l'apoptose des neutrophiles. L'apoptose spontanée des neutrophiles pourrait s'expliquer par changement dans le rapport de force établi entre des molécules pro-apoptotiques (céramides) et anti-apoptotique (GSL).

De façon similaire, les céramides peuvent être métabolisées en sphingosine (par une céramidase) et ensuite en S1P (par une sphingosine kinase) (voir introduction chapitre II.4.4.4., p.25, relatif aux céramides et leurs métabolites). Nos résultats obtenus avec l'inhibiteur de céramidase (MAPP) suggèrent qu'une partie des céramides sont consommées et transformées en sphingosine. Ce composé, décrit comme pro-apoptotique, n'a pas encore été étudié dans les neutrophiles (Taha *et al.*, 2006). Par contre, il a été montré que le produit de la phosphorylation de la sphingosine, la S1P, joue un rôle pro-inflammatoire et anti-apoptotique dans les neutrophiles (MacKinnon *et al.*, 2002 ; Chihab *et al.*, 2003). L'équilibre entre céramides et S1P est déterminant dans l'induction de la mort dans certains types de cellules (Strelow *et al.*, 2000 ; Taha *et al.*, 2006). Aucune étude sur l'évolution de la concentration en S1P dans les neutrophiles vieillissants n'a encore été réalisée. Il semblerait judicieux de non seulement s'intéresser à une probable stimulation de la production *de novo* mais aussi d'investiguer les raisons du ralentissement de l'activité des enzymes qui métabolisent les céramides.

Le lien entre les trois molécules, céramides, Bcl-x_L, et NF- κ B a été montré dans les cellules dendritiques. En effet, Kanto et collaborateurs (2001) ont montré que les céramides (générées par la voie *de novo*) inhibaient l'activité de NF- κ B et diminuaient le niveau d'expression de Bcl-x_L (Kanto *et al.*, 2001). A la lumière de nos résultats, et de ceux rapportés dans ces autres études dédiées aux neutrophiles et à d'autres types cellulaires, nous proposons un modèle complémentaire à celui de Scheel-Toellner (voir figure 16, p. 28). Dans ce modèle, schématisé par la figure 19, l'accumulation spontanée et constitutive de céramides C₁₆ et C₂₄ dans les neutrophiles est le fruit d'une activité

constitutive des enzymes de la voie *de novo*. Ensuite, nous postulons que les céramides nouvellement produites, en agissant sur le facteur de transcription nucléaire NF- κ B, induisent l'épissage alternatif de l'ARN messager codant pour Bcl-x_L vers la forme courte et pro-apoptotique Bcl-x_S, laquelle mène à l'activation des caspases et autres molécules effectrices de l'apoptose. La deuxième partie de ce modèle alternatif reste cependant à démontrer.

Au niveau du site inflammatoire, la durée de vie des neutrophiles est augmentée par la présence de différents médiateurs dont la cytokine pro-inflammatoire GM-CSF (Moulding *et al.*, 1998). Dans la première étude, nous montrons que cette cytokine abroge l'accumulation des céramides C₁₆ et C₂₄ 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 protéines à activité tyrosine kinase, de MAPK, des Jak/STAT et de la PI3K (Yousefi *et al.*, 1994 ; Brizzi *et al.*, 1996 ; Wei *et al.*, 1996 ; Al-Shami *et al.*, 1998 ; Chang et Karin, 2001 ; Cowburn *et al.*, 2002). Il a été montré que le GM-CSF augmente l'expression de deux membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-x_L (Weinmann *et al.*, 1999 ; Epling-Burnette *et al.*, 2001 ; Moulding *et al.*, 2001). Nos résultats, associés à ceux rapportés par les autres laboratoires, suggèrent que le GM-CSF induit l'expression de plusieurs protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-x_L et Mcl-1 mais inhibe également le processus de mort spontanée en inhibant la synthèse *de novo* des céramides C₁₆ et C₂₄. Des lors, nous apportons une nouvelle explication à l'effet anti-apoptotique du GM-CSF sur l'apoptose des neutrophiles et complétons notre modèle de l'apoptose spontanée des neutrophiles. La manière dont le GM-CSF inhibe l'accumulation des céramides n'est pas connue. Comme mentionné au paragraphe précédent, la S1P est un métabolite anti-apoptotique des céramides. Il a été montré que la S1P inhiberait l'apoptose induite par le TNF- α , le f-MLP, *etc.* (MacKinnon *et al.*, 2002 ; Chihab *et al.*, 2003). Une étude a montré que l'effet du GM-CSF sur l'apoptose des neutrophiles était aboli par un traitement des cellules avec un inhibiteur de la Sphingosine Kinase (MacKinnon *et al.*, 2002). Ceci suggère que le GM-CSF exercerait son effet en inversant le rapport de force entre le taux de céramides (pro-apoptotiques) et de S1P (anti-apoptotique). Cette hypothèse pourrait également expliquer nos résultats quant à l'action du GM-CSF sur l'accumulation des céramides. Des expériences complémentaires 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.

Comme développé dans l'introduction (chapitre III.2., p.28, relatif à l'apoptose des granulocytes), les neutrophiles expriment constitutivement le récepteur à DD, Fas (Liles *et al.*, 1996 ; Iwai *et al.*, 2003). Il a été montré que l'activation de Fas par des anticorps agonistes ou par liaison avec la forme soluble de son ligand (sFasL) accélère l'apoptose des neutrophiles (Iwai *et al.*, 2003). Nos résultats confirment ceux obtenus précédemment. Cependant, il n'y a pas de modification des taux de céramides C₁₆ et C₂₄ dans ce contexte. Ceci suggère que les mécanismes moléculaires de mort consécutifs à l'activation de Fas sont indépendants et complémentaires à ceux impliqués dans la mort spontanée de neutrophiles.

Le rôle déterminant des caspases dans l'apoptose spontanée des neutrophiles reste sujet à débat. En effet, il a été montré que les neutrophiles peuvent exhiber les stigmates morphologiques et biochimiques de l'apoptose précoce dans un contexte où les caspases ne sont pas actives (Harter *et al.*, 2001 ; Mecklenburgh *et al.*, 2002 ; Maianski *et al.*, 2003 ; Park *et al.*, 2007). De plus, la plupart des tests d'activation de caspases commercialisés nécessitent une lyse cellulaire, ce qui dans le cas de granulocytes est véritablement un problème. En effet, la lyse cellulaire signifie la libération et l'activation des nombreuses enzymes séquestrées dans les granules. Même si des inhibiteurs de protéases et de

phosphatases sont ajoutés au tampon de lyse, il est évident qu'une lyse cellulaire a des effets néfastes sur l'intégrité et le statut "inactif" des pro-caspases. C'est pour cette raison que nous avons choisi une méthode nouvelle de détection de l'activité des caspases, sans lyse cellulaire. Nos résultats montrent une faible activité des caspases. Ces résultats corroborent des expériences préliminaires (non présentées dans ce travail) au cours desquelles nous avons traité des neutrophiles avec des inhibiteurs de caspases sans jamais avoir pu observer de différence significative de la durée de vie des cellules traitées *versus* non traitées. Le rôle des caspases dans la mort spontanée des neutrophiles nécessite de plus amples investigations.

Beaucoup de lignées cellulaires cancéreuses sont caractérisées par une déficience dans les mécanismes régulateurs des enzymes qui métabolisent les céramides. Ces dérégulations participent, en outre, au développement des tumeurs et au processus de métastase (Kolesnick, 2002 ; Perry et Kolesnick, 2003 ; Reynolds *et al.*, 2004). Le contrôle du métabolisme des céramides apparaît donc de plus en plus comme une cible de choix dans le traitement de certaines maladies tumorales telles que les cancers de la prostate, du sein, du colon, et du poumon, ainsi que certains lymphomes et certaines leucémies. Egalement, il a été montré que des drogues chimiothérapeutiques ont un effet direct sur la concentration endogène en céramides. Ces drogues agissent sur la synthèse *de novo* des céramides inhibent les enzymes du catabolisme des céramides. Cependant, ces drogues ont de nombreux autres effets. Il serait donc intéressant de développer des drogues plus spécifiques telles que des molécules analogues des céramides ou des inhibiteurs des enzymes du catabolisme. Notre étude suggère que le développement de telles molécules pourrait aussi permettre une meilleure régulation de l'inflammation (Ogretmen et Hannun, 2001 ; 2004).

Les sous-populations granulocytaires présentes lors d'une inflammation sont en représentation variable en fonction de divers facteurs : nature de l'agent infectieux, composante allergique, composante génétique,... On distingue dès lors des inflammations neutrophiliques telles que celle rencontrée dans la BPCO (Bousquet *et al.*, 1990 ; Denburg, 1996) et des inflammations à éosinophiles souvent caractéristiques des inflammations allergiques telles que l'asthme ou la rhinite allergique (Holgate, 1999 ; Gelfand, 2004). Ces différences de sensibilisation, de recrutement et d'activation observées entre les neutrophiles et les éosinophiles sont dus au fait que ces cellules répondent différemment à des facteurs régulateurs de leur durée de vie tant endogènes (TNF- α , Il-5, *etc*) qu'exogènes (glucocorticoïdes, cyclosporine A, *etc*) (Cox, 1995 ; Meagher *et al.*, 1996 ; Barnes, 2003 ; Belvisi, 2004). D'un point de vue thérapeutique, il semble donc intéressant de pouvoir identifier des cibles différentielles pour chacun des types de granulocytes. De plus, les éosinophiles ont une durée de vie sensiblement plus longue que celle des neutrophiles Il est donc probable qu'il existe certaines différences dans les processus d'apoptose de chacun de ces deux sous-types granulocytaires. Il serait donc intéressant de réitérer la présente étude sur les céramides avec des éosinophiles et d'étudier le rôle des céramides dans l'apoptose spontanée des éosinophiles. Dans un modèle murin d'asthme, il a notamment été montré qu'un traitement par injection intra-péritonéale d' α -galactosyl-céramide (GCer) stimule les cellules NKT (*Natural killer T-cells*) qui vont inhiber drastiquement la réaction allergique en sécrétant de l'IFN- γ , une cytokine connue pour inhiber l'activation des lymphocytes Th₂ (Matsuda *et al.*, 2005 ; Morishima *et al.* 2005). Le GCer diminue également l'éosinophilie. Bien qu'il soit peu probable d'observer les mêmes résultats chez l'homme étant donné que la quantité relative des cellules NKT dans les poumons d'individus asthmatiques est inférieure à 2 % (Vijayanand *et al.*, 2007), un traitement avec des dérivés de céramides pourrait affecter les cellules immunes telles que les cellules dendritiques, les neutrophiles et les cellules NKT. En plus, leurs effets sur les cellules épithéliales seraient inverses puisqu'il a été montré qu'une augmentation du

taux de céramides dans des cellules épithéliales pulmonaires les protégeait de l'apoptose induite notamment par le monoxyde d'azote (Castillo *et al.*, 2007).

L'augmentation de la survie des éosinophiles contribue à l'accumulation de ces cellules effectrices au site de l'inflammation allergique (Walker *et al.*, 1991 ; Simon et Blaser, 1995 ; Simon *et al.*, 1998). En dépit de leur rôle important dans la physiopathologie de l'allergie, les mécanismes précis par lesquels les éosinophiles retardent leur mort programmée spontanée dans les désordres allergiques n'ont pas encore été complètement élucidés. Dans notre seconde étude, nous avons identifié une nouvelle voie régulatrice de l'apoptose spécifique des éosinophiles initiée par l'engagement de CD40. Dans un premier temps, nous avons confirmé les travaux d'Ohkawara et collaborateurs (1996), à savoir que (i) les éosinophiles expriment CD40 à leur surface, et que (ii) l'activation de CD40 augmente leur survie. Ensuite nous démontrons que l'augmentation de la survie des éosinophiles suite à l'engagement de CD40 se fait via l'expression de c-IAP2. Enfin, nous fournissons des évidences *in vivo* sur l'expression de c-IAP2 induit par CD40 dans des éosinophiles présents sur le site de l'inflammation allergique.

Ohkawara et collaborateurs (1996) ont rapporté que les éosinophiles sanguins provenant de patients allergiques expriment CD40 et que les IgA-Ic augmentent l'expression basale de CD40 dans ces cellules. Nos résultats diffèrent. Premièrement, comme nous le démontrons par des expériences d'immunodétection et de cytométrie en flux, la protéine CD40 n'est pas directement détectable sur les éosinophiles fraîchement isolés à partir de sang, d'individus sains ou allergiques. Nos travaux indiquent également que les éosinophiles sanguins placés en culture expriment spontanément du CD40 à leur surface après 24h de culture. Deuxièmement, dans leur étude, Ohkawara et collaborateurs (1996) ont montré que, comparés aux éosinophiles fraîchement isolés, l'expression de CD40 était substantiellement augmentée dans les éosinophiles sanguins placés en culture pendant 18h en présence des IgA-Ic. Cependant, la comparaison avec des éosinophiles contrôles, placés en culture 18h en absence des IgA-Ic, n'a pas été réalisée. En effet, nos résultats ont montré que les IgA-Ic sont incapables d'affecter le taux d'expression de CD40 dans les éosinophiles sanguins et que les IgA-Ic ne modulent d'aucune manière cette expression. Toutes ces observations suggèrent qu'il s'agit plus d'une expression spontanée de CD40 plutôt qu'une induction par les IgA-Ic qui a été observée après 18h de culture *in vitro* par Ohkawara et collaborateurs (1996).

L'IFN- γ et le GM-CSF sont des inducteurs potentiels de l'expression de CD40 dans divers types cellulaires. Bien que les éosinophiles possèdent à leur surface les récepteurs pour ces deux cytokines, elles n'augmentent pas l'expression de CD40 à leur surface. Cela laisse suggérer que les mécanismes moléculaires par lesquels l'IFN- γ et le GM-CSF induisent l'expression de CD40 sont déficients dans les éosinophiles ou que l'expression de CD40 est maximale induite par d'autres mécanismes constitutifs. La question de savoir ce qui induit l'expression de CD40 dans les éosinophiles reste ouverte. En effet nos résultats et ceux d'Ohkawara et collaborateurs (1996) indiquent clairement que de tels stimuli sont aussi bien présents dans le milieu de culture *in vitro* qu'*in vivo* au site de l'inflammation. De plus amples investigations sont nécessaires pour les identifier.

Nos résultats montrant que l'activation de CD40 induit un délai de l'apoptose des éosinophiles ont confirmé les résultats d'Ohkawara et collaborateurs (1996). De manière assez interpellante, l'inhibition de la possible auto-interaction CD40-CD40L entre éosinophiles, par mode auto- ou paracrine, ne semble jouer aucun rôle sur la survie des éosinophiles. La stimulation de CD40 est connue pour augmenter la survie des lymphocytes B via l'induction de plusieurs protéines anti-apoptotiques comme Bcl-x_L et Bfl-1/A1 (Lee *et al.*, 1999). Bien qu'il soit également connu que la protéine anti-

apoptotique c-IAP2 est induite par l'activation de CD40, aucun lien direct n'a encore été mis en évidence entre cette induction et l'augmentation de la survie des cellules B (Craxton *et al.*, 1998 ; Akyurek *et al.*, 2006). Les protéines de la famille des IAP sont connues pour supprimer l'apoptose induite par divers stimuli et ce dans plusieurs types cellulaires. Ces protéines interfèrent à différents niveaux dans la cascade apoptotique. Par exemple c-IAP1 et c-IAP2 se lient à la protéine TRAFF2 qui est essentielle pour l'activation du facteur transcriptionnel NF- κ B, facteur qui induit l'expression de gènes anti-apoptotiques. En outre c-IAP1 et c-IAP2 sont également des inhibiteurs directs des caspases effectrices -3 et -7. Dans notre cas, par immunodétection et la création de cellules *knockdown* pour c-IAP2, nous montrons de manière irréfutable que l'activation de CD40 protège les éosinophiles de la mort par apoptose, et ceci en partie grâce à l'induction de l'expression de c-IAP2. De plus, l'analyse de l'expression de c-IAP2 dans la fraction cellulaire de sputum riche en éosinophiles montre une corrélation évidente entre le niveau d'expression de c-IAP2 et le taux d'éosinophiles. Ceci nous fournit une sérieuse évidence quant au rôle de c-IAP2 dans la persistance de l'inflammation éosinophilique.

La contribution de l'interaction CD40-CD40L dans l'inflammation allergique des voies respiratoires a été étudiée chez des souris déficientes en CD40 ou CD40L. Ces études rapportent des conclusions contradictoires. En effet si Lei et collaborateurs (1998) concluent que l'activation CD40-CD40L joue un rôle essentiel dans le développement de l'inflammation allergique, Hogan et collaborateurs (1997) et Mehlop et collaborateurs (2000) proposent que l'interaction CD40-CD40L n'est pas nécessaire au développement de cette inflammation. Il est probable que cette différence entre ces conclusions provient des protocoles expérimentaux utilisés. En effet, Hogan et collaborateurs (1997) et Mehlop et collaborateurs (2000) ont mesuré le degré d'éosinophilie un jour après exposition des souris à l'allergène. A ce moment, le degré d'éosinophilie des souris CD40^{-/-} et CD40L^{-/-} est haut et équivalent à celui trouvé chez les souris sauvages. Lei et collaborateurs (1998), pour leur part, ont mesuré le degré d'éosinophilie 72 h après le challenge à l'allergène. A ce moment, les souris CD40^{-/-} montrent une réduction significative du pourcentage d'éosinophiles présents dans les voies respiratoires comparées aux souris sauvages. Puisque nos résultats et ceux d'Ohkawara et collaborateurs (1996) démontrent une survie augmentée des éosinophiles suite à leur stimulation par CD40-CD40L, les résultats obtenus avec les souris CD40^{-/-} et CD40L^{-/-} s'éclaircissent et soutiennent désormais un modèle : l'interaction CD40-CD40L n'intervient pas au début du développement de l'éosinophilie provoquée après exposition à un allergène, mais est plutôt requise pour le maintien de cette inflammation.

Récemment, il a été montré que les éosinophiles isolés à partir de sang de patients atteints du syndrome hyperéosinophilique ont une expression augmentée des protéines c-IAP2 et survivine (famille des IAP). *In vitro*, le traitement d'éosinophiles sanguins provenant de sujets sains avec de l'Il-5 et -3 augmente le niveau d'expression de ces deux protéines. Vassina et collaborateurs (2006) ont montré que l'effet anti-apoptotique induit par c-IAP2 et la survivine se traduit par une inhibition de l'activité de la caspase-3.

CD40L est exprimé par différentes cellules immunes dont les lymphocytes Th₂. Cellules reconnues comme les chefs d'orchestre de la réaction allergique. Les lymphocytes Th₂, sont les principaux producteurs de GM-CSF, de l'Il-5 et de l'Il-3 (Holgate, 1999). Cytokines qui augmentent la survie des éosinophiles et contribuent ainsi largement à l'accumulation des éosinophiles au site de l'inflammation dans les maladies allergiques (Walker *et al.*, 1991 ; Simon et Blaser, 1995). Il est donc évident que pouvoir empêcher ces cytokines d'agir serait utile dans la résolution de l'inflammation. En outre, il est connu que CD40L participe au développement de l'inflammation allergique notamment en activant les cellules dendritiques (Gilliet *et al.*, 2003), en inhibant l'action immunosuppressive des lymphocytes T régulateurs (Treg) et en orientant la commutation isotypique vers les IgE dans les lymphocytes B (Scott *et al.*, 1986 ;

Banchereau *et al.*, 1994 ; Caux *et al.*, 1994 ; Kehry, 1996). Dès lors, nos résultats nous encouragent à postuler que CD40, CD40L et c-IAP2 peuvent être des cibles pharmacologiques clés en vue de contrôler plus efficacement l'inflammation allergique.