



THESE DE DOCTORAT
EN COTUTELLE INTERNATIONALE



N°.....

N°.....

Présentée devant

L'Université de Bourgogne
Ecole Doctorale des Sciences de
la Vie et de la Santé, FRANCE

et

L'Université d'Abomey-Calavi
Ecole Doctorale des Sciences de
la Vie, BENIN

Pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne et de l'Université d'Abomey-Calavi

Mention: Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité: Physiologie Cellulaire et Moléculaire

Par

Eugène Sèlidji ATTAKPA

Le 28 Septembre 2010

Rôle du Récepteur nucléaire
d'Activation et de Prolifération des
Peroxisomes (PPAR- α) dans la
modulation de l'inflammation et
l'activation des cellules T.

Composition du Jury:

<i>Président:</i>	Professeur Gbéassor F. Messanvi	<i>Université de Lomé (Togo)</i>
<i>Rapporteur:</i>	Professeur Séri V. Bialli	<i>Université de Cocody (Côte d'Ivoire)</i>
<i>Rapporteur:</i>	Professeur Akpona A. Simon	<i>Université de Parakou (Bénin)</i>
<i>Examineur:</i>	Professeur Moutairou A. Kabirou	<i>Université d'Abomey-Calavi (Bénin)</i>
<i>Directeur de thèse:</i>	Professeur Naim A. Khan.	<i>Université de Bourgogne (France)</i>
<i>Directeur de thèse:</i>	Professeur Karim L. Dramane.	<i>Université d'Abomey-Calavi (Bénin)</i>

Année 2009-2010



INTRODUCTION GENERALE

Plusieurs études ont démontré l'importance du système immunitaire et de l'état inflammatoire chez les sujets obèses et diabétiques de type 2 (Rabinovitch, 1994 ; Rengarajan et coll., 2000). Cette observation est fondée sur le fait que l'insulino-résistance est liée à l'augmentation des médiateurs pro-inflammatoires chez ces sujets. De plus, il a été rapporté que les adipokines (adiponectine et leptine), libérées par les adipocytes, modulent également l'état inflammatoire lors de l'installation de ces pathologies. Le système immunitaire, particulièrement l'immunité à médiation cellulaire, jouerait un rôle primordial dans l'équilibre de l'état anti- inflammatoire et pro-inflammatoire lors du développement de l'insulino-résistance. On se propose alors d'étudier le **rôle du Récepteur nucléaire d'Activation et de Prolifération des Peroxysomes (PPAR- α) dans la modulation de l'inflammation des tissus adipeux et l'activation des cellules T.**

Les acides gras alimentaires jouent un rôle important dans la santé et les pathologies humaines. Ils sont les composants structuraux fondamentaux des membranes cellulaires, mais ils interviennent également dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire. Depuis plus d'une vingtaine d'années, des études épidémiologiques, cliniques et expérimentales ont montré que les acides gras polyinsaturés (AGPI) de la famille n-3, présents en quantités importantes dans les poissons, exercent un rôle protecteur au cours de certaines pathologies. Les premières études, concernant les effets bénéfiques des huiles de poisson, datent des années 70 et l'une des études pionnières, bien connue à l'heure actuelle, est l'étude réalisée par les Danois chez les esquimaux du Groenland dont l'alimentation est en grande partie constituée de poissons. Les résultats ont montré que cette population d'individus était relativement peu touchée par les maladies cardio-vasculaires ou par des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Bang et coll., 1980). Quelques années plus tard, Kromhout et coll. (1985) ont démontré que la consommation quotidienne de 30g de poisson par jour diminue le risque de l'accident coronarien. Ainsi, les premiers effets bénéfiques des AGPI n-3 concernaient plutôt les maladies cardio-vasculaires.

La plupart des pathologies dans lesquelles les AGPI n-3 exercent un effet protecteur, semblent reposer sur un processus inflammatoire. Aussi, le rôle des AGPI n-3 sur le système immunitaire est devenu l'objet de nombreuses investigations. Quelques études chez l'homme ont été réalisées et divers paramètres immunitaires ont été pris en compte, suite à un enrichissement de l'alimentation en AGPI n-3. Des effets bénéfiques d'un tel enrichissement ont été observés dans le cadre de la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, le lupus

érythémateux ou encore chez des patients ayant subi une transplantation rénale (Block et coll., 1996). **L'effet majeur des AGPI n-3 est leur activité immunomodulatrice.** Dans cette famille d'acide gras, l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) sont biologiquement plus puissants que l'acide α -linoléique (ALA). Les études réalisées chez les animaux indiquent que des régimes enrichis en EPA et DHA exercent des effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs *in vivo* (Miles et Calder, 1998 ; Calder 2001). Cependant, les études d'intervention chez l'homme sont assez peu nombreuses. Les paramètres génétiques influencent également la sensibilité des individus au régime (Calder, 2001 ; Fritsche, 2006). Par exemple, les sujets âgés semblent être plus sensibles à l'effet immunosuppresseur des AGPI n-3 que les jeunes adultes (Meydani et coll., 1991) et répondent à des doses modérées (Thies et Coll., 2001b) ainsi qu'à des faibles doses journalières de n-3 (600mg/j d'huile marine, dont 150mg de DHA + 30mg d'EPA) (Bechoua et coll., 2003). Les expériences réalisées *in vitro* montrent que les AGPI n-3 sont capables de diminuer la prolifération des lymphocytes murins et humains (Calder, 1995). Ces acides gras affectent plus spécifiquement l'immunité à médiation cellulaire comme la prolifération des lymphocytes T aux mitogènes et la production de certaines cytokines comme l'interleukine-2 (Calder et coll., 2002). Cependant, leurs effets immunosuppresseurs dépendent également de la concentration à laquelle ces acides gras sont utilisés. En effet, il a été mis en évidence qu'à faibles doses ($< 3 \mu\text{M}$) (Kelly et Parker, 1979) ils stimulent la prolifération, alors qu'à des concentrations plus élevées ($> 30 \mu\text{M}$) ils inhibent cette prolifération (Calder et coll., 1991 ; Calder et Newsholme, 1992 ; Brouard et Pascaud, 1993). L'ensemble des études, tant *in vivo* qu'*in vitro*, montre que les AGPI n-3 ont la capacité de moduler les réactions inflammatoires et auto-immunes. Toutefois, les mécanismes moléculaires qui sous-tendent leurs actions bénéfiques sont mal connus. Bien qu'une partie de leurs effets puisse être liée à la modulation de la production des eicosanoïdes issus du métabolisme oxygéné de l'acide arachidonique, acides gras majoritairement présent au niveau des phospholipides membranaires, **les AGPI n-3 peuvent également moduler les voies de signalisation intracellulaire, ainsi que l'activité de certains facteurs de transcription (Miles et Calder, 1998).**

Dès lors nous avons émis l'hypothèse selon laquelle un apport alimentaire riche en AGPI n-3 pourrait permettre leur incorporation dans les phospholipides membranaires. Parmi les voies de signalisation contrôlant la croissance cellulaire, le signal calcique ainsi que l'homéostasie du pH intracellulaire jouent un rôle clé car ils interviennent dans les étapes très précoces de l'activation des cellules. **Nous nous sommes donc proposé d'étudier l'effet du DHA sur l'activation des cellules T isolées des souris PPAR α -null et des souris PPAR α .**

Plusieurs études ont identifié l'expression du PPAR α sur les cellules T et B et son expression semble diminuer lors de l'activation lymphocytaire (Cunard et coll., 2002 ; Jones et coll., 2002).

Les ligands du PPAR α régulent l'inflammation car ils influencent la différenciation de cellules Th1 (Marx et coll., 2002). Ces ligands augmentent l'expression de l'IL4, une cytokine des cellules Th2 (Cunard et coll., 2002).

La plupart des résultats suggèrent que le PPAR α jouerait un rôle immunosuppresseur et favoriserait l'immunité Th2. Le fénofibrate, un ligand du PPAR α , augmente l'expression *in vivo* de l'IL-10 chez le rat atteint de myocardite auto-immune (Maruyama et coll., 2002). Les mêmes chercheurs ont démontré que les agonistes des PPAR α , tels que WY14, 643 diminuent la production de l'IFN- γ . Le gemfibrozil et le fénofibrate diminuent la libération de l'IFN- γ et augmentent celle de l'IL4 (Maruyama et coll., 2004). Il semblerait qu'il existe une interaction entre la voie de signalisation des PPAR et les facteurs de transcription tels que les STAT et GATA (Yang et coll., 2000). Il est à souligner que lors de la différenciation des cellules Th0 en Th2, le STAT-6 est transloqué vers les noyaux et aboutit à l'expression du GATA-3, un régulateur de la différenciation du phénotype Th2 (Kurata et coll., 1999). Il a été mis en évidence la spécificité du mécanisme d'action de ces acides gras en ce qui concerne leur intervention au niveau de la signalisation cellulaire au cours de l'activation cellulaire T : ils diminuent l'activation de NF-Kb (Denys et coll., 2005), la phosphorylation de ERK1/ERK2 (Denys et coll., 2004 ; 2001), le pH intracellulaire et modulent l'activité de différentes isoformes de protéine kinase C (Madani et coll., 2001) et de RAsGRP (Madani et coll., 2004). **Nous nous sommes donc posé la question de savoir si les AGPI n-3 et les agonistes de PPAR α peuvent moduler ces situations physiologiques, en partie, via leurs effets immunomodulateurs.**

De nombreuses études ont démontré que l'alimentation pouvait jouer un rôle essentiel dans l'amélioration des complications liées à la pathologie du diabète. En effet, plusieurs chercheurs ont observé que des régimes riches en huiles de poissons présentaient des effets bénéfiques dans les maladies inflammatoires et cardiovasculaires (Calder, 1999; Hunkar et coll., 2002; Merzouk et Khan, 2003). Cependant, nous ne disposons d'aucune étude sur les expressions de GATA-3 et de T-bet en présence du PPAR α lors de la différenciation lymphocytaire. **Quel est alors le rôle du DHA sur les expressions de ces facteurs de transcriptions ?**

En effet, lors de l'activation des cellules T, les voies de signalisation convergent vers l'activation des MAP kinases ERK1/2, qui sont importantes pour la prolifération cellulaire. De plus, il a été mis en évidence au laboratoire que le DHA inhibe les MAP kinases dans les lymphocytes T Jurkat. **L'anti CD3 et L'anti CD28 sont-ils capables d'induire l'activation de ERK1/2 ; cjun kinase ; et de p38 MAPK ? le DHA peut-il moduler cette activation ?**

Fort de ces différentes observations, nous présenterons notre thèse de la façon suivante:

- *La première partie de cette thèse, consacrée au contexte scientifique et problématique, comporte quatre chapitres. Dans le premier chapitre, nous présentons la biosynthèse, la biodisponibilité et les effets biologiques des AGPI n-3. Le second chapitre fait état du système immunitaire, des cellules immunocompétentes et du rôle des lymphocytes T. Le troisième chapitre fait état des connaissances actuelles concernant les mécanismes moléculaires par lesquels les AGPI n-3 pourraient exercer leurs effets immunosuppresseurs. Enfin dans le chapitre 4 nous parlerons des mécanismes moléculaires des PPARs, les AGPI n-3 et de leurs rôles physiologiques.*
- *La deuxième partie rassemble les publications tirées des résultats de nos travaux,*
- *La troisième partie présente la discussion des différents résultats publiés et les perspectives qu'offrent les résultats de nos expériences.*

PARTIE I

**CONTEXTE SCIENTIFIQUE
ET PROBLEMATIQUE**

Chapitre 1.

Les acides gras poly-insaturés (AGPI) de la famille n-3 : biosynthèse, biodisponibilité, effets biologiques

1.1. Acides gras poly-insaturés et lipides

Les acides gras sont constitués d'une chaîne hydrocarbonée de longueur variable présentant un groupement carboxylique à une de ses extrémités. Grâce à cette fonction carboxylique l'acide gras crée une liaison ester avec les groupements hydroxyles du glycérol, squelette de base pour former les triglycéryls et les phospholipides. La chaîne hydrocarbonée peut comporter une ou plusieurs doubles liaisons (insaturation). La nomenclature des acides gras basée sur la longueur de la chaîne carbonée est définie par le nombre d'atome de carbone et le nombre de double liaison. La famille est identifiée par le sigle n- ou ω- suivi d'un chiffre indiquant la position de la première double liaison par rapport à l'extrémité -CH₃ (méthyle) de la chaîne de carbone. L'acide docosahexaénoïque (DHA) est un acide gras à 22 atomes de carbone, comportant 6 doubles liaisons, dont la première se situe au niveau du 3ème atome de carbone à partir de l'extrémité -CH₃. Il appartient donc à la famille n-3 et est désigné par 22 : n-3.

Il faut cependant savoir qu'il existe quatre familles d'acides gras insaturés : la famille n-9, n-7, n-6, n-3. Ces acides gras peuvent être synthétisés par la cellule à partir de leurs précurseurs, ou apportés par l'alimentation sous forme estérifiée.

1.2 Biosynthèse des AGPI

Chez l'homme, les acides polyinsaturés à longue chaîne sont synthétisés à partir de deux précurseurs, l'acide linoléique (C₁₈:2 n-6, LA) pour la famille n-6 et l'acide α-linolénique (C₁₈:3 n-3, ALA) pour la famille n-3 (**figure 1**). Ces deux acides gras sont dits « acides gras essentiels » car ils sont nécessaires pour la croissance normale et les fonctions physiologiques des tissus, mais ne peuvent pas être synthétisés par l'Homme ou l'animal. Seules les enzymes des plantes (Δ¹²- et Δ¹⁵-désaturases respectivement) sont capables d'insérer des doubles liaisons en n-6 et n-3. « L'essentialité » de l'acide linoléique a été démontrée chez l'homme dans les années 1950-1960 (Adam et coll., 1958 ; Hansen et coll., 1958), sur des nourrissons recevant du lait de vache demi-écrémé comportant seulement

0,1% de l'énergie sous forme d'acide linoléique. Ce régime pauvre en acide linoléique entraînait une diminution de la prise de poids journalière. Ces symptômes étaient corrigés par apport en acide linoléique. (Tinoco *et coll.*, 1978).

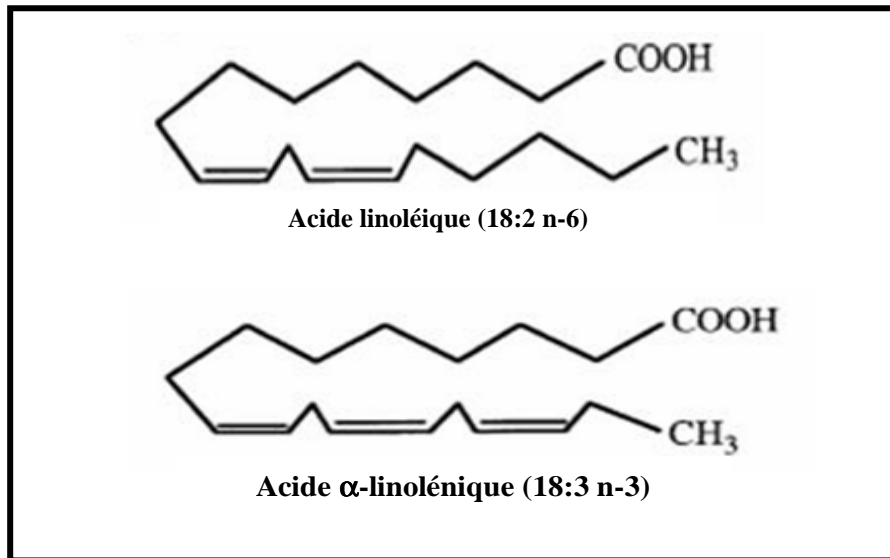


Figure 1 : Structure de l'acide linoléique et de l'acide α-linolénique.

(Tinoco *et coll.*, 1978).

Bien que les cellules des mammifères ne soient pas capables de synthétiser les acides gras linoléiques et α-linolénique, elles peuvent, par un double système enzymatique, allonger la chaîne carbonée et ajouter des doubles liaisons, des acides gras polyinsaturés à plus longue chaîne et biologiquement actifs. Les principaux AGPI de la famille n-6 sont l'acide γ-linoléique (20 :3n-6, GLA) et l'acide arachidonique (20 :4n-6, AA). Les AGPI de la famille n-3 ont pour principaux représentants : eicosapentaénoïque (20 : 5n-3, EPA) et l'acide docosahéaénoïque (22 :6 n-3, DHA) (**figure 2**).

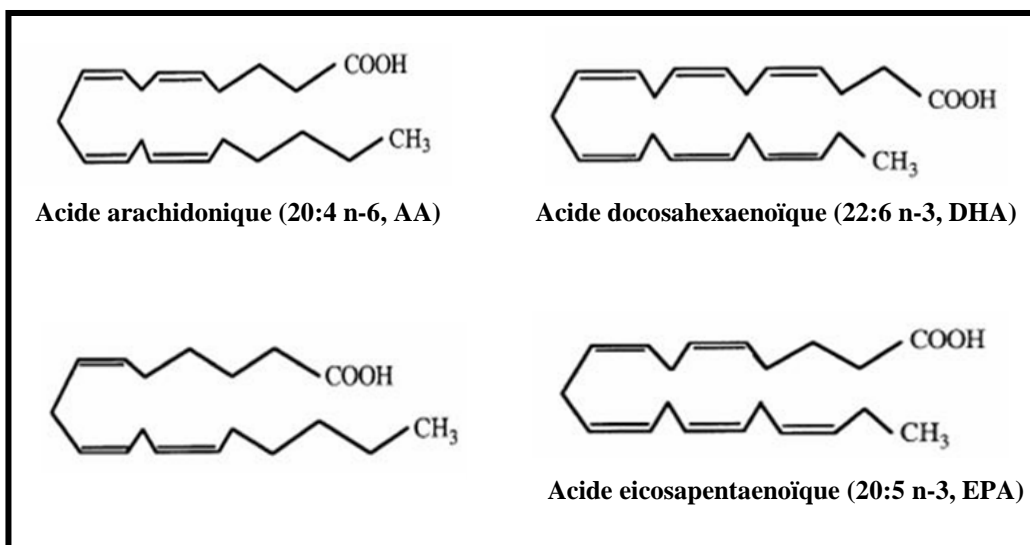


Figure 2 : Principaux AGPI des familles n-3 et n-6. (Tinoco *et coll.*, 1978).

La régulation de la biosynthèse des acides gras se fait par un double système enzymatique qui fabrique continuellement les AGPI n-3, n-6 et n-9. Ces deux enzymes sont les élongases et les désaturases (**Figure 3**). Les élongases augmentent la longueur de la chaîne, les désaturases augmentent le nombre d'insaturations. Les désaturases agissent dans des régions spécifiques des acides gras mais ne sont pas spécifiques d'un acide gras, ce qui entraîne une compétition de substrat vis-à-vis de ces enzymes. Les désaturases sont au nombre de 5 : les $\Delta 9$, $\Delta 6$, $\Delta 5$ communes aux animaux et végétaux et les $\Delta 12$, $\Delta 15$ spécifiques aux végétaux. Les $\Delta 12$, $\Delta 15$ permettent la synthèse de l'acide linoléique, précurseur des AGPI de la famille n-6 et de l'acide alpha-linolénique, précurseur des AGPI de la famille n-3. Il est important de respecter un équilibre d'apport entre les deux précurseurs du fait de la compétition de substrat dans les voies de désaturation et d'élongation. Ce potentiel enzymatique est sensible à l'âge et à la qualité alimentaire. Lorsque l'acide gras devient de plus en plus insaturé, la molécule se tord de plus en plus, entraînant au niveau membranaire un empilement de phospholipides de moins en moins compact, ce qui augmente la fluidité membranaire.

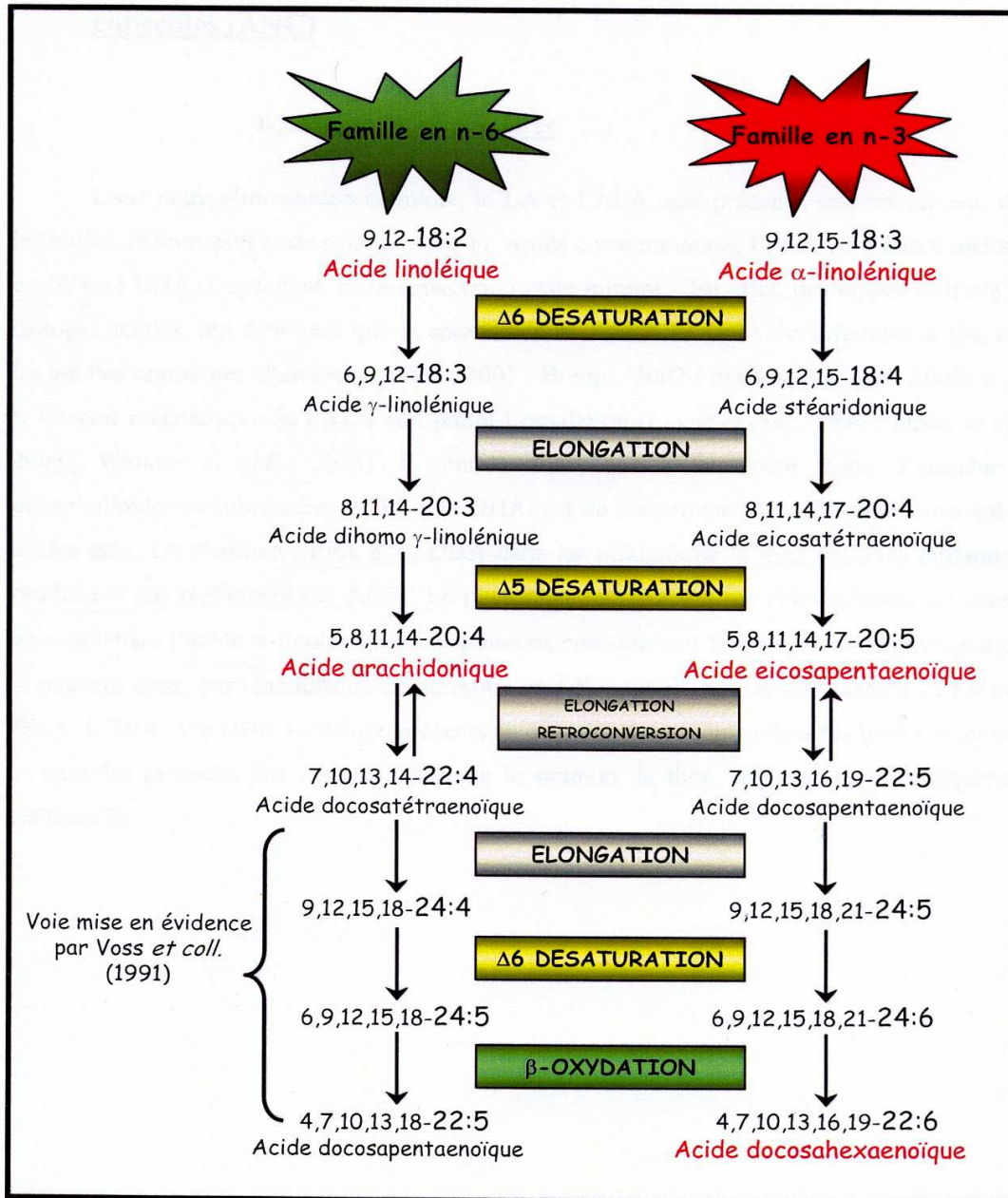


Figure 3 : Représentation schématique de la biosynthèse des AGPI des familles n-6 et n-3.
D'après (Voss et coll., 1991).

1.3 Source alimentaire des AGPI et apports nutritionnels conseillés (ANC)

1.3.1 Sources alimentaires

Les AGPI de la famille n-6 proviennent essentiellement des huiles végétales et animales (**Tableau I**). L'acide linoléique (C18:2n-6) représente 50 à 70 % des acides gras présents dans les huiles de maïs, noix, tournesol. Les huiles de soja, colza et noix sont les principales sources végétales d'acide alpha-linolénique (C18:3n-3). Les principaux acides gras poly-insaturés (AGPI) de la famille n-3 sont les acides alpha-linolénique (18:3n-3 ou ALA), eicosapentaénoïque (20:5n-3 ou EPA) et docosahexaénoïque (22:6n-3 ou DHA). L'acide alpha-linolénique est également formé dans les chloroplastes du phytoplancton. Ce phytoplancton est ensuite consommé par les poissons qui, par une série de réactions de désaturation et d'élongation transforment l'acide alpha-linolénique en EPA puis en DHA. Les AGPI de la famille n-3 sont alors extraits principalement des huiles de poisson (**Tableau II**). Chez l'homme, ces acides gras poly-insaturés à longue chaîne sont apportés par l'alimentation sous forme estérifiée dans les triglycérides ou les phospholipides. Les acides gras poly-insaturés à longue chaîne sont également synthétisés, chez l'homme, par élongation et désaturation successives à partir des deux précurseurs, l'acide linoléique pour la famille n-6 et l'acide alpha-linolénique pour la famille n-3. Ces deux acides gras sont dits essentiels.

Tableau I : Teneurs (mg/100g) en acide linoléique et α -linoléique des principales huiles végétales et des graisses animales. D'après (Favier et coll., 2000)

Sources alimentaires	Acides gras essentiels (mg/100 g)	
	Acide linoléique (n-6)	Acide α -linoléique (n-3)
Huiles végétales		
- arachide	20 à 29	traces
- colza		90
- maïs	55	
- noix	69 à 78	3 à 13
- olive	7	traces
- pépin de raisin	70	traces
- soja	50 à 60	6 à 10
- tournesol	55 à 65	traces
Graisses animales		
- bœuf	2	0,5
- oie	6,5	
- poisson		contient des dérivés
- porc (saindoux)	8	traces
- beurre	3 à 5	
- lait	4 à 8	
- jaune d'œuf		

Tableau II : Contenu (g/100 g) en EPA (20:5 n-3) et DHA (22:6 n-3) de certains aliments d'origine marine. D'après (Favier et coll., 2000)

Sources alimentaires	EPA (20:5 n-3)	DHA (22:6 n-3)
Morue	0,1	0,2
Hareng	0,7	0,9
Maquereau	0,9	1,6
Saumon	0,3	0,9
Crabe	0,2	0,1
Crevette	0,3	0,2
Huître	0,3	0,2
Huile de foie de morue	9,0	9,5

1.3.2 Les apports nutritionnels conseillés

Il est proposé que 30% à 35% de l'apport énergétique total de la ration journalière soient apportés par les lipides, 10% à 14% par les protéines et 50% à 55% par les glucides. Sur cette base, des apports nutritionnels conseillés (ANC) pour les acides gras ont été fixés chez l'adulte sain à partir de données expérimentales, épidémiologiques et cliniques et ont été réactualisés en 2001. Les valeurs des ANC ont été fixées dans un objectif d'optimisation des apports, compte tenu de l'état des connaissances scientifiques. En ce qui concerne les AGPI, il est recommandé que le rapport 18 :2 n-6/18 :3 n-3 tende vers 5 afin d'éviter une compétition excessive entre la biosynthèse des dérivés à longue chaîne de la famille n-6 et ceux de la famille n-3. Les recommandations suggèrent également que l'apport quotidien en AGPI à longue chaîne (AGPI-LC) de la famille n-3 soit de 0,5 g, dont 0,1 g sous forme de DHA (**Tableau II.**).

Les enquêtes de consommation dans la population française mettent en évidence que l'apport en acide α -linoléique est insuffisant et est loin de couvrir les ANC, en particulier pour ce qui concerne la proportion acide linoléique/acide α -linoléique. Ces enquêtes mettent également en évidence que les apports en AGPI de la famille n-3 sont insuffisants et correspondent environ au tiers des apports recommandés. D'après ces mêmes enquêtes, il apparaît également que ce sont les produits issus d'animaux terrestres qui assurent l'essentiel de l'apport en AGPI n-3 (entre 50% et 70% des apports avec une place particulière pour les produits laitiers). Il semble également que le déficit en AGPI n-3, amplifié par un rapport n-6/n-3 excessif (environ 15 au lieu de 5) soit la cause de nombreux désordres physiologiques tels que les maladies cardio-vasculaires. C'est pourquoi cette insuffisance d'apport en AGPI n-3 (acide α -linoléique et EPA/DHA) a conduit à promouvoir une augmentation des apports via la consommation d'aliments contenant naturellement (poisson gras, huile de lin...) ou des aliments éventuellement enrichis (œufs, margarines, lait, pain) afin de couvrir les ANC.

Tableau III : Tableau de synthèse des apports nutritionnels conseillés en acides chez l'adulte.

D'après Martin (2001)

		Homme adulte		Femme adulte		Femme enceinte		Femme allaitante		sujets âge	
Apport énergétique total (Kcal/j)		2200		1800		2050		2250		1700	
		g/j	% AET	g/j	% AET	g/j	% AET	g/j	% AET	g/j	% AET
Acides gras saturés		19,5	8	16	8	18	8	20	8	15	8
Acides gras monoinsaturés		49	20	40	20	45,5	20	50	20	38	20
A	Acide linoléique (C18 :2 n-6)	10	4	8	4	10	4,4	11	4,4	7,5	4,4
G	Acide linoléique (C18 :3 n-3)	2	0,8	1,6	0,8	2	0,9	2,2	0,9	1,5	0,9
P	AGPI-LC	0,5	0,2	0,4	0,2	1	0,4	1	0,4	0,4	0,4
I	DHA	0,12	0,05	0,1	0,05	0,25	0,1	0,25	0,1	0,1	0,1
Apport lipidique total		81	33	66	33	76,5	33,7	84,2	33,7	62,5	33,7

AGPI-LC : Acides gras polyinsaturés (AGPI) à longue chaîne des familles n-6 et n-3

DHA : Acide docosahexaénoïque (C22 : 6 n-3)

1.3.3 Effets cardio-protecteurs

De nombreuses études ont mis en évidence que les acides gras de la famille n-3 sont favorables à la prévention de maladies cardio-vasculaires (Kromann et Green, 1980; Kromhout, 1989; Prichard et coll., 1995). Leurs actions sont multiples : prévention des arythmies, action anticoagulante, modulation de la croissance cellulaire dans la paroi des artères, amélioration de l'hémodynamique vasculaire, régulation de la pression artérielle et action hypolipidémiant. En effet, il a été également observé que ces acides gras diminuent les triglycérides plasmatiques. De plus, il se produit une baisse de synthèse des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) concomitante à l'augmentation des lipoprotéines de haute densité (HDL) permettant d'épurer les vaisseaux des lipides excédentaires (Fumeron et coll., 1991. Sanchez-Muniz et coll., 1999). Ces résultats bénéfiques, dans les maladies cardio-vasculaires, sont également dus aux effets vasodilatateurs exercés par ces acides gras sur les endothéliums (De Caterina et coll., 2000).

1.3.4 Effets anticancéreux

Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence que le DHA et l'EPA inhibent le développement de certains cancers. Dans les modèles d'études de cancérogenèse mammaire, les huiles de poissons inhibent la croissance tumorale et la prolifération des métastases (Carroll, 1992). Il a été démontré que l'acide α -linoléique (ALA), précurseur des acides gras n-3, a un plus fort effet inhibiteur de la croissance des tumeurs mammaires et des métastases que l'EPA et le DHA. A l'opposé, les acides gras n-6, en l'absence des n-3, sont des promoteurs de cancer du sein. Les acides gras n-3 n'exercent pas d'effet inhibiteur sur ce type de cancer lorsque les n-6 sont en apport trop élevés. Ce n'est que lorsque les apports en n-3 et n-6 sont équivalents que les effets anti-tumoraux des acides gras n-3 sont visibles. Ainsi, les acides gras n-3 exercent des effets antagonistes sur la stimulation tumorale induite par les n-6. Les effets anticancéreux des acides gras sont liés à la régulation des cellules tueuses ou à l'effet apoptotique des AGPI (Begin et coll., 1986; Reddy et coll., 1991).

1.3.5 Effets sur le système nerveux central

La présence de DHA, en concentration élevée, dans les membranes des cellules cérébrales (Martinez, 1992), rend compte de son importance dans le fonctionnement du système nerveux central. Des expériences de carence en DHA, menées sur les rats et les singes, ont mis en évidence que les capacités d'apprentissage et d'attention dépendent de cet acide gras (Lauritzen et coll., 2001). Au-delà de ces études, des résultats suggèrent que des anomalies du métabolisme des AGPI seraient impliquées dans le développement de certains troubles psychiatriques (Horrobin, 1998), tels que la schizophrénie (Horrobin, 1998), la dépression (Edwards et coll., 1998 ; Maes et coll., 1999; Bruinsma et Taren, 2000), l'hyperactivité de l'enfant (Burgess et coll., 2000). Certains travaux rendent compte des mécanismes engendrés par une carence en cet acide gras. Outre les modifications des propriétés des membranes, des changements concernant la neurotransmission, notamment la capacité de libérer un ou plusieurs neurotransmetteurs au moment de la stimulation nerveuse, sont observés. Ainsi, l'état de carence en AGPI n-3 affecte la fonction de plusieurs systèmes de neurotransmission, notamment les voies monoaminergiques (dopamine et sérotonine) (Delion et coll., 1997; Chalon et coll., 2001; Zimmer et coll., 2002).

1.3.6 AGPI n-3 et apoptose

L'AA, l'EPA, le DHA et leurs métabolites peuvent induire l'apoptose des cellules tumorales sans affecter les cellules normales (Siegel et coll., 1987 ; Calviello et coll., 1998 ; Finstad et coll., 1998). Cet effet semble dépendre de l'habilité des acides gras à générer des radicaux libres (Das, 1991 ; 1999). Calviello et coll. (1998) ont montré que l'EPA et le DHA agissent selon deux mécanismes différents sur le contrôle du développement des tumeurs. L'effet anti-tumoral de cellules cancéreuses (Calviello et coll., 1998) des AGPI semblent avoir un effet protecteur contre le processus d'apoptose dans les cellules normales à l'opposé cellules cancéreuses soumises à des acides gras saturés, tels que l'acide palmitique (16:0) (Calviello et coll., 1998).

Le mécanisme d'action du DHA n'est pas encore connu. Cependant, selon certains auteurs, l'activation de la protéine Fas des cellules Jurkat-T serait impliquée (Weis et coll., 1995 ; Wolf et coll., 1997 ; Zhou et coll., 1998). Le système Fas/Fas Ligand est critique pour le

déclenchement de l'apoptose dans un nombre important de types cellulaires. Lorsque les cellules sont incubées avec le DHA, il en résulte une augmentation de l'expression de Fas et de la sécrétion de son ligand qui induit l'apoptose (Siddiqui et coll., 2001).

1.3.7 Effets des AGPI n-3 sur l'acuité visuelle

Comme le cerveau, la rétine est une importante source de DHA (Martinez M ,1992). Une carence dans l'alimentation entraîne une diminution des taux de DHA à ce niveau. Il en résulte un électrorétinogramme anormal et une diminution de l'acuité chez le singe (Neuringer et coll., 1986). De plus, Polit et coll. (2001) ont démontré, *in vitro*, que le DHA est essentiel pour la survie et la différenciation des photorécepteurs au cours du développement. En effet, lorsque les photorécepteurs sont cultivés sans DHA, après 4 jours un effet apoptotique est observé (Polit et coll., 2001).

L'ensemble de ces observations suggère que les AGPI de la famille n-3, en particulier l'EPA et le DHA, ont un rôle important dans la modulation et la prévention d'un certain nombre de pathologies, bien que certaines études fournissent un éclairage quelque peu controversé concernant notamment la relation entre l'effet observé et les doses utilisées. Il est donc d'intérêt de santé publique que leurs apports soient rééquilibrés (augmentation actuellement nécessaire en France) au niveau des apports nutritionnels conseillés. Les effets des acides gras sur les maladies inflammatoires et auto-immunes ont été également mis en évidence. Depuis les années 1980-1990, de nombreuses études ont été réalisées sur la régulation de certaines fonctions du système immunitaire par les AGPI. Cependant, les mécanismes par lesquels ils exercent leurs effets ne sont pas encore clairement élucidés. Ces aspects seront exposés dans les chapitres suivants et seront en relation avec le système immunitaire.

Chapitre 2

Système immunitaire et cellules immunocompétentes : Rôle des lymphocytes T

2.1 Système immunitaire (SI) et cellules immunocompétentes

2.1.1 Système immunitaire

Notre environnement est peuplé de nombreux microorganismes : virus, bactéries, levures, protozoaires et parasites multicellulaires. Après infection, ces microorganismes peuvent provoquer des maladies qui, dans certains cas, conduisent à la mort s'ils se multiplient de façon incontrôlée. Cependant, la plupart des infections guérissent rapidement et laissent peu de séquelles. Ceci est dû au système immunitaire qui protège notre organisme des agents infectieux.

Des réponses immunitaires très diversifiées sont nécessaires pour pouvoir lutter contre les différents types d'agents infectieux. Le lieu de l'infection et la nature de l'agent infectieux déterminent quel type de réponse immunitaire sera efficace.

Toute réponse immunitaire implique d'abord la reconnaissance du non-soi, qu'il s'agisse d'un pathogène ou de tout autre substance étrangère, puis une réaction destinée à les éliminer se met en place. Les réponses immunitaires peuvent être classées en deux grandes catégories : la réponse immunitaire naturelle (ou non adaptative) et la réponse immunitaire adaptative.

2.1.1.1 Immunité naturelle

Les premières cellules sanguines assurant la première ligne de défense de l'organisme contre toute infection sont les cellules phagocytaires telles que les monocytes, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles. Ces cellules captent les microorganismes, les internalisent puis les détruisent. Elles utilisent des systèmes de reconnaissance primitifs, non

spécifiques qui leur permettent de s'attacher à des produits microbiens très divers ; c'est pourquoi elles sont responsables des réponses immunitaires naturelles.

2.1.1.2 Immunité adaptative

Les réponses adaptatives sont essentiellement dues à un deuxième groupe de leucocytes constitué par les lymphocytes. Ces cellules reconnaissent les microorganismes de façon spécifique, que ceux-ci soient à l'intérieur des cellules de l'hôte ou à l'extérieur dans les liquides biologiques. Il existe plusieurs types de lymphocytes qui peuvent être classés en deux grandes catégories : les lymphocytes T (ou cellules T) et les lymphocytes B (ou cellules B). Les cellules B s'attaquent aux microorganismes extracellulaires et à leurs produits en sécrétant des anticorps, qui reconnaissent spécifiquement l'antigène et se lient à lui. L'antigène peut être une molécule à la surface d'un microorganisme ou bien une toxine produite par un agent infectieux. Les lymphocytes T ont une gamme d'activités plus large. Certains sont impliqués dans le contrôle du développement des lymphocytes B et de la production d'anticorps. D'autres cellules T interagissent avec les cellules phagocytaires pour les aider à détruire les microorganismes intracellulaires. Enfin, un troisième groupe de lymphocytes T reconnaît les cellules infectées par un virus et les détruit. En pratique, il y a beaucoup d'interactions entre les lymphocytes et les cellules phagocytaires. Par exemple, certains phagocytes peuvent absorber des antigènes et les présenter aux cellules T. Ce processus est appelé présentation de l'antigène. De leur côté, les lymphocytes T sécrètent des facteurs solubles, les cytokines, qui stimulent les phagocytes et leur permettent de détruire les microorganismes. Du fait de ces interactions, la plupart des réponses immunitaires vis-à-vis des agents infectieux mettent en jeu à la fois des éléments de l'immunité naturelle et de l'immunité spécifique. Aux stades initiaux de l'infection, l'immunité naturelle prédomine, puis ultérieurement les lymphocytes mettent en place des réponses spécifiques adaptées à chaque microorganisme. Certains de ces lymphocytes peuvent avoir une durée de vie de plusieurs années, constituant la mémoire immunologique de l'organisme. Ainsi, tout nouveau contact avec un microorganisme déjà rencontré entraînera une réponse plus rapide et plus efficace que la simple immunité naturelle.

2.1.2 Cellules immunocompétentes

Les cellules impliquées dans la réponse immunitaire sont très hétérogènes tant par leur origine que par leur fonction. Toutes les cellules du système immunitaire proviennent de cellules souches pluripotentes qui s'organisent en deux voies principales de différenciation. Celles-ci donnent naissance à deux lignées distinctes, la lignée lymphoïde et la lignée myéloïde (Figure 4). *Notre intérêt principal et l'objet de notre étude étant les lymphocytes T, qui jouent un rôle central dans le système immunitaire, nous n'aborderons que brièvement le rôle des autres acteurs de la protection organique, les monocytes/macrophages et les lymphocytes B.*

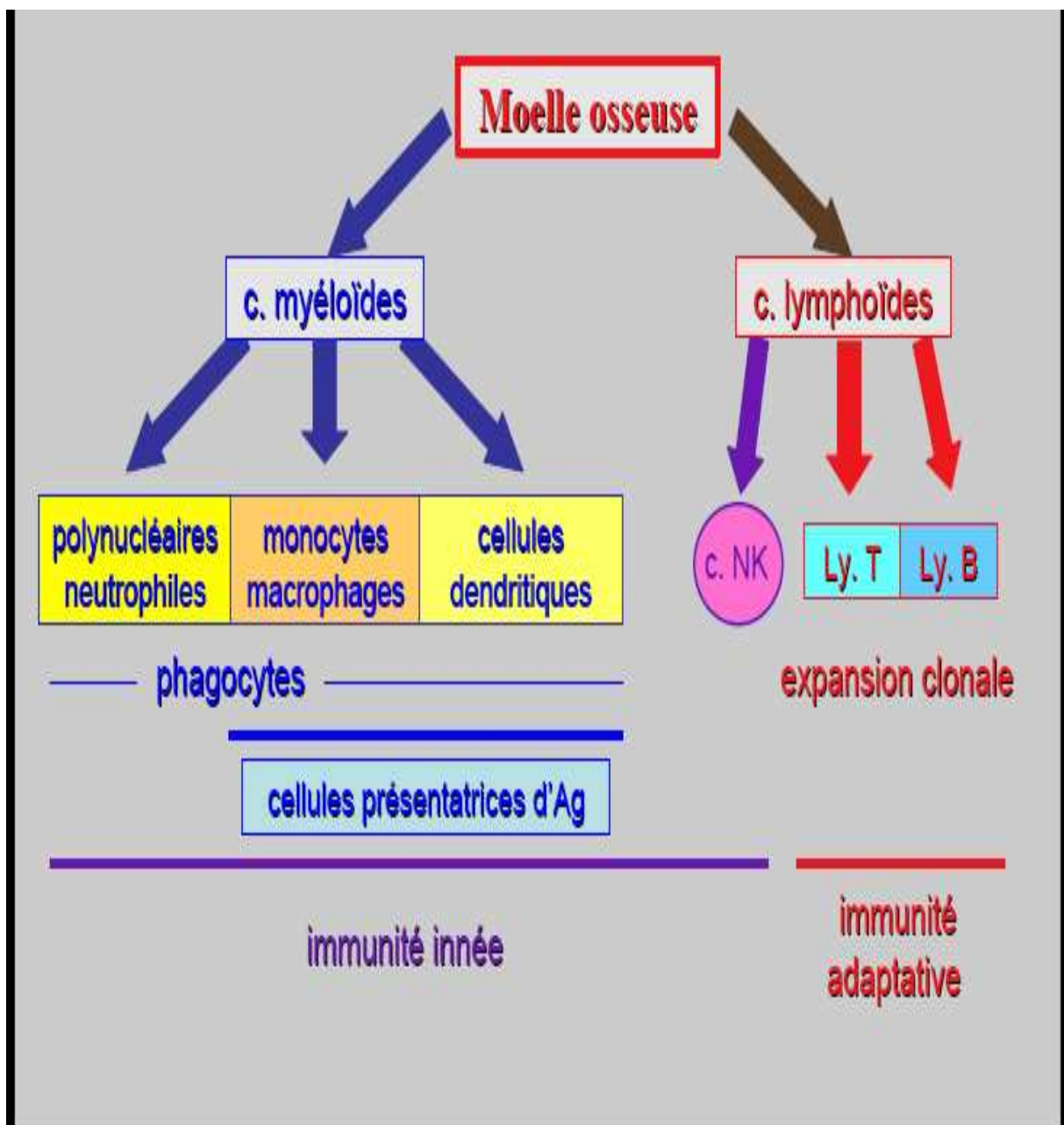


Figure 4 : Origine Hématopoïétique des cellules immunitaires. D'après ([http:// image.google.fr](http://image.google.fr)).

2.1.2.1 Les Phagocytes

2.1.2.1.1 Les polynucléaires

Ils sont issus de la lignée granulocytaire. Sur la base de leur aspect cytogique, on distingue les polynucléaires neutrophiles (95 % des polynucléaires circulants) qui assurent essentiellement la phagocytose et la bactéricidie, les polynucléaires basophiles impliqués dans les processus d'hypersensibilité IgE-dépendants et les éosinophiles impliqués dans l'élimination des parasites.

2.1.2.1.2 Les phagocytes mononucléés

Ils correspondent aux monocytes et à toutes les cellules qui en découlent. Toutes ces cellules proviennent de cellules souches multipotentes. Les monocytes ne demeurent que 2 ou 3 jours dans la circulation et se transforment en macrophages tissulaires, grandes cellules au polymorphisme considérable et qui présentent un grand nombre de récepteurs membranaires. Les macrophages ont pour fonctions essentielles la participation à l'inflammation, l'activité bactéricide et tumoricide et la présentation de l'antigène.

2.1.2.2 Les lymphocytes

Ce sont les cellules support de l'immunité spécifique. Il n'est pas possible de distinguer les lymphocytes T et B sur la base de critères morphologiques, bien qu'il existe des petits et grands lymphocytes.

2.1.2.2.1 Les lymphocytes B

Ce sont les cellules responsables de l'immunité humorale. Ils représentent 10 à 20 % des lymphocytes du sang périphérique et sont également présents dans les ganglions (zone corticale), la rate (pulpe rouge) et la moelle osseuse. On peut identifier les lymphocytes B par leurs immunoglobulines de surface. Chaque lymphocyte B exprime une seule Ig de surface, le plus souvent IgM, parfois IgG, IgA ou IgM+IgD. On trouve également, à côté des molécules de classe II, d'autres molécules de surface (CD19, CD21, CD22, CD24). Les lymphocytes B ont pour fonction la production des anticorps. Les lymphocytes B et T CD4+ coopèrent dans cette réponse qui est le plus souvent thymodépendante. Ce sont les plasmocytes, absents du

sang circulant, qui sécrètent les anticorps. Un plasmocyte donné ne produit qu'une seule variété d'anticorps.

2.1.2.2.2 Les lymphocytes T

Origine des différentes sous-populations

Les lymphocytes T sont directement impliqués dans les moyens de défense utilisant des cellules. Ils sont les acteurs de la reconnaissance spécifique des antigènes.

On distingue deux types de lymphocytes T : les lymphocytes T CD4⁺ et les lymphocytes T CD8⁺.

Les CD4⁺ ont pour fonction d'activer les autres lymphocytes, en sécrétant des cytokines. Ils sont appelés T_H (lymphocytes T CD4⁺ « helper ») et jouent un rôle auxiliaire en coopérant avec d'autres cellules (autres lymphocytes T, lymphocytes B, monocytes, macrophages).

Les CD8⁺ ou lymphocytes cytotoxiques (CTL), ont une activité cytolytique et éliminent les cellules étrangères ou les cellules infectées par un virus ou un parasite intracellulaire.

La différenciation de ces lymphocytes est indépendante de l'antigène. Aux différents stades de cette évolution, indépendante de l'antigène au cours du développement, les lymphocytes acquièrent la capacité de synthétiser des molécules nouvelles. Ces dernières sont le support de leurs propriétés fonctionnelles et permettent également de les identifier. C'est dans le thymus que les précurseurs des lymphocytes T (les thymocytes) acquièrent leur compétence et les molécules de surface, caractéristiques des cellules T matures, qui leur permettent d'exercer leurs fonctions. Ils représentent 65 à 80 % des lymphocytes circulants. Ils jouent un rôle essentiel direct dans la défense cellulaire, et, indirectement, ils interviennent aux différentes étapes de la réponse immunitaire à l'origine de la production d'anticorps.

Contrairement aux lymphocytes B, les lymphocytes T ne reconnaissent l'antigène que si celui-ci est présenté, généralement sous forme de petits fragments peptidiques, à la surface de cellules spécialisées dites « cellules présentatrices de l'antigène » (CPA). Dans ces CPA, les fragments d'antigènes sont associés à des molécules spécialisées, codées par un ensemble de gènes, appelées « complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ». Ce dernier joue un rôle primordial dans de nombreux aspects du fonctionnement du système immunitaire.

Les cellules T utilisent leurs récepteurs spécifiques d'antigènes (*T Cell Receptor* ou TCR) pour reconnaître les peptides antigéniques associés à ces molécules codées par le CMH.

Trois types différents de gènes ont été identifiés :

- les gènes de classe I, extrêmement polymorphes, ont un rôle important dans le rejet des greffes. Ils codent des glycoprotéines de classe I, exprimées à la surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme et qui servent de marqueurs spécifiques du soi pour les lymphocytes T cytotoxiques,
- les gènes de classe II produisent également des glycoprotéines qui jouent un rôle important dans le contrôle des réponses cellulaires T et B, et dans les interactions macrophages/cellules T auxiliaires (présentation de l'antigène),
- les gènes de classe III déterminent la structure et le taux d'expression des composants du complément.

Les molécules du CMH de classe I sont présentes sur toutes les cellules de l'organisme et la présentation antigénique via les classes I permet d'activer les lymphocytes T CD8⁺. Les molécules du CMH de classe II sont présentes sur les CPA (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B) et certaines cellules, non immunes mais activées. La reconnaissance d'un antigène présenté par une molécule du CMH de classe II active les lymphocytes T CD4⁺.

Les lymphocytes T sont subdivisés en trois sous-populations :

- *Les lymphocytes T auxiliaires ou « helper » (T_H)*, impliqués dans la coopération avec d'autres cellules, appartiennent le plus souvent à la population caractérisée par l'expression de la molécule CD4. Cette molécule est une glycoprotéine de 55 kDa, qui a pour ligand l'une des structures moléculaires du CMH (les molécules de classe II-cf paragraphe précédent). Les lymphocytes T CD4⁺ représentent 30 à 50 % des lymphocytes circulants. Ils exercent leurs fonctions par le biais de médiateurs solubles, les cytokines, qu'ils sécrètent lorsqu'ils sont activés par l'antigène.
- *Les cellules T régulatrices* sont un groupe de cellules lymphocytaires T, impliquées dans le contrôle des réactions auto-immunes. Auparavant caractérisées par l'expression de leurs marqueurs de surface CD4 et CD25, elles sont aujourd'hui également définies par l'expression intensive des gènes FoxP3 et CTLA-4. Ce dernier conduit, notamment à l'expression plus importante du récepteur de haute

affinité à IL-2 (CD25). La majorité des cellules régulatrices sont des CD4⁺, bien qu'il existe de petites populations de cellules régulatrices CD8⁺ (ces cellules représentent entre 5 et 10 % des cellules T CD4⁺ périphériques).

- *Les lymphocytes T exprimant la molécule CD8*, 20 à 35 % des lymphocytes du sang, sont spécialisés dans l'élimination de cellules infectées ou étrangères, *via* des mécanismes de cytotoxicité.

Les lymphocytes CD4⁺ jouent un rôle central dans la régulation de la réponse immunitaire. Leur activation induit la prolifération cellulaire, et la sécrétion de cytokines. La nature de ces dernières oriente le système immunitaire vers une réponse humorale et une maturation plasmocytaire ou vers une réponse cellulaire.

Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs (n'ayant pas rencontré d'Ag) produisent majoritairement de l'IL-2 lorsque les cellules rencontrent pour la première fois l'Ag. Ces cellules, dites aussi Th0, sont capables, sous l'influence de cytokines, de se différencier soit vers le phénotype Th1, soit vers le phénotype Th2 (**figure 5**). Les cellules T helper 1 (Th1) produisent de l'IL-2, de l'interféron γ (IFN- γ), et le TNF- β . Les cellules Th2, quant à elles, produisent de l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13 (Liblau *et coll.*, 1995).. Les cellules Th0 sécrètent les cytokines de type Th1 et Th2 (**figure 5**).

Les cellules Th1 favorisent la réponse immunitaire à médiation cellulaire et, par conséquent, favorisent l'inflammation et la cytotoxicité cellulaire tout en modulant négativement la réaction d'hypersensibilité, tandis que les cellules Th2 sécrètent des cytokines permettant aux lymphocytes B de produire des IgG1 et IgE (Mosmann et Sad, 1996).

La sous-population Th1 agit comme un activateur des monocytes/macrophages qui augmentent alors leurs capacités phagocytaires. Sous l'action de l'IL-12, sécrétée par les macrophages ou les cellules dendritiques, les cellules Th1 produisent l'IL-2, l'IFN- γ et le TNF- α ce qui permet l'activation des macrophages (Mosmann et Coffman, 1989). Les macrophages activés sécrètent l'IL-12, du NO, des métabolites de l'oxygène et des molécules de CMHII, ce qui permettra, en retour, l'activation des lymphocytes Th1.

Les couples de molécules d'adhésion CD28/B7.1 et 2 et CD2/LFA-3 participent aussi à cette activation, ainsi que le TNF- α de membrane des Th1. La production d'IL-12, par les macrophages, dépend d'un signal induit par l'IFN- γ et d'un signal provenant des Th1 activés

par l'intermédiaire du couple CD40 (macrophage)/CD40L (Th1). En revanche, les Th2, par l'intermédiaire de l'IL-10, inhibent les fonctions effectrices des macrophages.

Le TGF- β , d'origine variée, est également une cytokine inhibitrice des Th1. L'IL-4 des Th2 entraîne la diminution d'expression des IL-12R (β 2) des T, et l'IL-10 des Th2 diminue la sécrétion d'IL-12 par les macrophages. Donc, l'IL-4 et l'IL-10 freinent le passage vers le phénotype Th1 : ces cytokines sont donc considérées comme anti-inflammatoires.

Au contraire, puisque les cytokines produites par les lymphocytes Th1 activent les monocytes et les macrophages, elles sont considérées comme des molécules pro-inflammatoires.

Il est admis qu'une mauvaise régulation de la balance Th1/Th2, est impliquée dans un certain nombre de pathologies humaines (Lucey et coll., 1996).

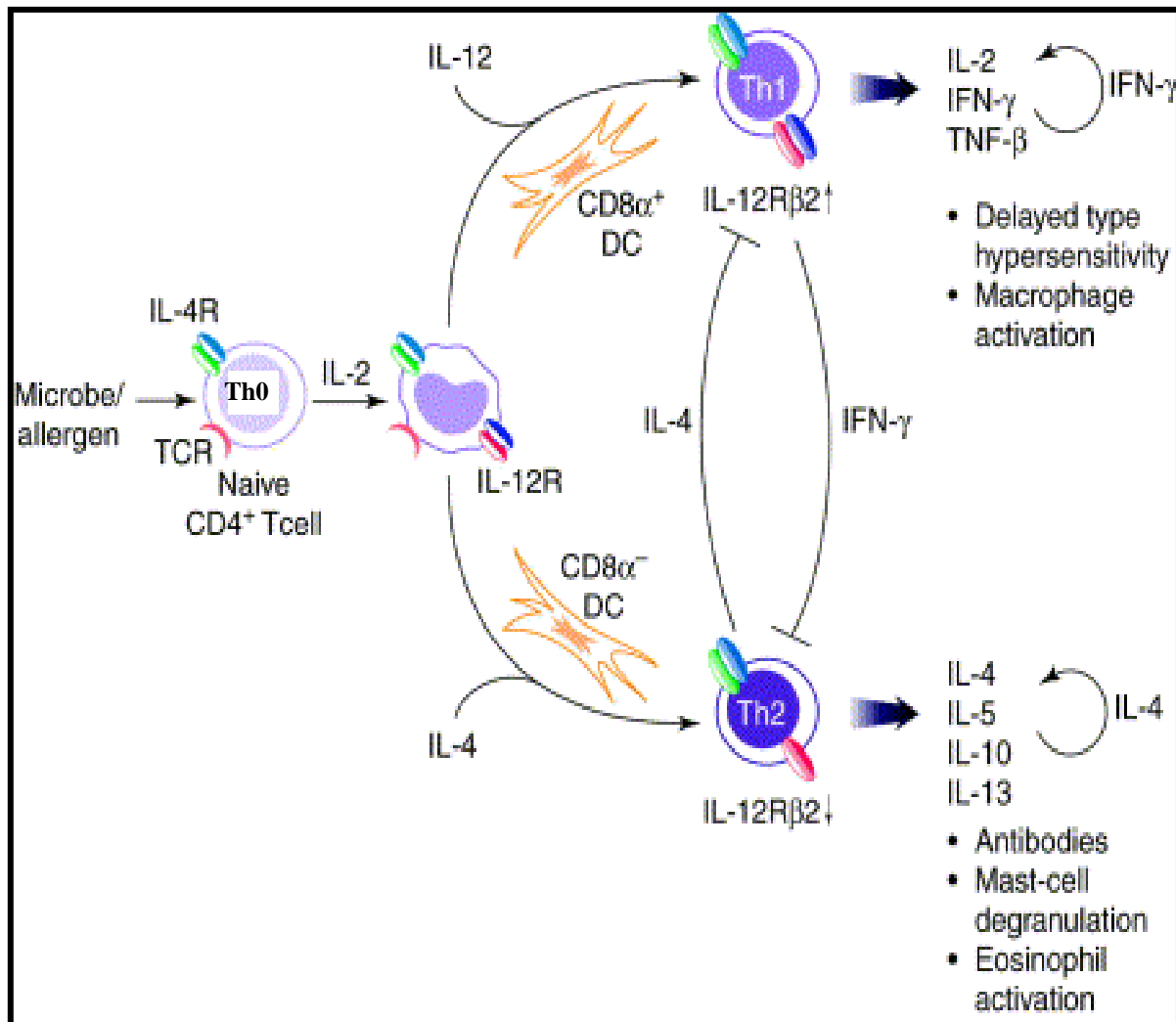


Figure 5 : Différenciation cellulaire des lymphocytes T helper (Th). Un lymphocyte T CD4⁺ naïf (Th0) est activé via le TCR lorsqu'il rencontre l'Ag présenté par une cellule présentatrice de l'Ag (CPA). Une fois activée, la cellule Th commence à proliférer, sécrète de l'IL-2 et exprime le récepteur de l'IL-12 (IL-12R). En présence d'IL-12, sécrétée par les macrophages ou par contact avec les cellules dendritiques (DC) CD8 α^+ , un programme de différenciation vers le phénotype Th1 est initié. En présence d'IL-4, produite par le Th0 ou par contact avec les cellules dendritiques CD8 α^- , il y a une différenciation vers le phénotype Th2 et une diminution de l'expression du récepteur à l'IL-12 (IL-12R β 2⁻). Abréviations : TCR, *T-cell receptor* ; Th1, *T helper 1* ; Th2, *T helper 2*. D'après (Rengarajan et coll., 2000).

Les lymphocytes NKT

Ils sont un type de lymphocytes présentant des marqueurs de cellules T(CD3) et des marqueurs de cellules NK. Ils sont donc un lien entre le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. Contrairement aux lymphocytes T conventionnels, dont le TCR reconnaît un peptide présenté dans une molécule du Complexe Majeur d'Histocompatibilité CMH, les NKT sont capables de reconnaître un glycolipide présenté dans une molécule appelé CD1d, structurellement proche du CMH de classe I. Une fois activés, les NKT sont capables de lyser les cibles et de sécréter des cytokines.

Au fur et à mesure de leur maturation, ils expriment différents marqueurs de surface : CD2 et CD3 exprimés sur 100% des lymphocytes circulants, CD4 exprimés par les lymphocytes T auxiliaires (*helpers* = 60 à 70% des lymphocytes circulants) et CD8 exprimé par les lymphocytes T cytotoxiques. Les lymphocytes T possèdent entre 30 000 et 40 000 récepteurs identiques pour l'antigène, fonctionnellement associées à la molécule CD3.

Les lymphocytes T exercent diverses fonctions : ils interagissent avec d'autres cellules de l'immunité (lymphocytes T auxiliaires CD4+ jouant un rôle amplificateur, T cytotoxiques CD8+ qui ont la capacité ou non d'induire l'apoptose). Les lymphocytes T sont également impliqués dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire, par exemple les lymphocytes T cytotoxiques CD8+. Les lymphocytes T activés produisent diverses interleukines.

2.1.2.2.3 Autres cellules du système immunitaire

Parmi ces cellules, on trouve les cellules NK (*Natural Killer*) qui détruisent directement les cellules cancéreuses sans immunisation préalable. Ce sont de grands lymphocytes granuleux exprimant le marqueur CD16. D'autres cellules mal identifiées en terme de lignée, les cellules K, lysent des cellules cibles dans le contexte de la cytotoxicité cellulaire à médiation anticorps (ADCC). Enfin, les mastocytes sont présents dans de nombreux tissus. Ils se rapprochent des polynucléaires basophiles sous beaucoup d'aspects. Ils contiennent de grandes granulations cytoplasmiques basophiles riches en médiateurs vasoactifs, notamment l'histamine.

2.1.3 Mécanisme d'activation des lymphocytes T

Dans cette partie, nous verrons les mécanismes impliqués dans l'activation des lymphocytes T et les voies de signalisation déclenchées à partir du TCR, en partant de l'activation cellulaire, voies étudiées dans la présente thèse. De nombreuses études réalisées sur les lymphocytes T mais également dans d'autres cellules du système immunitaire, démontrent que les AGPI n-3 modulent l'ensemble de ces étapes selon des mécanismes variés que nous discuterons plus en détail dans le chapitre suivant.

2.1.3.1 Le récepteur des cellules T

Le TCR est composé de deux chaînes polypeptidiques hétérodimères (chaînes α et β ou, plus rarement, chaînes γ et δ), liées de manière covalente par des ponts disulfures (**Figure 6**) Ces chaînes sont composées de domaines constants et variables. Les parties variables se situent vers l'extrémité N-terminale et sont responsables de la reconnaissance d'un antigène présenté par une molécule de CMH. Les parties variables sont générées par un réarrangement génique complexe, produisant ainsi de grandes possibilités d'affinité à différents peptides.

Contrairement aux CMH, un seul type de TCR est exprimé sur un lymphocyte. La sous-population $T\alpha\beta$ représente environ 85% des lymphocytes T sanguins. Seuls les lymphocytes T, réagissant contre un antigène reconnu spécifiquement par leur TCR, vont générer une réponse immunitaire. Le TCR est accompagné de plusieurs autres molécules de surface essentielles à l'activation d'un lymphocyte T. Parmi celles-ci, on distingue le CD3. Le CD3 est un complexe protéique formé de 5 chaînes différentes (les chaînes γ , δ , ϵ , ζ et η) qui s'associent pour former 3 dimères : un hétérodimère gamma et epsilon ($\gamma\epsilon$), un hétérodimère delta et epsilon ($\delta\epsilon$) et, soit un homodimère formé de deux chaînes zêta ($\zeta\zeta$), soit un hétérodimère zêta et éta ($\zeta\eta$). L'hétérodimère $\zeta\eta$ ne se retrouve que dans 10% des CD3. Les chaînes du CD3 sont responsables de la signalisation moléculaire du TCR, menant à l'activation du lymphocyte. Chacune des chaînes du CD3 possède des sites de phosphorylation de tyrosine au niveau intracellulaire (ITAM, « immunoreceptor tyrosine-based activation motif »). Ces ITAM servent de substrat pour des kinases de la famille Src (Lck et Fyn) (Huang et Wange, 2004 ; Razzaq et coll., 2004). Il se déclenche alors une cascade complexe d'activation de différentes enzymes (**figure 6**).

La particularité de la reconnaissance, par le lymphocyte T, du peptide antigénique en association avec une des deux classes de CMH, impose l'existence de co-récepteurs. Associés au complexe TCR-CD3, ces co-récepteurs sont les molécules CD4 et CD8 capables de distinguer, respectivement, les molécules de CMH de classe II et I. Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre précédent, on distingue donc, grâce à elles, deux populations de lymphocytes T :

- les lymphocytes T auxiliaires ou Helper exposant la molécule CD4 qui est une glycoprotéine monocaténaire transmembranaire de 54 kDa dont la portion extracellulaire comporte 4 domaines. La molécule de CD4 est capable de se lier à la partie invariante du CMH de classe II. Les Ag présentés sont des Ag exogènes qui ont été endocytés par les CPA.
- les lymphocytes T cytotoxiques exposant la molécule CD8 qui est un hétérodimère constitué de deux chaînes (α et β) liées de manière covalente. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires distinctes mais de poids moléculaire identique (32 kDa) possédant un seul domaine extracellulaire. Ce domaine reconnaît la partie invariante des molécules de CMH de classe I. Les Ag présentés sont des Ag endogènes, produits par toutes les cellules nucléées de l'organisme.

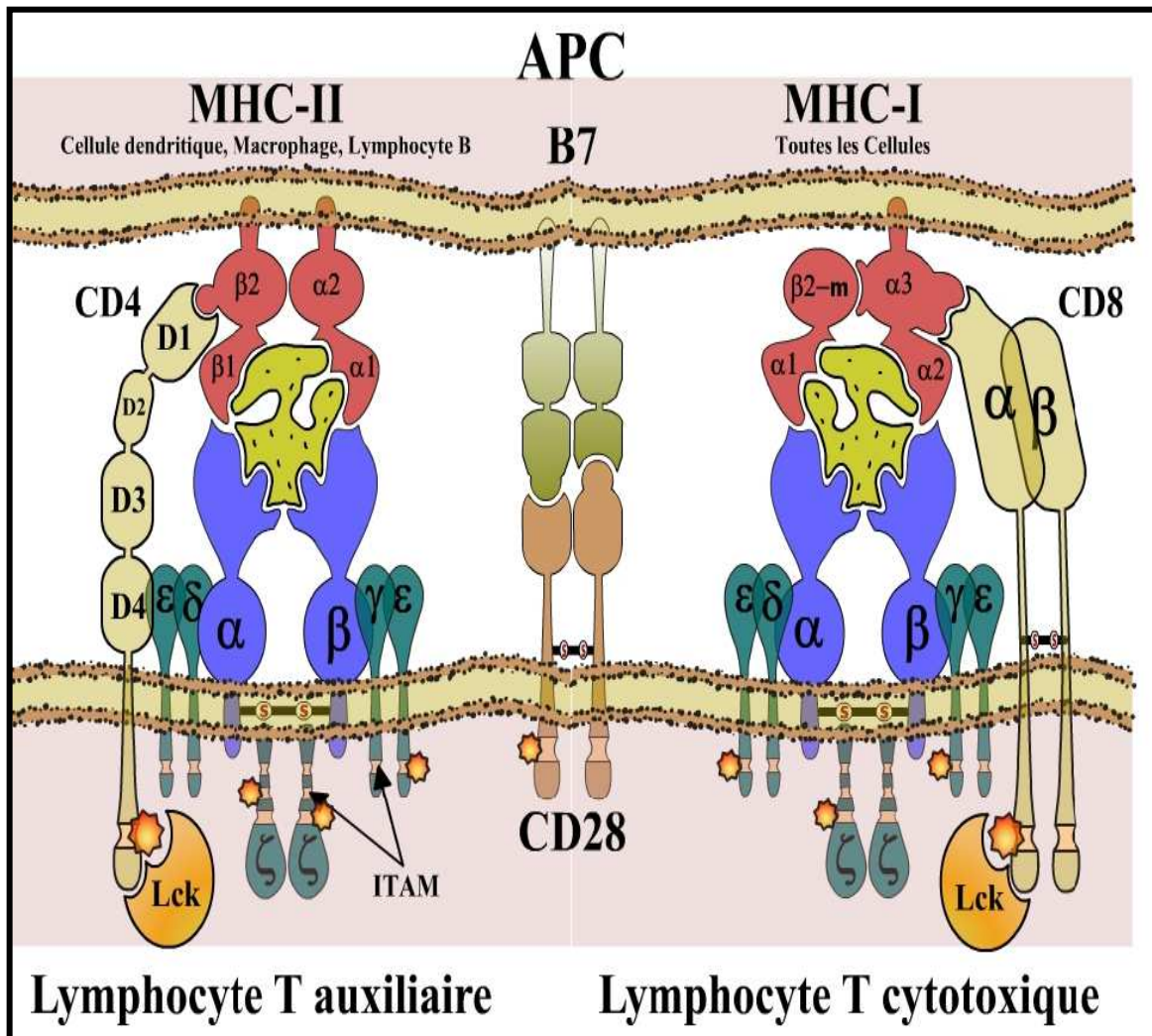


Figure 6 : Le complexe TCR et ses co-récepteurs. Le TCR est une glycoprotéine de la membrane plasmique, composé de deux unités (α et β). Le complexe CD3 est associé à ce récepteur et ses sous-unités sont organisées en deux hétérodimères ($\delta\epsilon$ et $\gamma\epsilon$) et un homodimère ($\zeta\zeta$). Elles portent toutes le motif ITAM (*Immune Receptor Tyrosine-based Activation Motif*) nécessaire à la transmission du signal du TCR. La molécule CD4 est un monomère contenant quatre domaines de type immunoglobuline (D1-4). La molécule CD8 est un hétérodimère formé d'une chaîne α et d'une chaîne β , chacune a un seul domaine variable, associées, de manière covalente, par un pont disulfure. Les molécules de CD4 et CD8 sont impliquées dans la reconnaissance de la classe de CMH portée par la CPA. Ces deux récepteurs sont associés, entre autre, à une protéine tyrosine kinase de la famille Src, la protéine LcK, nécessaire à la signalisation du TCR. Les lymphocytes nécessitent un second signal, le signal co-stimulateur qui est délivré par la liaison de la molécule CD28, présente sur les lymphocytes, à la molécule B7 présente, quant à elle, à la surface des CPA. D'après (Razzaq et coll., 2004).

2.1.3.2 Activation des lymphocytes T par le TCR

Au cours de l'activation lymphocytaire, il existe des *réponses précoces* se produisant de quelques minutes à quelques heures après l'initiation de la transduction du signal, alors que d'autres réponses, dites *tardives*, peuvent se produire des jours après stimulation. Durant la phase précoce de l'activation, les lymphocytes T subissent d'énormes modifications biochimiques, telles que des phosphorylations-déphosphorylations de protéines, des variations de la membrane lipidique, des flux d'ions, des altérations du taux des nucléotides cycliques, des variations de synthèse d'ARN ainsi que des variations de synthèse protéique.

La réponse cellulaire plus tardive, telle que la prolifération, résulte généralement d'une cascade complexe d'événements impliquant l'activation de gènes. Le déclenchement des événements tardifs requiert un signal de co-stimulation, médié par le récepteur CD28 (Ward, 1996). La molécule CD28 (présente de manière constitutive à la surface des cellules T CD4⁺ et à la surface de 50% des cellules CD8⁺) est un hétérodimère glycoprotéique capable d'interagir avec les ligands B7.1 et B7.2 présents sur les CPA. Cette interaction permet l'expression de l'IL-2 et de son récepteur (IL-2R ou CD25) et la progression des cellules au travers de la phase G2/M du cycle cellulaire. Sans les signaux issus de ce récepteur, la stimulation du TCR provoque l'anergie et la mort cellulaire par apoptose (Appleman et Boussiotis, 2003).

Dans cette partie de la thèse, nous aborderons les événements précoces de l'activation des cellules T, événements auxquels nous nous sommes intéressés.

De telles modifications influencent la prolifération et la différenciation de ces cellules.

2.1.3.3 La transduction du signal

La plupart des phénomènes régulant la physiologie cellulaire sont activés ou inhibés par différents stimuli externes ou internes. Ces stimuli activent des voies de transduction du signal qui permettent à leur tour d'activer des cibles cellulaires. La modulation de l'activation de ces cibles cellulaires participe à la physiologie cellulaire et régule des phénomènes tels que la prolifération cellulaire, la différenciation ou l'apoptose. Les principales voies de transduction du signal au sein des cellules sont la voie des MAP kinases (mitogen-activated protein kinase, MAPK), la voie PI3 kinase (phosphatidyl inositol-3 kinase)/Akt (PI3K/Akt), la voie JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) et la voie d'activation du facteur de transcription NFκB (Nuclear Factor kappa B).

L'activation de ces voies se fait en général par des cascades de phosphorylation de protéines kinases. Ces cascades d'activation par phosphorylation se déroulent jusqu'à l'activation de la cible cellulaire finale et sont régulées par des phosphatases qui en déphosphorylant les protéines kinases peuvent inhiber leur activité et interrompre la transduction du message.

Les voies de signalisation déclenchées incluent l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$), la variation du pH_i, l'activation des protéines kinases C (PKC) et la voie des MAP (Mitogen Activated Protein) kinases. Ces voies de signalisation sont complexes et interconnectées.

2.1.3.3.1 La voie des MAPKs

La voie des MAPKs peut être activée par une grande variété de stimuli externes ou internes mais le schéma classique d'activation de cette voie fait intervenir la fixation d'un ligand à son récepteur membranaire. Cette fixation induit une modification de la conformation du récepteur qui conduit à la phosphorylation du récepteur lui-même ou de protéines qui lui sont associées. Ceci conduit généralement à l'activation directe ou indirecte de protéines de la famille des protéines G, qui sont couplées au récepteur ou bien sous forme libre comme la protéine Ras.

L'activation du récepteur et des protéines associées se situe en amont de la cascade des MAPKs qui est constituée de trois kinases : une MAPK kinase kinase (MAP3K), qui phosphoryle et active une MAPK kinase (MAP2K ou MKK), qui à son tour, active la MAPK. L'activation des MAPKs est consécutive à leur phosphorylation au niveau de résidus thréonine (Thr) ou tyrosine (Tyr) situés sur des motifs Thr-X-Tyr et placés dans un domaine appelé boucle d'activation (activation loop).

Cette organisation en cascade permet une amplification du signal, mais fournit aussi de façon importante, des cibles supplémentaires de régulation de la cascade.

Les MAPKs se divisent en trois sous-familles nommées ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) et p38 (Johnson et Lapadat 2002).

❖ La voie d'ERK

De nombreux stimuli tels que des facteurs de croissance, des cytokines, des agents chimiques ou des infections virales peuvent activer la voie d'ERK (Johnson et Lapadat 2002). La voie de transduction d'ERK est organisée en cascade qui conduit à la phosphorylation d'ERK1 et/ou ERK2. La fixation d'un ligand sur son récepteur active le protooncogène Ras qui est à l'origine de l'activation de la MAP3K, la protéine Raf (Stokoe et coll. 1994). Les isoformes de Raf phosphorylent à leur tour les MAP2Ks de la famille MEK, MEK1 et MEK2. MEK1 et MEK2 sont activées par phosphorylation directe sur leurs résidus sérines (Pearson et coll. 2001). MEK1 et MEK2 sont alors en mesure de phosphoryler et activer ERK1 et ERK2. Ces MAPKs semblent être les seuls substrats connus de MEK1/2. Les deux MEKs phosphorylent ERK1/2 sur les résidus tyrosine et thréonine qui se situent dans le segment d'activation du domaine catalytique (appelé encore boucle d'activation) (Pearson et coll. 2001). ERK1 et ERK2 sont des protéines de 43 et 41 kDa qui sont homologues à 85%. ERK phosphoryle à son tour de nombreux substrats qui sont impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire et de la différenciation.

❖ La voie de JNK

Les protéines JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase), sont codées par trois gènes conduisant à la production d'au moins dix isoformes. Les isoformes identifiées sont JNK1/SAPK γ , JNK2/SAPK α , et JNK3/SAPK β , leurs domaines catalytiques présentent 85% d'homologie.

Les JNK/SAPKs sont activées par phosphorylation sur deux sites, tyrosine et thréonine, comme toutes les autres MAP kinases. Les JNK/SAPKs sont activées par les cytokines, certains ligands pour les récepteurs couplés aux protéines G, par un stress environnemental et dans une certaine mesure par des facteurs de croissance ainsi que des agents transformants (Kyriakis et coll. 1994, Coso et coll. 1995). L'activation de la voie de JNK implique de très nombreuses MAP3K dont l'action converge vers l'activation d'un nombre restreint de MAP2K. En effet, seulement deux membres de la famille des MAP2K, MKK4 (SEK1, MEK4, JNKK1, SKK1) et MKK7 (MEK7, JNKK2, SKK4), ont été impliqués dans les voies JNK/SAPK (Davis 2000). L'activation de la voie de JNK est généralement associée à la

régulation des processus de mort cellulaire, à la transduction du signal insulinique et à la régulation du cycle cellulaire (Johnson et Lapadat 2002, Sabapathy et Wagner 2004).

❖ La voie de p38

Il existe quatre isoformes de p38 chez les mammifères : p38 α (SAPK2_A), p38 β (SAPK2_B), p38 γ (ERK6 ou SAPK3), et p38 δ (SAPK4) (Pearson et coll. 2001). Une variété de facteurs, y compris les cytokines, les chocs osmotiques, les chocs thermiques ainsi que bien d'autres types de stress peuvent activer les membres de la famille de p38. Ces facteurs activent les MAP3K nommées MEKK4, TAK1 ou ASK1 qui vont à leur tour activer les MAP2K impliquées dans la voie de p38 mais peuvent également activer la voie de JNK (Ichijo et al. 1997, Zarubin et Han 2005). Deux protéines MAP2K, MEK3 (MKK3) et MEK6 (MKK6), activent fortement les p38 MAP kinases (Davis 2000). MEK3 paraît favoriser la phosphorylation de p38 α et les isoformes de p38 β , alors que MEK6 phosphoryle efficacement tous les membres de la famille p38 (Davis 2000). L'activation de la voie de p38 est généralement associée à l'activation de facteurs de transcription et de protéines kinases impliqués dans la régulation des processus de mort cellulaire, de différenciation et de réponse inflammatoire (Johnson et Lapadat 2002, Zhang et Liu 2002).

2.1.3.3.2 Rôle du TCR

Les chaînes polypeptidiques du côté cytoplasmique du TCR sont courtes et sans propriété de transduction du signal. Elles sont donc associées à d'autres polypeptides afin de transmettre une information du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire suite à leur engagement. Ces polypeptides sont les molécules CD3 γ , δ , ϵ et ζ dont la partie intracytoplasmique est longue. Elle possède un ou plusieurs motifs conservés formés de résidus tyrosines appelés ITAM (intracytoplasmic tyrosine-based activation motif).

La phosphorylation, sur les tyrosines des motifs ITAM du récepteur, initie la cascade de transduction du signal. Les motifs ITAM sont phosphorylés par des kinases de la famille src, p56lck et p59fyn. Suite à cette phosphorylation, les motifs ITAM peuvent induire la translocation des kinases à deux domaines SH2 en tandem, telle que ZAP-70 (*Zeta-chain-Associated Protein of 70 kDa*), vers la membrane plasmique où cette dernière se fixe sur l'unité ζ du TCR (Bu et coll., 1995). ZAP-70 est nécessaire pour la fonction et le développement des lymphocytes T (Arpaia et coll., 1994; Zoller et coll., 1997). ZAP-70 doit être phosphorylée par la protéine p56lck pour être active.

Une fois recrutée au niveau du récepteur et activée par les kinases de la famille src, ZAP-70 peut, à son tour, phosphoryler ses substrats. La nature de ces substrats commence à être

connue ; ce sont des protéines adaptatrices telle que LAT (linker for T cell activation) et des enzymes, parmi elles, la phospholipase C_{γ}^1 (PLC_{γ}^1) dont l'activation est directement induite par ZAP-70.

Les protéines adaptatrices sont des molécules sans activité enzymatique propre mais possédant de nombreux sites de phosphorylation. Elles vont servir à rapprocher les molécules, impliquées dans la transduction du signal, vers le TCR.

2.1.3.3.3 Activation des MAP kinases, ERK1/ERK2

Déclenchement des événements précoces :

Dès la fixation de l'antigène au récepteur, deux voies de signalisation sont activées, l'une impliquant la protéine p21ras, l'autre la phospholipase C_{γ}^1 (PLC_{γ}^1) (Downward et coll., 1990; Izquierdo et coll., 1992).

En ce qui concerne la protéine p21ras, son activation dépend de la phosphorylation des protéines adaptatrices SLP-76 et Vav, substrats de ZAP-70. Lorsque Vav est activée, elle se lie à la protéine ras, liaison essentielle pour l'activation de ras et la transduction du signal (Gulbins et coll., 1994). La protéine p21ras est couplée à la voie d'activation des MAP kinases, ERK1/ERK2, impliquée dans la différenciation et la prolifération cellulaire.

Une autre voie d'activation indépendante de ras est généralement couplée au TCR. Dès la reconnaissance de l'antigène par le TCR, la PLC_{γ}^1 est recrutée vers la membrane où elle hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) en inositol-1,4,5-trisphosphate (IP_3) et diacylglycerol (DAG). Les DAG sont des activateurs naturels des protéines kinases C (PKC) impliquées également dans l'activation des MAP kinases indépendamment de ras. L' IP_3 se lie à un récepteur membranaire du réticulum endoplasmique, favorisant ainsi la sortie du calcium vers le cytosol et entraînant l'augmentation de la concentration de calcium cytosolique.

Ces deux voies de signalisation, déclenchées à partir de la stimulation du complexe TCR/CD3, convergent en aval de Ras et des PKC vers la protéine Raf-1.

Il a été récemment démontré que les DAG sont capables d'activer la voie de signalisation de façon PKC-indépendante et ras-dépendante via l'activation d'une protéine, RasGRP (Ras Guanyl nucleotide releasing protein). RasGRP est un facteur d'échange. La protéine contient un site de liaison pour les DAG et un site de liaison pour le calcium (Ebinu et coll., 2000). RasGRP active ras en permettant la formation du complexe Ras-GTP qui peut alors phosphoryler Raf-1.

Raf-1 transmet le signal en phosphorylant des MAP kinase kinase, MEK1 ou MEK2 (Kyriakis et coll., 1992). MEK1/2, activés, sont phosphorylés respectivement sur les sérines 218/222 et sur les sérines 222/226 chez l'homme (Jaaro et coll., 1997). MEK1/2 sont des protéines cytosoliques retenues par une séquence particulière, la séquence d'exportation nucléaire (NES) (Fukuda et coll., 1997). Dans le cytosol, lorsque ces MEK sont activées, elles phosphorylent respectivement ERK1, de 44 kDa et ERK2, de 42 kDa.

La structure des MAP kinases, ERK1/ERK2, non phosphorylées, a été mise en évidence par Zhang et coll. (1995). Les MAP kinases sont formées d'un petit domaine N-terminal et d'un large domaine C-terminal reliés par un troisième commun à l'ensemble des protéines kinases. L'ATP se lie au niveau du site catalytique et les substrats en surface de celui-ci. Lors de l'activation par phosphorylation, ERK1 et ERK2 changent de conformation. ERK1 est phosphorylée sur les résidus thréonine 202 et tyrosine 204 et ERK2 sur les résidus thréonine 185 et tyrosine 187 (Cobb et coll., 1991).

Les domaines N- et C- terminaux subissent alors une rotation l'un par rapport à l'autre permettant de fermer le site actif et d'aligner les résidus du site catalytique (Robbins et coll., 1993). Des mutations réalisées dans la zone de phosphorylation ont mis en évidence que cette région est peu stable et sujette à de nombreux changements, lesquels doivent aller dans le sens d'une activation de la protéine. Cette région de phosphorylation doit acquérir une conformation pouvant être phosphorylée par MEK. Ensuite, une autre conformation sera prise par ERK1 et ERK2 afin que leur activité catalytique soit maximale.

Cible des MAP kinases

Les cibles de ERK1/ERK2 sont des protéines localisées soit dans le cytosol, soit dans le noyau et impliquées dans la transcription de certains gènes.

Tant que les cellules ne sont pas stimulées, ERK et MEK sont maintenues liées dans le cytosol. Lorsque les cellules sont stimulées, MEK activée phosphoryle ERK entraînant la dissociation des deux kinases. ERK phosphorylée peut alors entrer dans le noyau.

Concernant les cibles nucléaires d'ERK, on peut noter le facteur nucléaire kappa B (NFκB, nuclear factor kappa B) car il est impliqué dans la transcription du gène de l'IL-2, cytokine cruciale pour la prolifération et la différenciation des cellules T. NFκB est lié dans le cytosol à un inhibiteur IκB (inhibitor kappa B), empêchant la translocation du facteur nucléaire dans le noyau. IκB est phosphorylé par ERK entraînant la séparation de NFκB et de son inhibiteur. NFκB peut alors pénétrer dans le noyau pour se lier au niveau du promoteur du gène de l'IL-2.

De plus, les cibles nucléaires des MAP kinases, c-jun (Hibi et coll., 1993) et c-Fos (Chen et coll., 1996), ont été bien documentées par des études réalisées *in vitro*, mais leurs effets n'ont pas encore été mis en évidence *in vivo*. Le rôle de ces facteurs nucléaires dans les cellules T sera décrit par la suite.

Déclenchement des événements tardifs

La production / libération de l'IL-2 détermine le passage des cellules T au travers de phases du cycle cellulaire. En effet, l'IL-2 libérée lors de la phase S se fixe sur les récepteurs à l'IL-2 (IL-2 R) présents sur les cellules T et promeut la transition du cycle cellulaire. Par la suite, les signaux de costimulation via le CD28 et son ligant (B-7.1/B-7.2) permettent le passage au travers de G2/M. La molécule CD28 permet la stabilisation du mRNA de l'IL-2. En effet, celui-ci serait instable car possédant une "séquence d'instabilité" non traduite dans la région 3' de ce mRNA (Umlauf et coll., 1995). Cette instabilité prévient la libération continue de la cytokine et favorise sa régulation. La stabilisation de l'ARNm accroît de 20 à 30 fois la synthèse d'IL-2. Lorsque la cellule T reconnaît l'antigène spécifique en absence de costimulation via CD28, peu d'IL-2 est produit et la cellule ne peut induire sa propre prolifération.

L'expression de l'IL-2R nécessite moins de phénomènes. L'activation du TCR suffit à induire son expression. Ceci permet à l'IL-2 produit par une cellule voisine de s'y fixer.

2.1.3.3.4 Rôle des protéines kinases C

A ce jour, 11 isoformes de PKC ont été mises en évidence. Les PKC dites conventionnelles, α , β_1 , β_2 et γ dont l'activation est dépendante des DAG et du calcium, les PKC nouvelles, δ , ϵ , η , θ dépendantes des DAG mais indépendantes du calcium et les PKC atypiques ζ , λ et ν activées en absence de calcium et des DAG (Nishizuka, 1995). Ces PKC sont régulées selon deux mécanismes importants, le premier est un phénomène de phosphorylation permettant un réarrangement des résidus acides aminés, et le second est le déplacement d'un pseudosubstrat laissant le site de liaison au substrat (**Figure 7**)

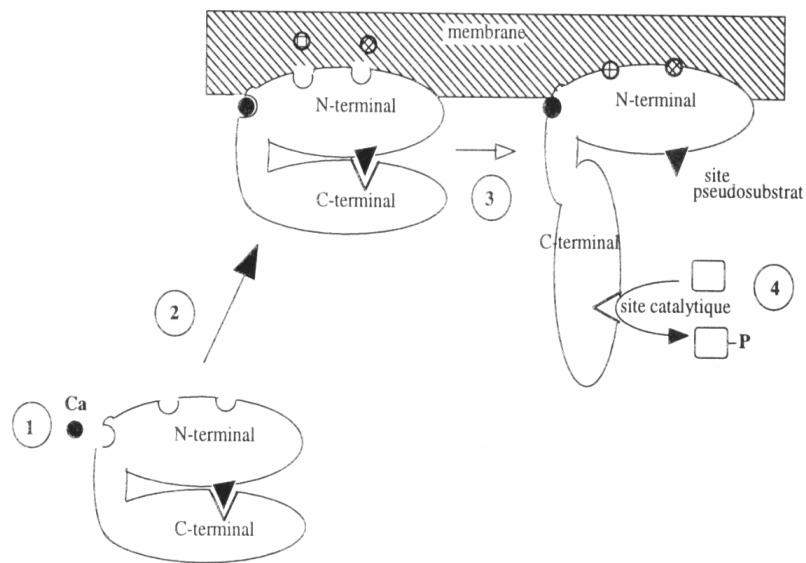


Figure 7 : Activation des protéines kinases C : La liaison du calcium à PKC (1) permet sa translocation du cytoplasme vers la membrane où se trouvent les DAG et des phosphatidyls sérine (PS) essentiels pour l'activation de l'enzyme (2). La liaison du calcium, de DAG et de la PS à leur site spécifique provoque un changement de conformation des PKC (3) libérant le site catalytique dans le domaine C-terminal par départ du pseudosubstrat (4). D'après (Nishizuka, 1995).

La structure des PKC est bien connue. Les 11 isoformes possèdent des régions très conservées (région C1 à C4) et des régions variables (V1 à V5). La région C1 est le domaine de liaison des DAG. Le domaine C2 possède le site de fixation du calcium, il est donc présent seulement sur les isoformes dépendantes de cet ion (**Figure 8**). Le domaine C3 est trouvé sur toutes les PKC et contient le site de liaison à l'ATP qui est le cosubstrat de la réaction de phosphorylation en tant que donneur de son phosphate. Le domaine C4 forme l'essentiel du site catalytique et les différences observées, à ce niveau, entre les isoformes jouent un rôle sur la spécificité de substrat. Le domaine N-terminal possède le site de fixation pour le pseudosubstrat, lequel occupe et inhibe le site catalytique de la PKC non activée.

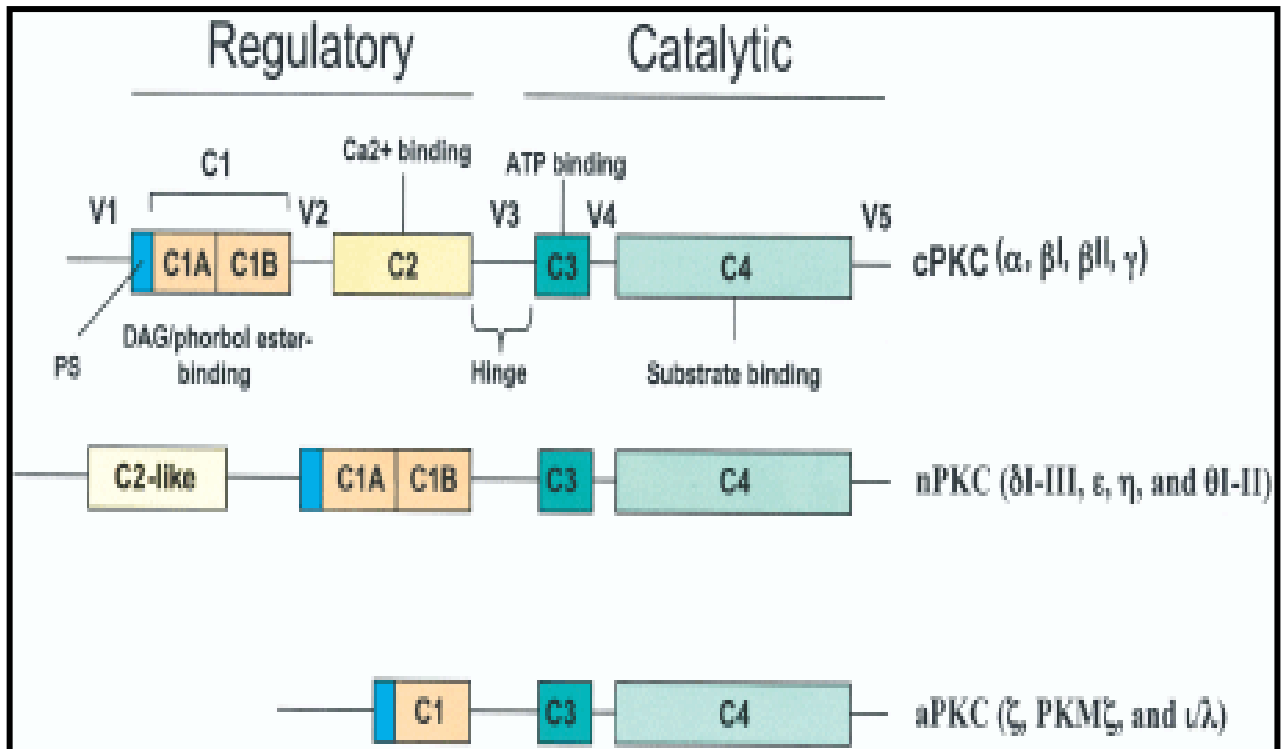


Figure 8: Représentation schématique des caractéristiques structurales des différentes isoformes de PKC. Les PKC sont divisées en trois grandes familles : les classiques (cPKC), les atypiques (aPKC) et les nouvelles (nPKC). Elles possèdent toutes des domaines conservés, chaque PKC contient un domaine catalytique C-terminal fortement homologue et un domaine régulateur N-terminal qui est composé de motifs clé, qui médie la liaison du co-facteur et l'accèsibilité du substrat. Les domaines conservés et variables sont notées C et V respectivement. D'après (Niedel et coll., 1983).

Depuis qu'il a été mis en évidence que les phorbols esters étaient capables d'activer les PKC en mimant l'action des DAG, de nombreuses investigations ont été réalisées afin de montrer l'implication des PKC dans divers processus d'activation cellulaire. Les PKC sont impliquées dans la régulation de la croissance, de la différenciation cellulaire et de l'apoptose (Niedel et coll., 1983). L'activation prolongée des PKC induit l'activation des cellules T via la voie de signalisation de ERK1/2.

2.1.3.3.5 Rôle du calcium

La stimulation du TCR induit une augmentation transitoire du calcium cytosolique via la cascade TCR → ZAP 70 → PLC_γ¹ → IP₃. Cette augmentation joue un rôle important dans la transduction du signal. Elle est due à la libération du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique (RE) induite par la fixation de l'IP₃ sur les récepteurs membranaires de

l'organite. Cependant, cette augmentation est transitoire car rapidement le calcium sort vers le milieu extracellulaire (**Figure 9**). Afin de maintenir l'élévation de la concentration du calcium intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$, un influx calcique via les canaux CRAC (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+}) se produit. Le mécanisme par lequel l'influx calcique est déclenché n'est pas encore bien clair. Selon certains auteurs, la diminution des stocks de calcium dans le RE pourrait entraîner la libération de facteurs cytosoliques dits CIF (Ca^{2+} influx factor), qui, à leur tour, déclencheraient l'ouverture des canaux CRAC (Randriamampita et Tsien, 1993; Xu et coll., 1994).

Concernant le rôle des acides gras sur l'homéostasie calcique, l'effet du DHA sur l'augmentation du calcium cytosolique a été étudié dans notre laboratoire. En effet, Bonin et Khan (2000) ont mis en évidence que le DHA agit à la fois sur le pool du RE et sur l'ouverture des canaux CRAC.

L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ va du simple au double. La $[Ca^{2+}]_i$ basale est de 70nM-100nM. Le maintien de cette augmentation est nécessaire en particulier pour la différenciation et la prolifération des lymphocytes T (Lewis et Cahalan, 1989). En effet, le passage de la $[Ca^{2+}]_i$ de 70 nM à 200 nM :

- stimule l'activation de NF-AT (Negulescu et coll., 1994)
- augmente la production de l'IL-2 (Negulescu et coll., 1994)

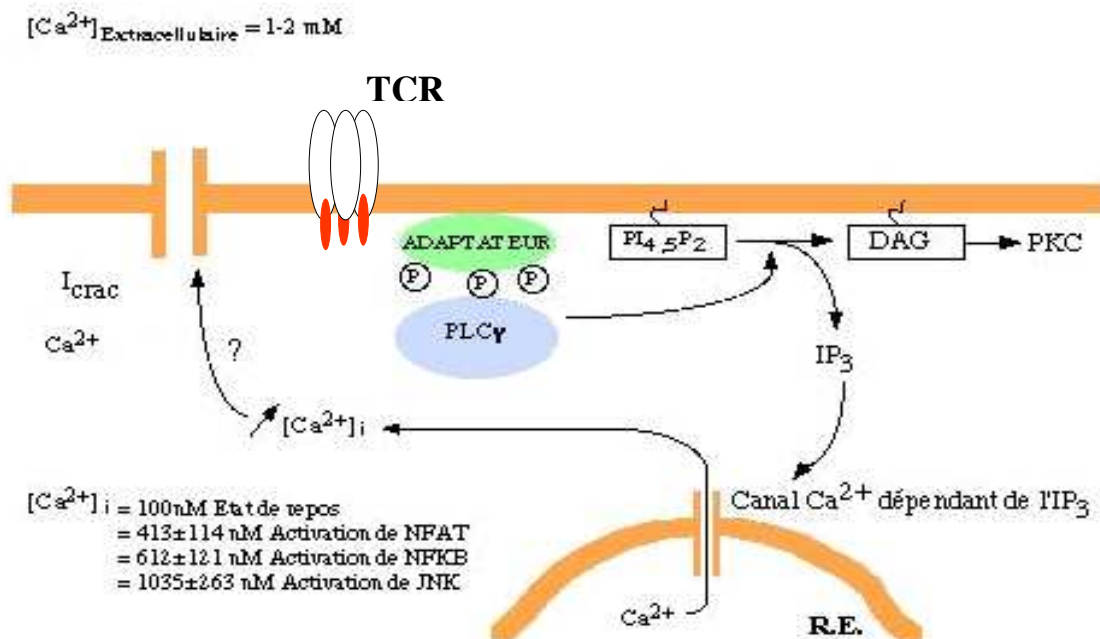


Figure 9 : Homéostasie calcique. D'après (Randriamampita et Tsien, 1993; Xu et coll., 1994).

2.1.3.3.6 Rôle des facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont d'importants médiateurs de différents signaux, facteurs de croissance, sérum, PMA. Ils induisent la transcription de différents gènes en se liant à une séquence consensus promoteur de ce gène. Ce paragraphe abordera le rôle de trois facteurs de transcription, NF-AT, NFκB, et AP1 impliqués dans la prolifération des cellules T via la régulation de l'expression du gène de IL-2 (Garrity et coll., 1994; Jain et coll., 1995).

La famille de facteurs nucléaires activateurs des cellules T (NF-AT) est caractérisée par un domaine conservé de liaison à l'ADN et un domaine de liaison à la calcineurine, une phosphatase calcium dépendante. L'activation des NF-AT dans les cellules T nécessite au moins deux signaux activés par le TCR. Le premier signal est l'augmentation du calcium cytosolique, suivi de l'activation de la calcineurine et le deuxième signal est la stimulation de plusieurs protéines tyrosines kinases (PTK) telles que p56lck et p21ras. Alors que l'activation de la calcineurine stimule la translocation de NF-AT (Liu, 1993; Crabtree, 1999), l'activation de la voie ras/raf/ERK contrôle l'activation de la transcription de NF-AT et l'induction de la protéine activée 1 (AP-1) (Treisman, 1996). Les cibles de NF-AT sont, pour la plupart, des promoteurs de gènes de différentes interleukines. Ces promoteurs possèdent plusieurs sites de liaison pour NF-AT. Ainsi chez l'homme, les promoteurs du gène de l'IL-2 possèdent deux sites de liaison pour NF-AT (Randak et coll., 1990) ; il existe 4 sites de liaison sur le gène codant l'IL-4, et un seul site de liaison sur le promoteur du gène de l'IL-5. Les NF-AT contrôlent également l'expression de l'INF-γ et du TNF-α.

En ce qui concerne le facteur de transcription NFκB, il est retenu dans le cytosol par IκB dans les cellules non stimulées. Lorsque ERK est activée, elle phosphoryle IκB kinase qui devient alors active et phosphoryle IκB. La phosphorylation d'IκB induit la dissociation du complexe NFκB/IκB. Alors que IκB phosphorylé subit une protéolyse puis une dégradation, NFκB est transloqué vers le noyau où il se lie au promoteur du gène de l'IL-2 (**Figure 10**).

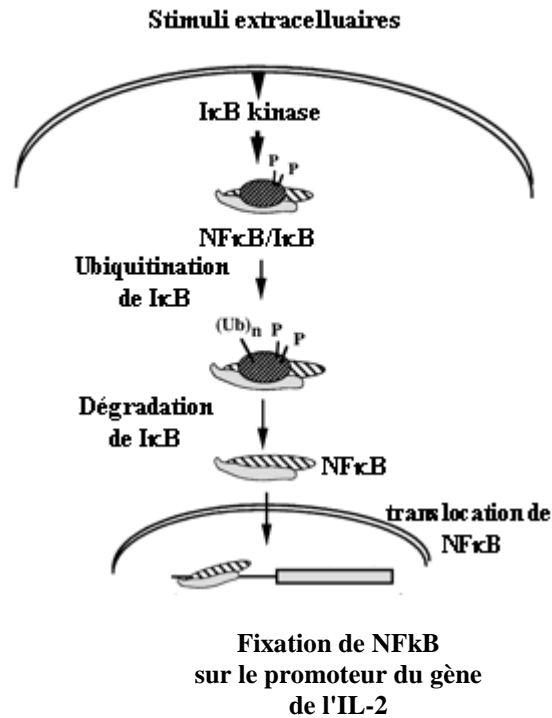


Figure 10 : Activation du facteur de transcription NFκB. D'après (Garrity et coll., 1994).

L'activation du facteur de transcription AP1 dépend de la costimulation via CD28. Des études ont montré que la costimulation induit l'activation de la cascade de signalisation c-jun kinase (Su et coll., 1994; Faris et coll., 1996). AP1 est formé de la dimérisation de c-jun et c-fos (Hirai et coll., 1989; Ryder et coll., 1989). L'AP1 serait également impliqué dans le processus d'apoptose.

2.1.3.3.7 Rôle de PI3 Kinase

Nous avons décrit la voie des MAP kinases comme une voie d'activation de l'expression du gène de l'IL-2. Cependant l'IL-2 est également produite via les voies Jak/STAT et PI3 kinase / Akt (Lin et Leonard, 2000).

Dans les cellules T, les PI3 kinases (PI3K) sont activées via le TCR et les cytokines. Lors de l'activation cellulaire, les récepteurs sont autophosphorylés sur les résidus tyrosines. Cette autophosphorylation est nécessaire pour le recrutement de l'enzyme et la stimulation de l'enzyme par le récepteur. La PI3K joue un rôle important dans le processus d'apoptose (Kauffmann-Zeh et coll., 1997). De plus, l'enzyme serait susceptible de contrôler chaque élément de la voie de signalisation ras/Raf/ERK via la formation d'un complexe avec d'autres protéines, telles que fyn ou lck, impliquées dans la signalisation cellulaire (Hurley et coll.,

1993; Dhand et coll., 1994; Bondeva et coll., 1998). L'activation de la PI3K dépend de sa liaison à ras-GTP (Rodriguez-Viciano et coll., 1994). Bondeva et coll (1998) ont démontré que la PI3K induit l'activation des MAP kinases selon plusieurs mécanismes : sa liaison à p21ras, la synthèse du 3-hydroxy phosphatidylinositol (source de DAG) activateur de différentes protéines kinases dont les PKC.

La voie de signalisation PI3K/Akt régule la croissance, la survie, et la différenciation cellulaire (Kauffmann-Zeh et coll., 1997).

2.2 Rôle de la différenciation des cellules T

Ces dernières années, de nombreux travaux ont montré que les lymphocytes T auxiliaires (T helper, CD4+) présentent des réponses fonctionnelles polarisées dépendantes des cytokines qu'ils produisent. Les cellules Th1, qui produisent de l'IFN- γ , du (TNF)- β et du (TNF)-alpha, activent les macrophages et sont impliqués dans les réactions d'hypersensibilité retardée (Cher et Coll., 1987 ; Mosmann et coll., 1986). Les lymphocytes Th2, qui produisent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-10 et de l'IL-13, sont des promoteurs des réponses humorales et inhibent de nombreuses fonctions macrophagiques (**figure 11**). Les facteurs responsables de la polarisation Th1/Th2 des réponses immunes spécifiques ont été bien largement étudiés chez l'homme et la souris.

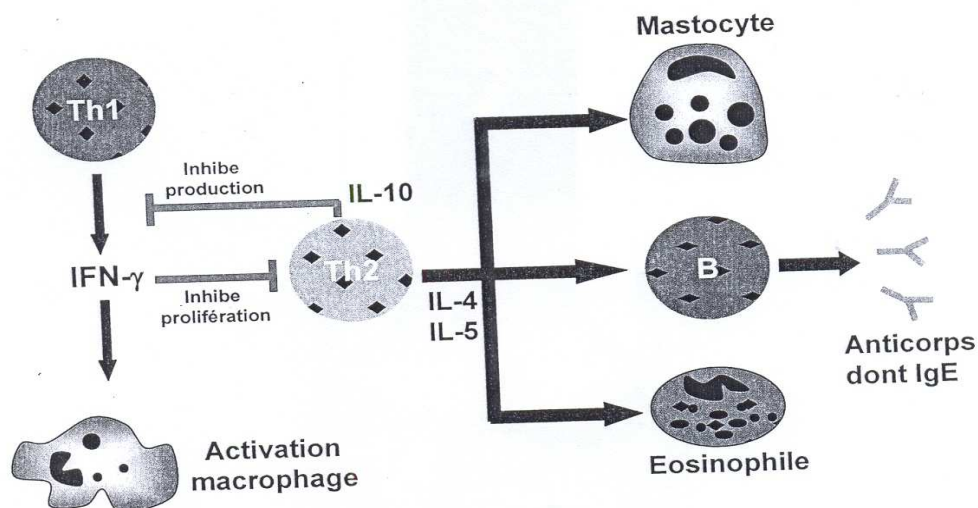


Figure 11 : Représentation schématique du mécanisme d'action des cellules Th1 et Th2. Les cellules Th1 sécrètent la cytokine IFN- γ et activent la voie inflammatoire principalement par l'activation des macrophages. Les cellules Th2 sécrètent les cytokines IL-4 et IL-5 qui augmentent la production d'anticorps par les cellules B, les mastocytes et les éosinophiles. Les cellules Th1 et Th2 peuvent s'inhiber mutuellement. D'après (Cher et Coll., 1987 ; Mosmann et coll., 1986).

Les cellules Th1 et Th2 ne dérivent pas de lignées distinctes mais plutôt d'un précurseur Th0 commun sous l'influence de facteurs environnementaux (la voie d'entrée, les caractéristiques et la dose de l'antigène, la nature des adjuvants) et génétiques agissant au niveau de la présentation de l'antigène. Ces facteurs déterminent la nature des cytokines prédominantes dans le micro-environnement de la cellule Th0 répondeuse. La présence d'IL-4 dans les phases précoces d'activation est un puissant stimulus pour une différenciation Th2, tandis que la présence d'IL-2 et d'IFN favorise la différenciation Th1 (**Figure 12**).

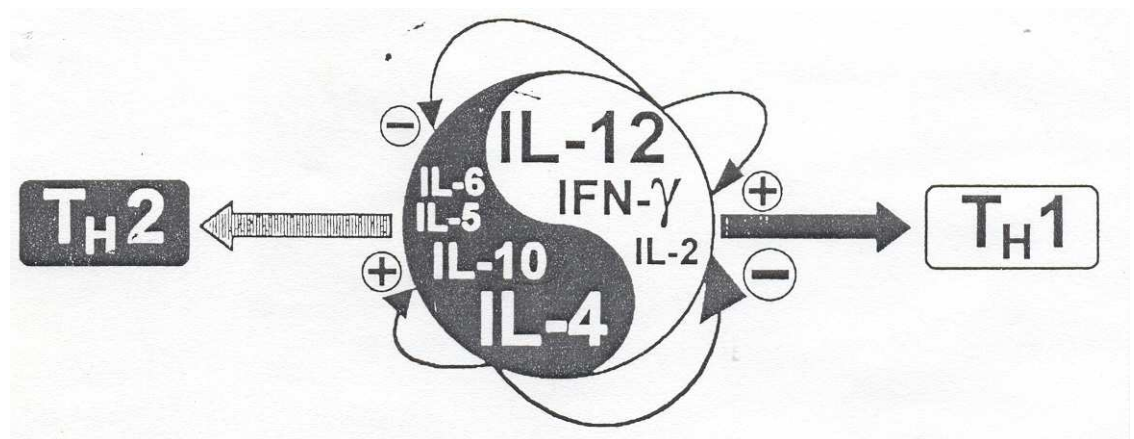


Figure 12 : Action des différentes cytokines sur la différenciation des lymphocytes Th1 et Th2.
D'après (Cher et Coll., 1987 ; Mosmann et coll., 1986).

Il a été clairement établi, à travers divers modèles expérimentaux de diabète, que la sécrétion de cytokines joue un rôle important dans la régulation de la tolérance aux antigènes des cellules β des îlots de Langerhans (Rabinovitch, 1994). La production de ces cytokines lors de l'inflammation des îlots pourrait, en partie, expliquer la capacité des cellules auxiliaires T (T helper, Th) CD4+ à provoquer seule la destruction des cellules β (Rabinovitch, 1994).

Les cellules Th1 sont celles qui régulent la réponse immunitaire à médiation cellulaire et, par conséquent, favorisent l'inflammation et la cytotoxicité cellulaire et modulent négativement la réaction d'hypersensibilité. Les cellules Th2, quant à elles, favorisent la réaction immunitaire humorale et inhibent l'action inflammatoire des cellules Th1 (Rengarajan et coll., 2000). (**Figure 13**)

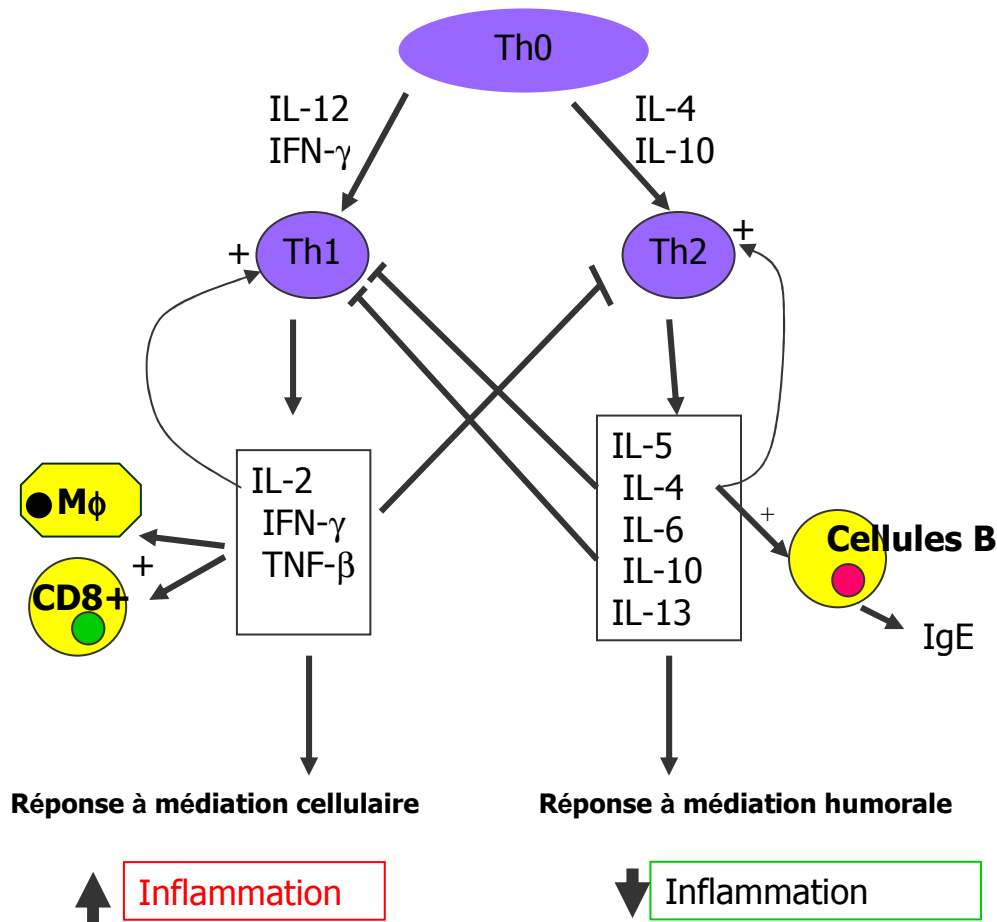


Figure 13 : Schéma simplifié de la différenciation des cellules Th0 (naïves) en cellules sécrétrices de cytokines Th1 et Th2. D'après (Rengarajan et coll., 2000).

En fait, très peu d'études sont disponibles sur ce sujet et, c'est pour cette raison que nous nous sommes proposé d'évaluer la sécrétion de ces cytokines Th1/Th2 chez la souris. Les résultats de cette étude sont publiés dans l'article n°2.

Toutes ces observations montrent l'existence d'un état inflammatoire permanent et d'une baisse de l'immunité naturelle chez ces souris. Cependant, le rôle des sous-populations de ces cellules T auxiliaires de la ratte dans la modulation de la pathologie n'a pas été exploré. C'est pour cette raison que nous avons évalué, dans cette thèse, l'expression des ARN messagers des régulateurs de Th1 et de Th2.

2.2.1 Déterminants de la balance Th

Il est important de caractériser les facteurs qui guident la polarisation Th1, mais à ce jour, ils demeurent largement inconnus. Le système immunitaire possède différentes façons de réagir à un antigène. Le choix approprié de cette réponse est déterminé par la manière dont l'antigène est présenté, sa quantité et sa localisation. Bien que la distinction Th1/Th2 ne soit pas absolue, une simultanéité pouvant être observée, cette classification est utile pour mieux comprendre les réactions immunitaires dans de nombreuses maladies.

Une étude de 1998 a montré que les macrophages, par leur fonction de cellules présentatrices d'antigènes (CPA), influencent fortement la réponse cellulaire Th1 et sont capables de supprimer une réponse humorale Th2 déjà existante (Desmedt et coll., 1998).

D'autre part, il a été récemment montré que les hormones stéroïdes jouent un rôle important dans le contrôle de la balance Th1/Th2. En 2005, Matsuzaki et coll. ont démontré que des hormones appelées immuno-stéroïdes constituent de puissants régulateurs de la balance Th1/Th2 et de ce fait de certaines maladies autoimmunes (Matsuzaki et coll., 2005). Lors de cette étude, il a été montré que la progestérone produite par les cellules Th2, (et non pas par les cellules Th1), induit la mort cellulaire par apoptose des cellules Th1 et inhibe la différenciation de ces cellules. Le second exemple d'hormone immuno-stéroïde est l'hormone 1 alpha, 25 dihydroxyvitamine D3 (1, 25(OH)(2)D), secostéroïde produite par les cellules dendritiques. Cette hormone serait capable d'inhiber certaines maladies autoimmunes (Matsuzaki et coll., 2005). D'autres cellules du système immunitaire peuvent également influencer la balance Th1/Th2. Ces cellules sont les lymphocytes T régulateurs.

2.2.2 Les principaux marqueurs des cellules Th1/Th2

2.2.2.1 GATA-3 et différenciation Th2

L'étude des gènes préférentiellement exprimés par les cellules Th2 a mené à l'isolement de GATA-3 (GATA-binding protéin-3). GATA-3 est exprimé au cours de la différenciation des cellules Th2, mettant en jeu des voies probablement impliquées dans l'activation IL-4-dépendante de Stat6. Contrairement aux cellules Th2, GATA-3 est indétectable dans les cellules Th1 (Zheng et Flavell., 1997 ; Zhang et coll., 1997 ; Ouyang et coll., 1998). Bien que l'activation de Stat6 est requise pour la différenciation Th2, son rôle direct dans la transcription de l'IL-4 reste encore à déterminer (Wurster et coll., 2000). Il a également été montré que GATA-3 régule directement l'expression de l'IL-5 et de l'IL-13 et de fait apparait

jouer un rôle global dans la régulation des cytokines Th2 (Zhang et coll., 1998, 1999). D'autre part, des études ont montré que GATA-3 est capable d'inhiber la production d'IFN- γ . Des transductions rétrovirales de GATA-3 au sein de cellules Th1 en développement entraîne une diminution significative de la production d'IFN- γ et par conséquent de la différenciation en Th1 (Ouyang et coll., 1998) (**Figure 14**). La capacité de GATA-3 à promouvoir l'engagement des cellules dans la lignée Th2 avec, concomitamment, l'inhibition du développement des cellules Th1, suggère un rôle clé de ce facteur de transcription dans le devenir de la balance Th1/Th2.

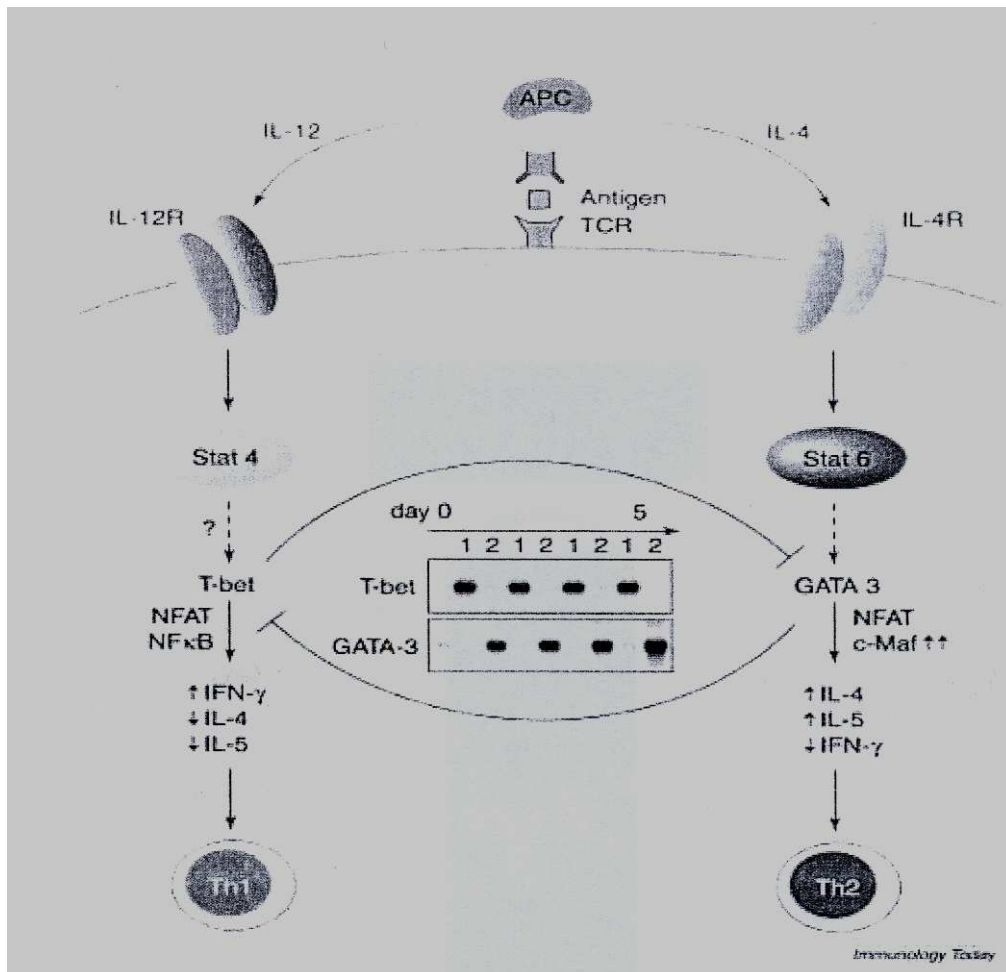


Figure 14 : Implication de GATA-3 et T-bet dans la polarisation de la balance Th1/Th2. D'après (Rengarajan et coll., 2000).

Les cellules Th naïves reçoivent des signaux provenant du TCR et des molécules costimulatrices. Si les conditions au moment de l'activation favorisent l'initiation de la différenciation Th1, par exemple la signalisation induite par l'IL-12 et passant par Stat4, T-bet est alors induit et promouvoit l'engagement du lignage Th1. Cependant, si GATA-3 est induit via l'activation de Stat6, les cellules Th se tournent vers la voie Th2 qui augmente la régulation de c-maf et la production d'IL-4 et donc par conséquent la polarisation Th2. Le

Northern Blot représenté au milieu de la figure montre les résultats obtenus après différenciation *in vitro* des cellules Th naïves soit en Th1 soit en Th2.

2.2.2.2 T-bet et IFN- γ dans les cellules Th1

Une sensible avancée dans l'étude de l'engagement des cellules dans la lignée Th1 et de l'expression de l'IFN- γ a été réalisée par l'isolement d'une nouvelle protéine : T-bet (T-box expressed in T cells) (Szabo et coll., 2000). Comme son nom l'indique, T-bet est un membre de la famille des facteurs de transcription capable de réguler de nombreux processus développementaux. L'expression de T-bet corrèle fortement avec l'expression de l'IFN- γ . Il est spécifiquement surexprimé par les cellules Th1 en cours de différenciation mais pas les Th2 (Szabo et coll., 2000). Des études de transduction rétrovirales de T-bet au sein de cellules Th en développement entraîne des productions élevées d'IFN- γ par ces cellules. La transduction de T-bet dans les cellules Th2 complètement différenciées les converti en cellules Th1 sécrétrices d'IFN- γ et reprime simultanément les cytokines Th2 telles que l'IL-4 et l'IL-5 (Szabo et coll., 2000).

L'ensemble de ces données tend à montrer que T-bet fonctionne en initialisant le programme de différenciation Th1 tout en réprimant la différenciation Th2.

2.2.3 Tissus adipeux comme glande endocrine

Pendant longtemps, le TA (Tissu Adipeux) a été considéré comme un simple tissu de stockage emmagasinant les graisses (triglycérides) en périodes d'abondance et les libérant (acides gras) lors de périodes de jeûne. Il est bien clair maintenant que ce tissu joue le rôle d'organe endocrine en plus de son rôle important dans le métabolisme énergétique.

Une étape majeure dans la reconnaissance du rôle sérotoire du TA blanc est arrivée dans les années 90 avec la découverte de l'expression du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) par ce tissu (Hotamisligil et coll., 1993), expression augmentant avec l'obésité. Cette cytokine joue un rôle important dans l'induction de l'insulinorésistance (Hotamisligil et coll., 1995). En plus, le TNF- α a des effets sur le métabolisme des adipocytes tels que la stimulation de la lipolyse et de l'apoptose (Prins et coll., 1997 ; Gasic, 1999 ; Trayhum et coll., 2006). Il est à noter que les macrophages infiltrés dans le TA sont la source majeure de TNF- α produit par ce tissu.

Le facteur de nécrose tumorale alpha (**TNF- α**) et l'interleukine 6 (**IL-6**) sont des cytokines identifiées à l'origine comme des molécules pro-inflammatoires. Le TNF- α , produit par les macrophages et les lymphocytes, a de nombreux effets : antitumoral, procoagulant, anorexigène et pyrogène. L'IL-6, produite par les fibroblastes, les cellules endothéliales, les myocytes et les cellules endocrines, stimule la production des anticorps par les plasmocytes et la synthèse des protéines de phase aiguë par les hépatocytes. TNF- α et IL-6 sont aussi produits par les adipocytes (Fried et coll., 1998). Ces cytokines ont une action autocrine (dirigée vers les cellules sécrétrices), paracrine (vers les cellules voisines) et endocrine. Leurs actions autocrine et paracrine prédominent sur leur effet endocrine, ce dernier s'observant surtout en cas d'hypersécrétion (comme c'est le cas dans l'obésité).

TNF- α est fortement surexprimé dans divers modèles animaux d'obésité et chez des patients obèses insulino-résistants (Hotamisligil et coll., 1995). Chez le rat obèse, la neutralisation du TNF- α résulte en une amélioration de la sensibilité à l'insuline et une augmentation de la capture péripériqué de glucose (Hotamisligil et coll., 1993). Cependant, cet effet n'a pas été mis en évidence chez l'homme. Chez les sujets obèses, les concentrations en TNF- α sont élevées et associées à des marqueurs d'obésité et d'insulino-résistance. Environ 30% de l'IL-6 sécrétée est issue du tissu adipeux. L'IL-6 plasmatique croît proportionnellement avec le développement de l'obésité (Mohamed-Ali et coll., 1997), et les études épidémiologiques en font un facteur de risque d'athérosclérose.

L'insulino-résistance induite par TNF- α pourrait être indirecte, par augmentation des taux d'AGL (*Acides Gras Libres*), mais aussi directe, par blocage des voies de transmission du signal insuline en inhibant l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline (Hotamisligil et coll., 1995). TNF- α bloque également la capture de glucose par régulation négative de l'expression du gène du transporteur de glucose GLUT-4 (Hauner, 1995). Par ailleurs, TNF α exercerait des effets délétères sur la fonction de la cellule β pancréatique en augmentant sa sensibilité aux effets glucolipotoxiques à travers la production de radicaux libres. L'implication du TNF- α dans l'insulino-résistance a été confirmée chez la souris obèse (*ob/ob*) invalidée pour le TNF- α ou pour ses récepteurs, les résultats montrant des concentrations réduites d'AGL et une amélioration de la sensibilité à l'insuline.

Il est cependant difficile de déterminer si l'augmentation des niveaux de TNF- α et d'IL-6 sont la cause ou bien la conséquence de l'insulino-résistance induite par l'obésité. A la différence de la leptine, dont l'effet métabolique maximal se réalise dans l'organisme de poids normal, l'effet délétère du TNF- α survient lorsque l'animal commence à devenir obèse. Cependant,

l'hyperproduction de TNF- α par l'adipocyte du sujet obèse inhibe la synthèse des triglycérides dans les adipocytes, limitant l'hypertrophie adipocytaire. Si la participation du TNF- α et de l'IL-6 au syndrome métabolique ne fait guère de doute, leur contribution au risque génétique de diabète de type 2 et d'insulinorésistance reste discutée.

Une autre étape importante dans l'identification du TA comme organe endocrine consiste en la découverte de l'expression de la leptine en 1994 (Zhang et coll., 1994). La leptine, une autre cytokine produite principalement par le tissu adipeux, a pour rôle majeur d'assurer un contrôle à long terme de la masse graisseuse. Elle est considérée comme une cytokine pro-inflammatoire avec une structure similaire aux IL-6 et IL-12. Son rôle essentiel est le contrôle de l'appétit et la régulation de la prise alimentaire (La Cava et coll., 2004). Sa sécrétion est proportionnelle à la masse de tissu adipeux et ses effets sont principalement centraux : la liaison de la leptine sur son récepteur hypothalamique réduit la prise alimentaire et modifie le tonus du Système Nerveux Autonome, agissant ainsi sur la sécrétion de l'insuline, la production hépatique de glucose et le métabolisme glucolipidique musculaire (Harris, 2000 ; Rayner et coll., 2001). Comme il existe des récepteurs de la leptine fonctionnels au niveau des tissus périphériques insulinosensibles, une action directe de cette hormone a été suggérée, mais les résultats des études sont contradictoires. Il semble cependant que la leptine, tout comme l'adiponectine, soit capable de stimuler le MAP (*Mitogen Activated Protein*) kinase et agir ainsi sur la concentration musculaire de malonyl-CoA et sur l'oxydation des acides gras. ***Le rôle clef de la leptine est la régulation de l'homéostasie énergétique.*** Elle fonctionne en donnant un signal négatif pour le stockage des lipides. La leptine est une forme de lipostat : en réponse à l'augmentation des réserves adipeuses, elle provoque l'arrêt de la prise alimentaire et augmente les dépenses énergétiques, exerçant ainsi un rétrocontrôle négatif sur la masse adipeuse (Ailhaud, 2006). Par ailleurs, la sécrétion de la leptine est plus importante dans le TA sous-cutané que dans le tissu adipeux viscéral et la concentration circulante élevée de cette hormone trouvée chez les femmes est probablement relative à une proportion, plus élevée, de TA sous-cutanée (Ahima et coll., 2000). La leptine joue encore un rôle dans l'immunité en stimulant la sécrétion des IL-12, IL-6 et TNF- α dans les macrophages et les monocytes (Gainsford et coll., 1996).

Parmi les autres protéines sécrétées essentiellement par les adipocytes, on peut citer aussi l'adiponectine qui est une protéine plasmatique sécrétée également par les cellules musculaires squelettiques et les cellules endothéliales (Delaigle et coll., 2004 ; Wolf et coll., 2006). Elle a été identifiée et caractérisée de manière indépendante et simultanée par plusieurs

auteurs, chez l'homme comme chez la souris. Cela explique ses diverses appellations dans la littérature : adipoQ, par analogie structurale avec la fraction C1q du complément et des cytokines de type TNF, ACRP30 (*Adipocyte Complement-Related Protein 30*) ou GBP28 (*Gelatin Binding Protein 28*). Dès sa découverte par Scherer en 1995, le rôle de l'adiponectine dans l'homéostasie énergétique a été suspecté du fait de la modulation de sa sécrétion par l'insuline. Son implication dans le catabolisme des lipides a été aussi suggérée. Il a fallu attendre les années 2000 pour que la relation étroite entre insulino-résistance et adiponectine soit métaboliquement confirmée et ses bases moléculaires en partie expliquées. Chez l'homme, l'adiponectine est corrélée négativement à l'indice de masse corporelle (IMC) (Weyer et coll., 2001). Les situations pathologiques associant une insulino-résistance au diabète de type 2 et à l'obésité, comme c'est le cas du diabète gestationnel, présentent des taux sériques d'adiponectine effondrés (Guerre-Millo et coll., 2004 ; Atégbo et coll., 2006). Cela suggère que l'adiponectine pourrait être non seulement un marqueur de sensibilité à l'insuline, mais aussi un lien métabolique entre l'activité du tissu adipeux et l'insulino-résistance.

Si la variation des taux sériques d'adiponectine est étroitement liée à la sensibilité à l'insuline chez l'homme, la relation causale entre ces deux événements reste à démontrer. Cependant, la diminution des taux d'adiponectine semble précéder l'apparition de l'insulino-résistance, et prédit mieux que la glycémie et l'insulinémie la progression vers le diabète de type 2 (Stefan et coll., 2002). Une perte de poids chez des sujets obèses accompagnée d'une amélioration de l'insulinosensibilité entraîne une augmentation des taux plasmatiques d'adiponectine. De plus, les effets insulinosensibilisants des nouvelles molécules antidiabétiques comme les agonistes du récepteur nucléaire PPAR γ (thiazolidinones) s'accompagnent d'une élévation de l'adiponectinémie. L'effet de l'adiponectine dans la régulation de l'homéostasie énergétique a été le plus étudié ; elle induirait un accroissement de l'oxydation des AGL (Fruebis et coll., 2001) et la dissipation d'énergie par le muscle, conduisant à une diminution du contenu musculaire, mais aussi hépatique, en triglycérides (Yamauchi et coll., 2001). L'adiponectine permettrait également d'augmenter la capture musculaire du glucose et de diminuer sa production par le foie (principale anomalie responsable de l'hyperglycémie postprandiale des diabétiques), sans variation directe des taux plasmatiques. Tous ces effets entraîneraient une amélioration des paramètres majeurs de l'homéostasie glucidique (capture de glucose, production hépatique de glucose) non pas à travers un effet sur la sécrétion d'insuline, mais par la potentialisation de ses effets tissulaires.

Il reste beaucoup d'inconnues dans le mode d'action de l'adiponectine. Si cette hormone ne semble pas avoir d'effet direct sur la cellule β (l'incubation d'îlots de Langerhans avec de l'adiponectine ne modifie en particulier pas la sécrétion d'insuline en réponse au glucose), d'autres effets sur la balance énergétique, en particulier centraux, ne sont pas à exclure. De plus, l'expression du gène *APM1* (*Adipose Most abundant gene transcript 1*) codant l'adiponectine et sa sécrétion semble hautement régulée par l'état métabolique : d'autres cytokines, le $\text{TNF-}\alpha$ en particulier, sont de puissants inhibiteurs de l'expression d'*APM1* ce qui pourrait expliquer l'hypoadiponectinémie associée à l'obésité.

2.2.3.1 Les adipokines

Comme le nombre des protéines sécrétées par le TA ne cesse d'augmenter, il est devenu primordial de leur accorder un nom collectif (Trayhum et coll., 2004). Le terme introduit et couramment utilisé est <<adipocytokines>> (Funahashi et coll., 1999). Mais, comme la majorité des protéines sécrétées par les TA ne sont ni des cytokines, ni ne s'y apparentent (*cytokine-like*), il a été recommandé d'adopter universellement la dénomination <<adipokine>> pour définir une protéine sécrétée par le TA (Trayhum et coll., 2004). Le terme << adipokine >> est utilisé en général pour définir l'ensemble des molécules (cytokines ou non) sécrétées par le TA, et non seulement par les adipocytes puisque les macrophages qui infiltrent ce tissu sont responsables de la sécrétion d'un bon nombre de ces adipokines (Weisberg et coll., 2003).

Le nombre total d'adipokines répertoriées, à la fois documentées et spéculées dépasse la cinquantaine. Bon nombre de ces adipokines sont impliquées dans la réponse immunitaire et dans l'inflammation ainsi que dans les interactions entre les adipocytes et le système immunitaire (Pond, 2005). La diversité des adipokines est considérable, en termes de structure de protéine et de fonction. Les adipokines englobent des cytokines pro-inflammatoires telles que ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-8 , IL-10), des chimiokines telles que la Protéine Chémoattractrice des Monocytes de type 1 (MCP-1, les protéines du système de complément alternatif (ex, adiposine), les protéines impliquées dans l'homéostasie vasculaire (ex, Inhibiteur de l'Activateur de plasminogène-1 (PAI-1), dans la pression artérielle (angiotensinogène), le métabolisme des lipides (ex, protéine de transfert des esters de cholestérol, protéine de liaison du rétinol), l'homéostasie du glucose (ex, adiponectine), la prise alimentaire (leptine) et l'angiogenèse (Facteur Endothélial Vasculaire de croissance) (VEGF) (Trayhum et coll., 2006).

2.2.3.2 Les cytokines

Les cytokines ont été décrites par McDermott (2001) comme des protéines pharmacologiquement actives avec une masse moléculaire relativement faible (8 à 30 kDa) agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. Elles sont généralement sécrétées par les cellules du système immunitaire dont le but est de modifier ses propres fonctions (effet endocrine) ou celles des autres cellules adjacentes (effet paracrine). Ces cytokines exercent des activités biologiques multiples surtout dans l'inflammation et la réponse immunitaire (Coppack, 2001). Plus de 200 ligands de cytokines ont été identifiés et regroupés sous plusieurs familles comme :

- Les interférons (IFN), découverts en 1957 et connus pour leur activité antivirale. Il en existe trois isoformes $-\alpha$, $-\beta$, $-\gamma$.
- Les interleukines (IL). Il s'agit de cytokines regroupées sous cette terminologie sans parenté biochimique ni de fonction, mais classées par commodité au gré des découvertes. Le terme a été créé en 1979 à une époque où seulement deux interleukines étaient connues (IL-1 et IL-2).
- Les chimiokines. Ce terme définit l'ensemble des cytokines de très faible poids moléculaire, ayant toutes en commun un pouvoir chimiotactique.
- La famille du facteur de nécrose tumorale (TNF). Des membres issus d'un gène ancestral commun pouvant aussi être à la surface des cellules comme TNF ($-\alpha$, $-\beta$).
- Les facteurs de stimulation des colonies (CSF). Il s'agit de cytokines jouant un rôle dans l'hématopoïèse, mais aussi pouvant activer les leucocytes matures.
- Les facteurs de croissance transformant (TGF). Ce sont des facteurs de croissance impliqués dans la cicatrisation et le contrôle négatif de l'inflammation.

2.2.4 Inflammation et immunité : implications dans l'obésité et le diabète

2.2.4.1 Cellules Th1 et Th2 dans l'obésité et l'insulino-résistance

Il a été récemment développé un modèle de bébés macrosomiques, nés de rattes rendues diabétiques qui, à l'âge adulte, deviennent obèses, qui sont marqués par l'augmentation du taux de lipides (cholestérol total, LDL, VLDL, etc.) et qui développent l'insulino-résistance. De même, il a été constaté que ces animaux obèses ont un taux très élevé en cytokines pro-inflammatoires, l'IFN- γ et l'IL-2 (Khan et coll., 2006). Chez ces mêmes

animaux, il n'y a pas eu modification du taux de l'IL-4, mais le rapport l'IFN- γ /IL-4 augmente de l'ordre de 21, suggérant que la différenciation des cellules naïves Th0 vers le phénotype Th1 est accélérée lors de l'installation de l'obésité (Khan et coll., 2006). A notre surprise, nous avons constaté que le taux de cytokines pro-inflammations Th1 diminue chez les sujets atteints du diabète gestationnel (Atègbo et coll., 2006). En effet, il a été démontré qu'une baisse du phénotype Th1 est impliquée dans l'installation de la grossesse. Les bébés macrosomiques, nés de ces mères, ont par contre une différenciation accélérée vers le phénotype Th1, indiquant un état inflammatoire de ces enfants.

Verwaerde et coll., (2006) ont effectué une étude sur des souris maintenues sous un régime riche en lipides (HFD en anglais, *high fat diet*). Ils ont démontré que ce régime module les fonctions lymphocytaires car ils constatent l'augmentation du rapport l'IFN- γ /IL-4, indiquant un rôle du système immunitaire dans le micro-environnement hépatique de la souris ob/ob (souris obèses déficientes en leptine). Ils ont constaté que le régime HFD induit l'obésité chez ces animaux et oriente la différenciation des cellules T hépatiques vers le phénotype Th1. *Ainsi les cellules Th1, responsables de l'inflammation hépatique, pouvaient aggraver l'obésité et l'insulino-résistance.*

2.2.4.2 Modulation des cellules Th1/Th2 par la leptine, l'adiponectine et l'insuline

La leptine, impliquée dans la régulation de l'obésité, en modifiant le métabolisme lipidique, diminue l'appétit en interférant avec le neuropeptide Y et le récepteur de la mélanocortine dans l'hypothalamus (Halaas et coll., 1995 ; Li et coll., 2005). La leptine est également produite par le placenta ; sa concentration est élevée chez les sujets obèses. Elle exerce un effet agrégeant sur les plaquettes sanguines, et, par conséquent, pourrait réguler le système immunitaire. Les récepteurs de la leptine ont été récemment identifiés sur les lymphocytes murins (Papathanassoglou et coll., 2006) ; ils inhibent l'apoptose cellulaire T et favorisent leur survie en modifiant la signalisation via le facteur de transcription STAT-3 qui régule les gènes de réparation de l'ADN et permet la résistance aux traitements génotoxiques (Vigneron et coll., 2006). En ce qui concerne la différenciation cellulaire T, la leptine induit la polarisation des cellules Th0 vers le phénotype Th1 et augmente la sécrétion de cytokines proinflammatoires.

Une étude effectuée sur des enfants obèses indique une corrélation positive entre le pourcentage de cellules T sécrétant l'IFN- γ , la concentration de leptine et l'insulinorésistance (Pacifico et coll., 2006). Lorsque les cellules dendritiques humaines sont traitées par cette protéine, on constate qu'elles favorisent la polarisation des cellules naïves Th0 vers le phénotype Th1 et diminuent la sécrétion de IL-10, une cytokine de phénotype Th2 (Mattioli et coll., 2005). Chez les enfants malnutris, l'augmentation du poids corporel est liée à l'augmentation du taux de leptine et à la différenciation accélérée des cellules Th1 qui sécrètent abondamment l'IFN- γ (Palacio et coll., 2002). ***Il est maintenant clairement établi que la leptine, en stimulant la différenciation des cellules Th0 vers le phénotype Th1, exerce une action proinflammatoire.***

En ce qui concerne l'**adiponectine**, nous ne disposons pas d'étude directe qui démontre son action sur la différenciation de ces cellules. Il a été démontré que l'inflammation hépatique, induite par l'activation des cellules T, est associée à une baisse du taux d'adiponectine (Morris et coll., 2006), suggérant **un effet anti-inflammatoire de cette adipokine**.

Les lymphocytes T n'expriment les récepteurs de l'insuline (IR) que s'ils sont activés. Des lors, l'insuline oriente la différenciation des lymphocytes naïfs vers le phénotype Th2 (Viardot et coll., 2006), indiquant que les **effets anti-inflammatoires de cette hormone passeraient également par une action directe sur ces cellules immunitaires**. Ces observations, à nouveau, démontrent une interaction entre la différenciation des cellules T et cette hormone hypoglycémisante.

2.2.4.3 Rôle des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-6) dans l'obésité et l'insulinorésistance

Il a été démontré que le tissu adipeux, mis à part la sécrétion des adipokines (adiponectine et leptine), sécrète également des cytokines pro-inflammatoires, principalement **TNF- α et IL-6**. Creely et coll., (2007) ont étudié l'interaction entre les adipokines et les récepteurs TLR (en anglais, *toll-like receptors*), impliqués dans la détection des composés microbiens, sur des adipocytes humains isolés. Ils ont conclu que le lipopolysaccharide, composant essentiel de la paroi bactérienne, augmente non seulement la sécrétion du TNF- α et de l'IL-6 mais également l'expression de TLR-2 sur les adipocytes via la cascade de l'inflammation.

En ce qui concerne **TNF- α** , on peut noter les observations suivantes : 1) TNF- α est exprimée d'une manière constitutive par le tissu adipeux ; 2) les souris génétiquement obèses (ob/ob) et les rats (fa/fa) Zucker) expriment abondamment cette cytokine dans leur tissu adipeux (Hotamisligil et coll., 1994 ; 1995), et 3) TNF- α est le médiateur de l'insulinorésistance chez ces animaux. Le tissu adipeux des sujets obèses contient donc beaucoup plus de TNF- α que celui des sujets minces (Hotamisligil et coll., 1994 ; Sartipy et coll., 2003).

Il a été signalé par Weisberg et coll., (2003) que le tissu adipeux des sujets obèses contient non seulement des adipocytes mais aussi des cellules endothéliales et des macrophages qui l'infiltrent. Ces mêmes auteurs ont démontré que l'IMC est directement lié au degré d'infiltration des macrophages. De plus, les adipocytes libèrent des facteurs qui favorisent l'infiltration et la différenciation des macrophages comme le MCP-1 (en anglais, *monocyte chemoattractant protein-1*), un agent chimiotactique monocytaire, et le CSF-1 (en anglais, *colony stimulating factor*), un facteur responsable de la différenciation monocyte-macrophage. Récemment Lacasa et coll., (2006), effectuant des expériences sur des adipocytes humains en présence de surnageant de macrophages, ont suggéré que les macrophages infiltrés dans le tissu adipeux pourraient exercer une action paracrine et, par conséquent, moduler les fonctions adipocytaires.

Il existe une corrélation positive entre TNF- α et le taux de C-peptide (Winkler et coll., 2002). Le tissu adipeux de sujets obèses contient beaucoup plus d'iNOS (en anglais, *inducible NO synthase*), de TGF (*Transforming Growth Factor-beta-1*), de protéine C-réactive et d'ICAM (*Intercellular Adhesion Molecule*) que les sujets minces (Hotamisligil et coll., 1994 ; Sartipy et coll., 2003). Il est intéressant de noter que le taux des ARNm de TNF- α diminue après une baisse de poids chez les sujets obèses (Hotamisligil et coll., 1995 ; Kern et coll., 1995). Clement et coll., (2004) ont constaté, chez les patients obèses, qu'un régime peu calorique diminue non seulement la masse graisseuse mais également l'expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires dans les adipocytes. Ce régime augmente par contre l'expression des gènes codant pour les agents anti-inflammatoires. D'autres études démontrent aussi qu'une baisse de l'IMC est associée à la diminution de facteurs inflammatoires chez les sujets obèses (Kopp et coll., 2003 ; Esposito et coll., 2003). Ces observations suggèrent qu'il existe une corrélation directe entre l'obésité et l'état inflammatoire (Dandona et coll., 1998 ; 2004 ; 2005).

Il a été démontré que TNF- α interfère avec le mécanisme d'action de l'insuline, probablement, au niveau de l'activation des récepteurs tyrosine kinase de cette hormone (Cheatham et coll., 1995). L'effet inhibiteur de TNF- α sur l'insuline va également influencer la lipogenèse adipocytaire et stimuler la lipolyse (Eckel, 1992), suggérant que TNF- α est un modulateur des fonctions adipocytaires. L'administration des récepteurs de TNF- α , qui se fixent sur la cytokine TNF- α endogène, normalise l'insulinosensibilité (Hotamisligil et coll., 1993).

Une croissance soutenue du tissu adipeux aboutit au développement du syndrome métabolique marqué par le diabète de type 2, de l'hypertension et de l'état inflammatoire. L'inhibiteur physiologique de l'activateur tissulaire du plasminogène (PAI-1) constitue l'un des facteurs impliqués dans ce processus. En effet, il a été rapporté que TNF- α , sécrétée par les adipocytes, serait responsable de l'augmentation de la concentration plasmatique de PAI-1, puis de complications cardio-vasculaires (Samad et coll., 1999). ***On peut donc conclure que TNF- α est responsable de l'insulinorésistance*** (Dandona et coll., 2004 ; 2005) ***et que son rôle principal serait d'induire l'inflammation et de prolonger un état d'insulinorésistance.***

L'IL-6 semble également être impliquée dans la pathogenèse du diabète de type 2, l'adiposité anormale et les anomalies lipidiques (Mohamed-Ali et coll., 1997). ***Il est intéressant de noter qu'entre 10% et 30% du taux d'IL-6 circulant sont dérivés des tissus adipeux, ce qui suggère son rôle probable dans les pathologies métaboliques.*** L'IL-6 régule l'équilibre énergétique. Chez l'homme et chez l'animal, il existe une corrélation positive entre son taux et celui de la leptine. L'IL-6 peut aussi jouer un rôle dans l'adiposité au niveau central. En effet, l'hypothalamus ventro-médiane, région qui contrôle l'équilibre énergétique, exprime les récepteurs de l'IL-6 (Schobitz et coll., 1993). Les souris, n'exprimant pas le gène de cette cytokine, développent prématurément l'obésité car elles mangent exagérément (Wallenius et coll., 2002) alors que son administration intra-cérébro-ventriculaire corrige l'obésité (Wallenius et coll., 2002) et diminue la masse graisseuse chez les primates (Ettinger et coll., 1995). Malgré ces observations, le rôle exact de l'IL-6 dans la régulation de l'obésité n'est pas bien défini. Toutefois, il existe une corrélation positive entre le taux de L'IL-6 circulant, l'adiposité (Mohamed-Ali et coll., 1997) et l'insulinorésistance (Bastard et coll., 2002).

Il a été suggéré que l'augmentation de TNF- α et de l'IL-6 chez les sujets diabétiques est une conséquence du stress oxydatif induit par l'hyperglycémie (Sternberg, 1992). Mohanty et

coll., (2000) ont démontré que l'ingestion de glucose chez les sujets normaux diminue la concentration de l' α -tocophérol (vitamine E) et augmente l'expression du facteur cytosolique p47phox dans les cellules mononucléaires périphériques. De plus, chez ces sujets, la production des ROS (en anglais, reactive oxygen species) augmente de l'ordre de 200% par rapport à la concentration basale. *Tout comme TNF- α , l'IL-6 diminue également la signalisation de l'insuline* (Senn et coll., 2002) *et, par conséquent, contribue à l'insulinorésistance.*

2.2.4.4 Interactions entre adiponectine, leptine, IL-6 et TNF- α

L'adiponectine exerce un effet insulinosensibilisant, anti-athérogénique et anti-inflammatoire ; son taux élevé est parallèle à l'insulino-sensibilité (Diez et coll., 2003). L'adiponectine agit comme une hormone insulino-sensibilisante dans le foie et les muscles et, par conséquent, augmente l'oxydation des acides gras dans les muscles squelettiques (Combs et coll., 2001 ; Hotta et coll., 2001). Bahia et coll., (2006) ont effectué une étude sur des sujets minces et obèses, atteints du syndrome métabolique et ont établi une corrélation entre le faible taux d'adiponectine et ceux élevés de la CRP, du fibrinogène et de PAI-1 observés chez les sujets obèses. Meller et coll., (2006) ont démontré que la concentration de l'adiponectine diminue au cours des grossesses compliquées par le diabète maternel, diminution responsable, en partie, de l'hyperglycémie.

Les femmes atteintes de diabète gestationnel ont un taux d'adiponectine significativement bas comparées aux sujets témoins (Atègbo et coll., 2006). Il existerait une corrélation inverse entre le taux plasmatique d'adiponectine, l'insulino-résistance, le taux de triglycérides et des récepteurs de TNF- α (Fernandez-Real et coll., 2000). L'adiponectine augmente l'insulino-sensibilité mais son mécanisme d'action n'est pas encore élucidé (Arita et coll., 1999), bien que ses deux récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 soient exprimés dans les îlots pancréatiques (Staiger et coll., 2005). *La cytokine TNF- α et l'adiponectine peuvent contrecarrer leurs mécanismes d'action ; ils exercent des effets opposés sur la signalisation de l'insuline : TNF- α diminuant et l'adiponectine augmentant la phosphorylation des récepteurs tyrosine kinases de l'insuline* (Stefan et coll., 2002). De plus, les taux élevés de TNF- α peuvent aboutir à une baisse de la synthèse de l'adiponectine, car le premier freine la synthèse du dernier (Ruan et coll., 2004). Par ailleurs, Lihn et coll., (2003) constatent que *TNF- α et IL-6 diminuent la synthèse et l'expression de l'adiponectine.*

La leptine induit la sécrétion de TNF- α et de l'IL-6 ainsi que celle de l'IL-1 β (Mattioli et coll., 2005) ; elle semble exercer un effet immunomodulateur qui augmente le risque de l'infection. Il est intéressant de noter que les souris ob/ob qui ne synthétisent pas cette adipokine sont susceptibles aux infections car leur système immunitaire est déprimé. Ces souris sont résistantes pour des pathologies auto-immunes qui nécessitent l'activation prolongée du système immunitaire. L'administration de la leptine exogène à ces animaux restaure l'installation de ces pathologies et accélère l'installation du diabète chez la souris NOD (*en anglais, non-obese diabetic*) (Matarese et coll., 2002). Toutes ces observations sont en accord avec le fait que *la leptine est l'inductrice de la différenciation cellulaire Th0 en phénotype Th1 qui sécrète les cytokines proinflammatoires impliquées dans l'installation des pathologies auto-immunes*. Il est à noter que les femmes ont un taux plus élevé de leptine que les hommes et qu'elles développent les maladies auto-immunes beaucoup plus fréquemment que ces derniers. La leptine induit également le stress oxydatif, l'inflammation dans les cellules endothéliales (Matarese et coll., 2002) et l'activation du facteur transcriptionnel NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B) (Mattioli et coll., 2005). Lorsqu'on provoque une inflammation hépatique en injectant à des souris la concavaline-A, on constate une augmentation de la sécrétion de leptine et de TNF- α alors que la concentration de l'adiponectine diminue (Morris et coll., 2006). D'autre part, l'administration des anticorps anti- TNF- α diminue l'inflammation et restaure le taux de l'adiponectine.

Ces résultats suggèrent que la leptine est pro-inflammatoire et que l'adiponectine exerce un effet anti-inflammatoire.

Nous venons de voir, dans ce chapitre, que l'activation cellulaire T est complexe et fait intervenir de nombreuses voies de signalisation. Est-ce que les AGPI n-3 peuvent interférer avec ces voies de signalisation ? Ces aspects sont exposés dans le chapitre suivant.

Chapitre 3.

AGPI n-3 et système immunitaire : mécanismes impliqués dans leurs effets immunomodulateurs

3.1 Introduction

Le fonctionnement du système immunitaire peut être altéré par une malnutrition ou un déséquilibre alimentaire. En effet, certaines inflammations sont parfois favorisées par un apport trop important ou insuffisant, par l'alimentation, de nutriments particuliers. Concernant le rôle des AGPI sur la modulation du système immunitaire, de nombreuses études ont été réalisées au cours de ces dernières années. Les mécanismes moléculaires des acides gras sont encore mal connus. Ils pourraient avoir soit des effets directs, soit des effets indirects.

Les AGPI pourraient exercer des effets sur :

- le métabolisme des cellules, du fait du changement de composition des phospholipides membranaires en acides gras
- la peroxydation lipidique
- l'expression de certains gènes
- la production de certains eicosanoïdes

3.2 Effets des acides gras sur la prolifération des lymphocytes

Les premières études réalisées dans les années 1970-1980 ont montré que, chez le rat, l'acide oléique, l'EPA et le DHA inhibent la prolifération des lymphocytes induite par deux mitogènes, la concanavaline A (ConA) et la phytohémagglutinine (PHA), dans la rate, le thymus et les ganglions (Yaqoob et Calder, 1993). De plus, les acides gras saturés ont moins d'effets que les AGPI. Par conséquent, il pourrait exister une corrélation entre le degré d'insaturation et l'activité biologique de ces acides gras. Des études ont mis en évidence que l'acide laurique (C₁₂) et myristique (C₁₄) n'exercent pas d'effet inhibiteur sur la prolifération des cellules T. Cependant, l'acide stéarique (C₁₈) exerce des effets similaires à l'acide oléique

(Calder et Newsholme, 1992; Soyland et coll., 1993; Rotondo et coll., 1994). La longueur de la chaîne pourrait également être responsable de certaines actions des acides gras.

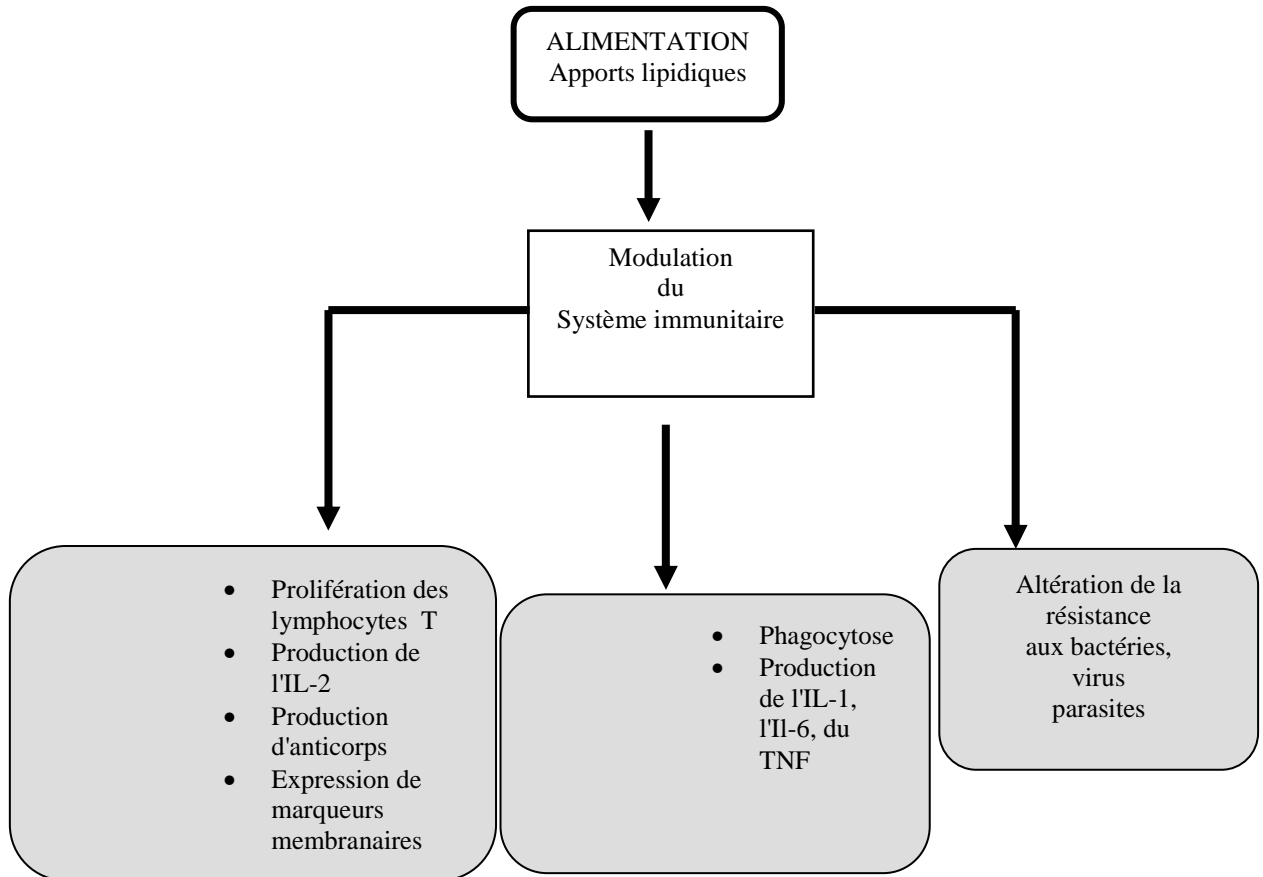


Figure 15 : Effets des acides gras sur le système immunitaire. D'après (Chang et coll., 1992; Paul et coll., 1997).

La prolifération des cellules T résulte de la sécrétion de cytokines, particulièrement l'IL-2. L'IL-2, cytokine essentielle à la croissance et la différenciation cellulaire T, est parfois utilisée pour induire la prolifération de ces cellules. Rotondo et coll. (1994) ont montré que plusieurs acides gras inhibent la prolifération des cellules T du thymus stimulée par l'IL-2. La peroxydation des lipides et les eicosanoïdes produits à partir de ces acides gras ne sont pas responsables de cet effet (Soyland et coll., 1993; Rotondo et coll., 1994; Calder, 1997). Par contre, l'incorporation dans les phospholipides membranaires des acides gras ajoutés pourrait modifier la fluidité membranaire affectant la transmission du signal c'est-à-dire la réponse des cellules aux différents mitogènes employés.

Calder et coll. (1997) ont mis en évidence que 40 à 50% de la production de l'IL-2 est inhibée par l'acide oléique, l'acide linoléique, l'acide α -linoléique, l'AA, l'EPA et le DHA. Par contre, les acides gras saturés (AGS) n'exercent aucun effet.

De plus, Soyland et coll. (1993) ont mis en évidence qu'une alimentation enrichie en AGPI diminue l'expression du récepteur à l'IL-2 (IL-2R). Cependant, le mécanisme de régulation de l'expression du gène de l'IL-2R n'est pas encore connu.

La production d'autres cytokines, telles que l'interleukine 1 (IL-1) et le facteur de nécrose tumorale (TNF), impliquées dans les phénomènes pro-inflammatoires, diminue lors de la prise d'un régime enrichi en AGPI n-3 tel que le régime méditerranéen. L'arrêt du régime entraîne un retour des taux d'IL-1 et de TNF au niveau où ils étaient avant la prise du régime (Endres et coll., 1989).

De plus des études ont montré que la diminution de la production d'IL-1 varie selon la durée du régime (de Pablo et coll., 1998). De plus, de Pablo et coll (1998) ont également démontré qu'un régime à base d'huile de poisson peut supprimer la production d'IL-1 au bout de quatre semaines chez le rat alors qu'un régime à base d'huile d'olive agit au bout de 8 semaines. Les effets des acides gras sont doses-dépendants.

Les acides gras agissent également sur la différenciation des cellules T, notamment les cellules T CD4+. La décision finale pour une cellule CD4 de se différencier en cellules Th1 ou Th2 est prise au cours de sa première rencontre avec l'antigène. Des études ont mis en évidence que l'EPA et le DHA diminuent la production de l'IL-2 par les cellules Th1 et stimulent la production de l'IL-4 issues des cellules Th2 (Arrington et coll., 2001; Wallace et coll., 2001). Ainsi, les AGPI n-3 semblent modifier la balance Th1/Th2 en favorisant la différenciation des cellules T effectrices immatures (Th0) en cellules T auxiliaire (Th2.).

En ce qui concerne les acides gras de la famille n-6, il semblerait qu'ils n'ont pas d'effet sur la prolifération des cellules T, *ex-vivo*. Cependant, les études réalisées ont été très controversées car les concentrations d'acides gras utilisées ainsi que la durée des régimes étaient différentes d'une expérience à l'autre.

3.3 Effet des acides gras sur l'activité des cellules tueuses

Les cellules tueuses (NK, natural killer) protègent l'organisme contre les virus, les bactéries ou le développement des cellules tumorales. La composition en acides gras de l'alimentation influence la résistance à ce type d'infection (Barone *et coll.*, 1989; Jeffery et coll., 1996). En effet, la diminution du taux d'acides gras totaux dans l'alimentation induit une augmentation de l'activité des cellules NK. De plus, une alimentation enrichie avec de l'huile de poisson ou de l'huile d'olive entraîne une forte diminution de l'activité de ces cellules. Cet

effet est bénéfique pour certaines maladies auto-immunes impliquant une suractivation des cellules NK telles que le psoriasis, certaines arthrites et scléroses (Kastrukoff et coll., 1998; Filaci et coll., 1999). Kastrukoff et coll. (1998) ont déterminé chez des patients atteints de psoriasis une surexpression de marqueurs des cellules NK : CD16, CD57 et CD94. De plus, certains auteurs ont observé chez ces patients une diminution du taux d'IL-2, IL-12 et IL-15, cytokines capables de diminuer l'activité des NK (Lopez-Botet et coll., 2000; Woldman et coll., 2001). Les NK semblent être très actives au moment du déclenchement de la maladie et auraient un rôle dans l'initiation de son développement (Lanier, 2000; Lopez-Botet et coll., 2000). Cependant, le mécanisme d'action des NK est encore mal connu. Ces cellules sont capables d'induire la différenciation des cellules T vers le phénotype Th1 qui infiltrerait les lésions au cours de cette pathologie (Bonish et coll., 2000; Lanier, 2000; Lopez-Botet et coll., 2000).

Les effets des acides gras n-3 sur l'activité des cellules NK ont été bien documentés. Kelley et coll. (1992) ont montré que les effets observés en présence d'huile de poisson et d'huile d'olive pourraient être corrélés à leur richesse en DHA puisqu'ils observent le même effet lorsqu'ils donnent une alimentation enrichie avec cet acide gras. Notons que Yamashita et coll (1986) ont démontré que l'EPA et le DHA exercent des effets additifs sur l'inhibition de l'activité des cellules NK.

Par contre, la consommation d'acides gras n-6 ou d'acides gras saturés provoque une moindre diminution de cette activité (Thies et coll., 2001). La supplémentation du régime alimentaire en AA (1,5g/j pendant 50 jours) n'a pas d'effet sur l'activité des cellules NK, la prolifération des lymphocytes T et la prolifération des lymphocytes B stimulée par des mitogènes. De même, les sécrétions de l'IL-2 et du TNF- α ne sont pas modifiées. Selon certains auteurs, les effets des acides gras n-6 sont dus à la production des eicosanoïdes (Roder et Klein, 1979; Bray, 1986).

3.4 Acides gras, phagocytose et réponse inflammatoire

Le phénomène de phagocytose permet d'éliminer les micro-organismes et les différentes particules produits par les vésicules d'endocytose. La fluidité membranaire joue un rôle important dans ce mécanisme, ce qui est en corrélation avec les effets modulateurs des acides gras. Cependant, les acides gras n-3 n'inhibent pas ou n'ont pas d'effet sur la phagocytose. Ces résultats ont été obtenus à partir d'études réalisées sur les animaux, souris et porcs, mais n'ont pas encore été démontrés chez l'homme (De Pablo et coll, 2000).

En ce qui concerne les phénomènes inflammatoires, Kremer et coll. (1990) ont démontré qu'une alimentation enrichie en acides gras n-3 chez des personnes atteintes de polyarthrite rhumatoïde (PR) diminue les symptômes de la maladie. De plus, il est intéressant de noter que chez les personnes atteintes de psoriasis on observe une augmentation du taux d'AA et des produits dérivés de la 5-lipoxygénase. Par ailleurs, une alimentation enrichie en n-3 diminue le taux d'AA et les dérivés des lipoxygénases.

Ainsi chez l'homme, la PR, le psoriasis ainsi que le lupus érythémateux sont des maladies sensibles au DHA et à l'EPA (Bittiner et coll., 1988; Mayser et coll., 2002). A l'opposé, toujours chez l'homme, un enrichissement en AA tend à faire augmenter les désordres inflammatoires et les phénomènes allergiques.

De plus, différentes études ont démontré, chez des patients, qu'une alimentation enrichie en EPA et/ou en DHA peut diminuer ou augmenter leur résistance à certaines infections suivant l'agent infectieux (**Figure 15**). Ainsi, l'EPA et le DHA diminuent la résistance des patients infectés par certaines bactéries comme *mycobacterium tuberculosis* et *Salmonella typhimurium* (Chang et coll., 1992; Paul et coll., 1997). Par contre, ces acides gras augmentent la résistance des patients atteints par *Klebsiella pneumoniae*, bactérie colonisant le tube digestif (Bjornsson et coll., 1997).

Ainsi, ces acides gras insaturés sont capables de favoriser ou de diminuer la résistance à l'infection.

3.5 Les eicosanoïdes

3.5.1 Les médiateurs de l'inflammation

Les acides gras polyinsaturés n-6 et n-3 sont les précurseurs de molécules biologiquement très actives : les eicosanoïdes. Sont classées sous ce terme les leucotriènes et les prostanoides formées via, respectivement deux enzymes clés, les lipoxygénases et les cyclooxygénases (COX). Ces molécules se comportent à la fois comme des médiateurs intercellulaires et des hormones locales et elles jouent de nombreux rôles physiologiques et physiopathologiques dans les processus inflammatoires.

- L'acide Dihomo- γ -linoléinique donne naissance aux prostaglandines et thromboxanes de la série 1

- L'AA donne naissance aux prostaglandines et thromboxanes de la série 2

- L'EPA donne naissance aux prostaglandines et thromboxanes de la série 3

- Le DHA ne donne naissance à aucun eicosanoïde

3.5.2 Synthèse

L'acide arachidonique (AA) incorporé dans les phospholipides membranaires est libéré par l'action des phospholipases A₂. Une partie de cet acide gras est transformée en endoperoxyde sous l'action des COX. Il existe deux isoformes de COX : COX-1, constitutive, présente au niveau de l'estomac, du rein, des thrombocytes, et COX-2, enzyme inductible, présente au niveau des fibroblastes, des macrophages, des chondrocytes. Cette dernière est activée par l'IL-1, le TNF α et des substances mitogènes.

Un certain nombre de cancer sont liés à l'induction de la surexpression de la COX-2 (Tsuji et coll., 1997; Hwang et coll., 1998; Tucker et coll., 1999; Gupta et coll., 2000). Les fonctions mitogéniques et pro-inflammatoires de la COX-2 sont liées à une synthèse exagérée de PGE₂. Le taux de synthèse de PGE₂ est limité par le taux d'acide arachidonique présent dans les phospholipides membranaires. L'acide arachidonique est substitué par l'EPA ou le DHA dans les phospholipides membranaires lors d'un enrichissement de l'alimentation avec des acides gras n-3. Il en résulte une diminution de la concentration de prostaglandines de la série 2 et une augmentation de la synthèse des prostaglandines de la série 3 moins pro-inflammatoires que les PGE₂. Concernant la voie des lipoxygénases, l'oxydation de l'acide arachidonique par ces enzymes conduit surtout à la formation des hydroperoxyacides (HPETE ou hydroxyperoxyeicosatetraenoïque) et des leucotriènes. En fonction de l'atome de carbone sur lequel se fixe l'oxygène, on distingue une 5-lipoxygénase et une 12-lipoxygénase. La 5-lipoxygénase est présente dans diverses cellules, les neutrophiles, les éosinophiles, les monocytes et les macrophages. La 12-lipoxygénase est présente dans les plaquettes et la peau mais aussi dans certaines cellules tumorales. La 15-lipoxygénase est trouvée dans les plaquettes, les macrophages et les cellules épithéliales. Elle engendre, à partir de l'acide arachidonique, la synthèse de l'acide 15-hydroxyeicosatetraenoïque (15-HETE) (**Figure 16**) Le 15-HETE est un médiateur cellulaire anti-inflammatoire capable d'inhiber la formation des leucotriènes pro-inflammatoires via la 5-lipoxygénase. Il exerce également des effets immunosuppresseurs.

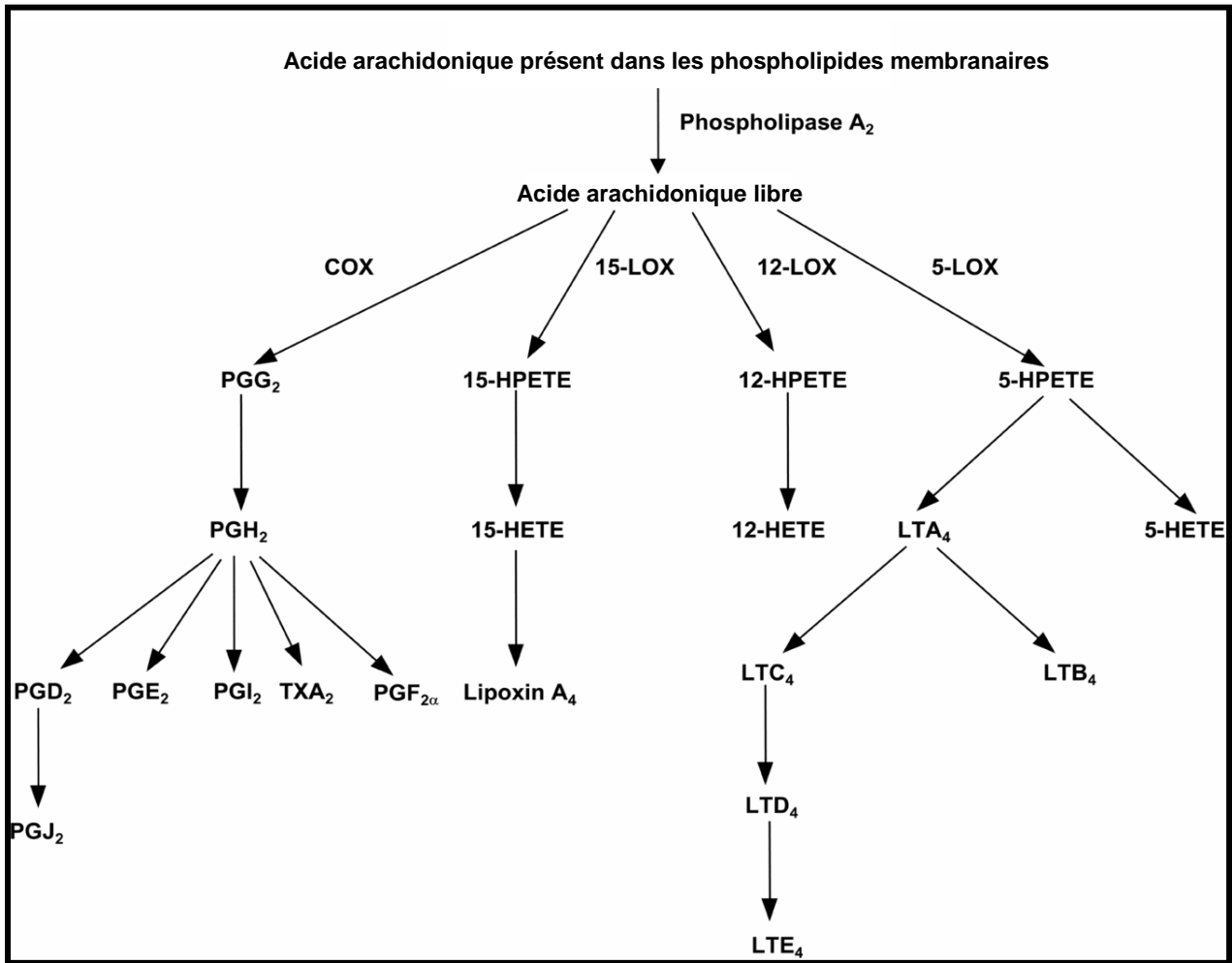


Figure 16: Eicosanoïdes issus du métabolisme de l'acide arachidonique. COX, cyclooxygénase ; HETE, acide hydroxyeicosatétraénoïque; HPETE, acide hydroxyperoxyeicosatétraénoïque ; LOX, lipoxygénase ; LT, leucotriène; PG, prostaglandine ; TX, thromboxane. D'après. (Tsuji et coll., 1997; Hwang et coll., 1998; Tucker et coll., 1999; Gupta et coll., 2000).

3.5.3 Effets des eicosanoïdes sur le métabolisme cellulaire

Les fonctions des cellules T, B et NK sont régulées par les eicosanoïdes (Goldyne et coll., 1984). Les eicosanoïdes les plus étudiées sont les prostaglandines (PG). Les PG sont impliquées dans les phénomènes inflammatoires et les réponses immunitaires. La production de PGE2 augmente lors d'une inflammation et lors d'infections. Selon certains auteurs, les lymphocytes T possèdent des récepteurs pour les PGE1 et les PGE2 (Goodwin et Ceuppens, 1983; Hwang, 1989).

Dans les cellules T, les PGE1 et PGE2 sont capables de supprimer la production d'IL-2 et, par conséquent, la prolifération cellulaire. Elles peuvent également inhiber la synthèse d'IL-1 et

de TNF par les macrophages. Par contre, les PGF ne possèdent pas de récepteurs à la surface des cellules T ; elles n'auraient, donc, aucun rôle dans la régulation des fonctions de ces cellules.

Les leucotriènes, LTB₄, induisent la production de l'IL-1 par les macrophages et la production d'interféron γ par les lymphocytes (Rola-Pleszczynski et coll., 1983). Selon certains auteurs, les LTB₄ chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde augmentent de 10 fois la concentration basale d'IL-1 (Kageyama et coll., 1994).

Par conséquent, les eicosanoïdes influent sur la production de cytokines. Ainsi, des changements au niveau de la composition des phospholipides des membranes plasmiques pourraient modifier le métabolisme cellulaire via la production d'eicosanoïdes.

3.5.4 Mécanismes immunosupresseurs des AGPI n-3

Il apparaît clairement que les AGPI n-3 exercent des effets immunosupresseurs et anti-inflammatoires. Cependant, les mécanismes d'action de ces molécules ne sont encore clairement élucidés. Par ailleurs, il est communément admis que la principale cible des AGPI est la membrane plasmique où ils s'incorporent dans les phospholipides, changeant ainsi la composition lipidique membranaire. Une fois incorporés, les AGPI pourraient agir directement ou indirectement sur le fonctionnement cellulaire. En effet, plusieurs hypothèses, concernant les mécanismes d'action par lesquels les AGPI n-3 exercent leurs effets immunomodulateurs, ont été proposés :

- augmentation de la fluidité membranaire ce qui favorise l'interaction des protéines membranaires et régule la transduction du signal ;
- diminution du taux d'acide arachidonique dans les phospholipides membranaires et de la production des eicosanoïdes de la famille n-6 (principalement issus de l'acide arachidonique) connue comme étant pro-inflammatoires ;
- augmentation des eicosanoïdes de la famille n-3 ;
- altération du statut oxydant puisque les AGPI sont sensibles à la peroxydation et la génération de radicaux libres ;
- modulation des voies de signalisation intracellulaire qui jouent un rôle clé dans l'activation cellulaire

- modulation de l'expression des gènes impliqués dans la production des cytokines.

Nous parlerons sommairement, dans cette partie, du mécanisme par lequel les AGPI exercent leurs effets immunosupresseurs sur le système immunitaire, sans entrer dans les détails des mécanismes de signalisation intracellulaire. En effet, ces acides gras commencent à être utilisés dans des essais cliniques comme adjuvants aux traitements anti-inflammatoires ou anti-rejet de greffe (Maachi et coll., 1995 ; Fortin et coll., 1995). Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent cet effet sont encore mal compris. Plusieurs étapes de la cascade de signalisation conduisant à la reconnaissance de l'antigène par son récepteur TCR à la réponse proliférative pourraient être affectées par les acides gras poly-insaturés. Une des étapes précoces de l'activation mitogénique est la mobilisation du calcium intracellulaire. Dans le lymphocyte T, ce processus est biphasique. L'interaction antigène/TCR induit tout d'abord la libération du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique et son efflux vers le milieu extracellulaire. Ce mouvement calcique active, en retour, des canaux calciques CRAC (Ca^{2+} released-activated Ca^{2+}) qui permettent l'entrée du calcium extracellulaire et la reconstitution des stocks intracellulaires. Plusieurs groupes ont montré que les acides gras poly-insaturés, et en particulier les acides gras n-3, stimulent la libération du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique, ce qui conduit à un épuisement des stocks intracellulaires (Chow et Jondan, 1990, Boni et Khan, 2000). En revanche, les résultats de la littérature concernant l'effet des acides gras sur l'influx de calcium sont contradictoires. Différents auteurs ont décrit une inhibition de la hausse de calcium induite par les mitogènes lorsque les lymphocytes sont incubés en présence d'acides gras poly-insaturés (Richieri et coll., 1990 ; Chow et coll., 1990 Breittmayeur et coll., 1993). Selon ces derniers auteurs, les acides gras stimuleraient l'expulsion du calcium vers le milieu extracellulaire en activant une Ca^{2+} ATP-ase. Par contre, les résultats de Bonin et Khan (2000) montrent que les n-3 facilitent l'ouverture des canaux CRAC et, part conséquent, l'entrée de calcium dans le lymphocyte. Chez les rats spontanément hypertendus (SHR) soumis à un régime supplémenté en acide gras n-3, le relargage du calcium induit par la thapsigargin dans les lymphocytes T est nettement diminué par rapport à ce qui est observé chez des rats SHR nourris avec un régime standard (Triboulot et coll., 2001). L'ensemble de ces résultats suggère que les acides gras n-3 sont capables de moduler la signalisation calcique du lymphocyte T.

3.5.4.1 Modulation de la signalisation lipidique par les AGPI

Les phospholipides membranaires sont fortement impliqués dans les mécanismes de transduction des signaux perçus à l'extérieur de la cellule.

3.5.4.1.1 Les phospholipases

Après leur estérification en position *sn*-2 par les acides gras polyinsaturés apportés par l'alimentation, les phospholipides membranaires peuvent être impliqués dans les mécanismes de la transduction des signaux perçus par les cellules. Une fois incorporés dans les phospholipides membranaires, ils peuvent être hydrolysés par l'action de diverses phospholipases. Ils sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons esters des phospholipides. Il existe plusieurs liaisons esters dans un phospholipide :

- entre chacun des acides gras et le glycérol
- entre le glycérol et le phosphate
- entre le phosphate et l'alcool (choline, éthanolamine, sérine, glycérol, inositol, ...)

Les phospholipases A1 (PLA1) conduisent à la libération de l'acide gras présent en position *sn*-1 du glycérol et la formation de lysophospholipide. Les phospholipases A2 (PLA2) conduisent à la libération de l'acide gras en position *sn*-2 du glycérol et la formation de lysophospholipide. Les phospholipases C (PLC) hydrolysent les phospholipides contenant un inositol en particulier le phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate (PIP₂) libérant ainsi deux seconds messagers qui sont les diacylglycérols (DAG) et l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃). Les phospholipases D (PLD) hydrolysent l'alcool de la fonction acide du phosphate, libérant ainsi un acide phosphatidique et un alcool (**Fig 17**). Selon l'action de chaque phospholipase, ils pourront influencer les voies de signalisation soit sous forme d'acides gras libres par l'intermédiaire de l'action de la PLA2, soit sous forme de DAG et d'IP₃ via l'action de la PLC et PLD.

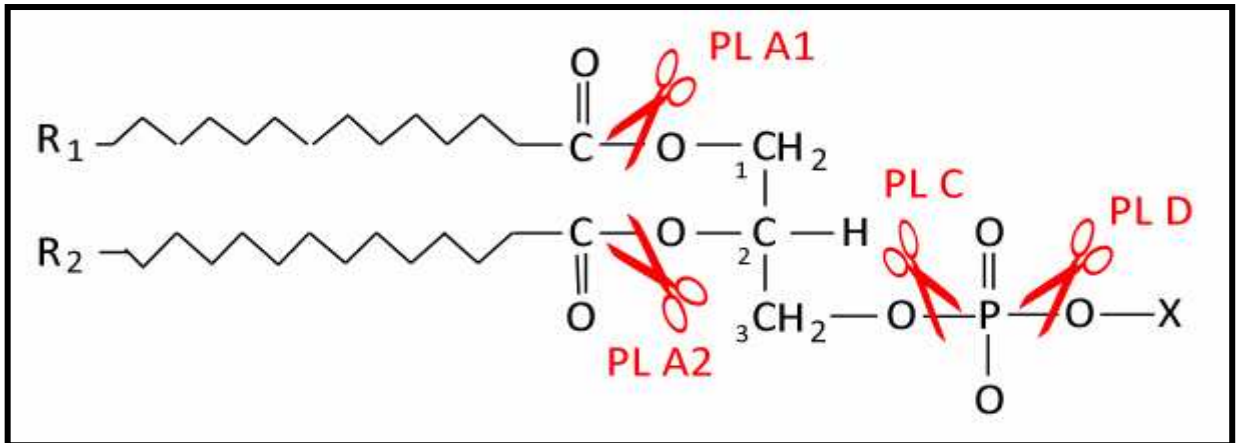


Figure 17 : Les différents sites d'action des phospholipases sur les phospholipides membranaires. D'après (Colley et coll., 1997 ; Kodaki et Yamashita, 1997 & Lopez et coll., 1998).

A- La phospholipase D

Selon leur sensibilité au PIP₂, on distingue deux grandes familles de PLD chez les mammifères. Certaines PLD ont besoin de la présence de PIP₂ pour être actives alors que d'autres fonctionnent en l'absence de ce lipide. On distingue donc les PLD PIP₂-sensibles et les PLD PIP₂-insensibles. Dans le groupe des PLD PIP₂-sensibles on cite deux classes :

- La PLD1, dont l'activation se fait grâce à des petites protéines G de la famille ARF (Factor d'ADP-ribosylation) et Rho, et par les protéines kinases C (PKC) (Hammond et coll., 1995).
- La PLD2 qui possède une activité basale forte *in vitro*, mais qui est peu ou pas stimulée par les protéines activatrices de la PLD1 (Colley et coll., 1997 ; Kodaki et Yamashita, 1997 & Lopez et coll., 1998).

Quant aux PLD PIP₂-insensibles ils ne sont pas activables par les protéines impliquées dans la stimulation des PLD1 et PLD2. Cependant les acides gras, comme l'acide oléique, les activent (Frohman et coll., 1999). Elles sont appelées PLD-oléate-dépendantes. Ces PLD ne sont pas toutes exprimées dans une seule cellule ; dans certaines cellules comme les cellules T on trouve les PLD2 et la PLD-oléate – dépendante (Kasai et coll., 1998). Dans les TRCs, aucune étude n'a révélé encore l'expression des PLD. Des études ont mis en évidence que la PLD2 est exprimée majoritairement au niveau de la membrane plasmique alors que la PLD1 est localisée au niveau des endosomes et des lysosomes (McDermott et coll., 2004). De plus,

de nombreuses études mettant en évidence que les PLD sont localisées au niveau des cavéoles, qui sont des domaines spécialisés au niveau de la membrane plasmique riche en cholestérol et en sphingolipides, appelés *lipid rafts* ou radeaux lipidiques (McMermott et coll., 2004). Des études très récentes ont montré que l'incorporation de l'acide docosahexaénoïque (DHA), dans les phospholipides membranaires des monocytes, était capable d'activer la PLD par un mécanisme protéine kinase C (PKC) dépendant qui implique l'activation de l'ARF (Diaz et coll., 2002). Il semblerait que l'activation de la PLD dans les lymphocytes T soit associée à des signaux antiprolifératifs et à l'apoptose (Kasai et coll., 1998 ; Diaz et coll., 2005).

B- Les phospholipases A2

Les phospholipases A2 sont une famille d'isoenzymes catalysant l'hydrolyse des acides gras en position sn-2 des phospholipides générant ainsi un lysophospholipide et un acide gras libre qui est en général l'acide arachidonique (Dennis, 1994). L'hydrolyse des phospholipides par les PLA2 est une étape clé de la régulation des phénomènes inflammatoires. Ainsi, la libération de l'AA dans les cellules permet sa métabolisation en eicosanoïdes (Serhan et coll., 1996). Ces enzymes sont classées en plusieurs groupes selon leur poids moléculaire, leur homologie, leur dépendance au calcium, de même que leur distribution cellulaire (Dennis, 1997). On distingue ainsi :

- les PLA2 cytosoliques (cPLA2) dont l'activité est dépendante du calcium (type IV)
- les PLA2 cytosoliques dont l'activité est indépendante du calcium (iPLA2 ou type VI)
- les PLA2 sécrétées (sPLA) dont deux types, les PLA2 pancréatiques de type IB et V, et les PLA2 inflammatoires de IIB.

Il a été mis en évidence que les AGPI peuvent inhiber l'activité et la sécrétion des PLA2 (Franson et coll., 1990 ; Shikano et coll., 1994 ; Alaoui El Azher et coll., 2000). Ces acides gras empêcheraient la libération des AGPI situés en position sn-2 des phospholipides membranaires, en particulier la libération de l'AA. Les études mettent également en évidence que les acides gras sont capables de réguler le système enzymatique impliqué dans leur libération à partir des phospholipides. Ils peuvent également exercer un rétrocontrôle négatif sur leur propre libération (Kambe et coll., 1999 ; Alaoui El Azher et coll., 2000 ; Sergeeva et

coll., 2002). Cependant, les effets des acides gras sur l'activité des PLA2 varient en fonction des stimuli et du type cellulaire.

Outre leur rôle dans l'hydrolyse des phospholipides, il a été mis en évidence que les PLA2 sont impliquées dans la transition au travers de la phase G2/M du cycle cellulaire des cellules T (Roshak et coll., 2000). Au laboratoire, il a été mis en évidence que les lymphocytes T Jurkat expriment les sPLA2 (type IB et V) de même que la cPLA2 Ca²⁺-dépendante de type IV et la iPLA2 (type VI) (Tessier et coll., 2002). De plus, il a été montré que, lors d'un apport exogène en AGPI n-3 (EPA ou DHA), ceux-ci se substituent à l'AA en position sn-2 des phospholipides et s'incorporent préférentiellement suivant l'ordre phosphatidylsérine (PC)> phosphatidyléthanolamine (PE)> phosphatidylinositol (PI)/phosphatidylsérine (PS) (Denys et coll., 2005). Les PLA2 présentent également une spécificité vis-à-vis de la nature de l'acide gras présent en position sn-2 des phospholipides. En effet, l'EPA est libéré par l'action de la iPLA2 alors que le DHA est préférentiellement libéré par cPLA2 (Dennis, 1994 ; Denys et coll., 2005).

C- Les phospholipases C

Les phospholipases C phosphoinositides-spécifiques (PI-PLC) sont des protéines qui clivent les têtes polaires des phospholipides à domaines inositol. Chez les mammifères, 4 sous-types ont été identifiés : 4 isoformes PLC β , 4 isoformes δ , 2 isoformes γ et une isoforme ϵ (Rhee, 2001). Nous ne parlerons ici que des phospholipases C γ car elles sont spécifiquement impliquées dans la transduction des signaux issus de l'activation des récepteurs à tyrosine kinase, tels que les récepteurs des cellules T (Kamat et Carpenter, 1997). Les effets des acides gras, sur l'activité de l'enzyme ont bien été documentés (Irvine et coll., 1979 ; Siess et Lapetina, 1988 ; Casabiell et coll., 1991). Irvine et coll (1979) ont observé que l'ajout d'acide oléique ou d'AA, dans des fractions microsomales de rat, augmente l'hydrolyse des phosphoinositols. L'action de l'AA ne s'effectue pas de manière directe mais plutôt par le biais de ses métabolites. Ceci a été mis en évidence en bloquant l'activité de la PLC par un inhibiteur de la cyclooxygénase, l'indométhacine (Siess et Lapetina, 1988). Plus récemment, Husain et Jafri (2002) ont montré que la prostaglandine F2 (PDF2) active la PLC γ 1 par phosphorylation de la protéine sur des résidus tyrosyls. Les expériences de Sanderson et Calder (1998), menées chez des rats soumis à un régime enrichi en huile de poisson, ont mis en évidence que, dans les lymphocytes isolés de ces rats au régime, les taux de PLC γ 1 n'étaient pas significativement altérés, en revanche, ils ont constaté que, suite à une stimulation des lymphocytes, le niveau de phosphorylation de l'enzyme ainsi que d'autres

protéines associées étaient significativement diminués. Dans certaines situations, l'activation de la PLC γ ne requiert pas la phosphorylation des résidus tyrosyls. Il a été mis en évidence que l'acide phosphatidique (AP) est capable d'activer de la même façon que la PLC γ phosphorylée ou non les résidus tyrosyls et ce en augmentant l'affinité de l'enzyme pour son substrat (Jones et Carpenter, 1993 ; Zhou et coll., 1999). Etant donné que l'AP contenant les AGPI est issu de l'hydrolyse de la phosphatidylcholine par la PLD, l'activation de cette dernière dans les cellules peut conduire à l'activation de la PLC γ .

Des AGPI comme l'AA sont capables d'activer la PLC γ , indépendamment de la phosphorylation sur des résidus tyrosyls, en présence d'une protéine majoritairement exprimée dans les neurones (Hwang et coll., 1996). Cependant, l'interaction entre l'AA et la PLC peut être retrouvée dans des cellules non neuronales. En effet, une protéine similaire à la protéine tau, AHNAK, est exprimée dans différents types cellulaires et il a été mis en évidence une action combinée de l'AA avec AHNAK dans l'activation de la PLC (Shtivelman et coll., 1992 ; Sekiya et coll., 1999).

3.5.4.1.2 Les diacylglycérols

Les différences de structure du PIP2 clivé en réponse à l'activation de la PLC sont à l'origine des différentes formes de DAG produits. L'action de la PLC est de cliver spécifiquement la liaison entre le groupement phosphate de l'inositol et la chaîne carbonnée du glycérol au sein du PIP2. Ce clivage conduit à la production d'une forme préférentielle, appelée *sn*-1,2-diacylglycérol. Cependant, les acides gras retrouvés sur la position 1 et 2 peuvent être très différents les uns des autres. Notamment le caractère polyinsaturé, diinsaturé, monoinsaturé ou saturé leur confère des propriétés distinctes. On trouve plusieurs formes structurellement différentes de *sn*-1,2-diacylglycérol (Pettitt et Wakelam, 1993). La production de DAG est biphasique. La première phase de la production est rapide de l'ordre de quelques secondes à 5 min, transitoire et correspond à l'hydrolyse du PIP2 par la PLC. Cette première génération de DAG via l'action de la PLC contient des acides gras spécifiques, en particulier 18:0 / 20:4 n-6, 18:0 / 20:5 n-3 et 18:0 / 20:3 n-9 (Pettitt et Wakelam, 1993). Au contraire, le DAG produit au cours des temps plus tardifs de stimulation, à partir de 15 min, correspond à un second mécanisme, l'hydrolyse de la phosphatidylcholine (PC) par la PLD, ce qui produit des phosphatidates déphosphorylés par la suite en DAG par la phosphatidate phosphohydrolase (PAP) (Nishizuka, 1992). Les formes des DAG produites par ce mécanisme dans ces temps tardifs ont une distinction remarquable avec ceux décrits

précédemment, les chaînes d'acides gras qui les composent sont principalement saturées ou monoinsaturées. Les DAG issus de l'hydrolyse du PIP₂ permettent l'activation des PKC (**figure 18**). Ces protéines, par rétrocontrôle positif, vont activer à leur tour la PLD, cette dernière va assurer une production de DAG suffisante pour entretenir l'activité des PKC. Des études faites sur les PKC, cibles privilégiées des DAG, ont montré que toutes les formes des DAG ne sont pas capables d'activer les PKC (Marignani et coll., 1996).

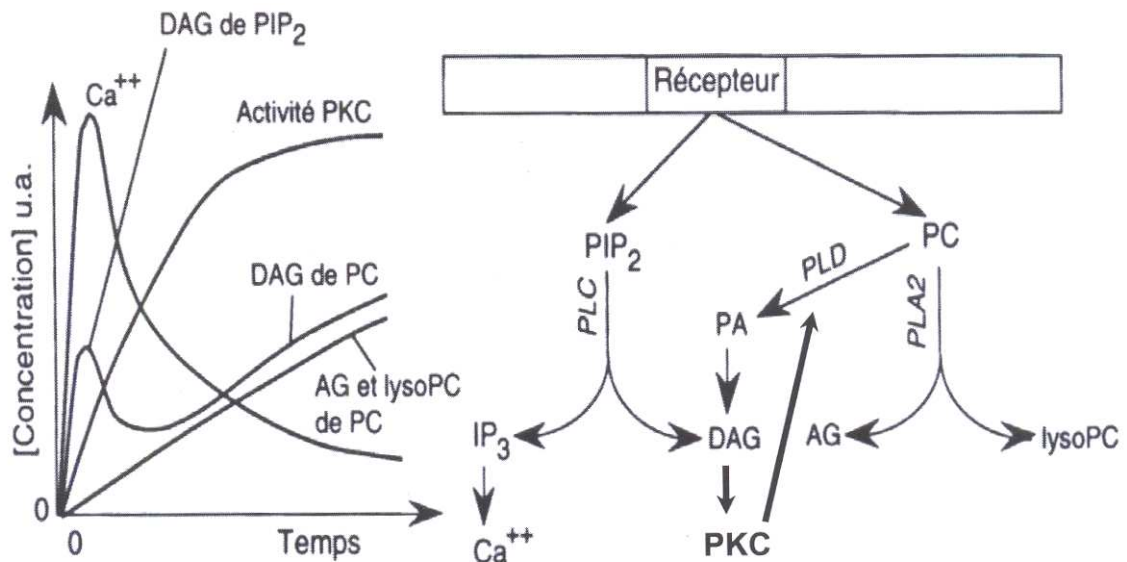


Figure 18 : Cinétique de production des DAG suite à l'activation des PLC et PLD.
D'après (Pettitt et Wakelam, 1993).

3.5.4.1.3 AGPI n-3 et pH intracellulaire

Civelek et ses collaborateurs (1996) ont étudié les effets des acides gras libres (AGL) sur le pH intracellulaire des adipocytes. Ils ont mis en évidence que les variations de pH_i dans les adipocytes coïncident avec le transport des AGL à travers la membrane plasmique. De plus, l'exposition des cellules à des agents lipolytiques ou à des acides gras libres exogènes, provoque une acidification rapide du milieu intracellulaire. Le métabolisme des acides gras ou leur déplacement de la membrane plasmique, par ajout de sérum albumine bovine (SAB), n'induit pas d'acidification du milieu intracellulaire, mais une alcalinisation de celui-ci. L'insuline, induisant la lipogenèse, provoque une alcalinisation intracellulaire. Ainsi, l'hydrolyse des triglycérides entraîne une diminution du pH_i, cependant leur synthèse, induite par l'insuline, conduit à une augmentation du pH_i. Astashkin et coll. (1993) avaient démontré

que l'AA inhibait la prolifération des lymphocytes T humains, induite par des mitogènes tels que la concanavaline A. Ils ont mis en évidence que l'effet anti-prolifératif de l'AA était dû à l'inhibition du NHE et à la modulation de la $[Ca^{2+}]_i$. L'effet de l'AA, apporté de façon exogène, sur la modification du pHi, a été également étudié par Cavallini et coll. (1996) dans les plaquettes sanguines.

3.5.4.1.4 Autres mécanismes

Depuis quelques années, il a été suggéré qu'un des mécanismes par lesquels les AGPI de la famille n-3 pourraient agir, serait via la modulation des radeaux lipidiques. Comme nous l'avons mentionné précédemment, les lipids rafts sont des domaines particuliers de la membrane plasmique, riches en cholestérol et en sphingolipides impliqués dans la signalisation des cellules immunitaires (Alonso et Millan, 2001). De nombreuses études ont mis en évidence, que les tyrosines kinases de la famille Src, ainsi que la protéine transmembranaire LAT (Linker for Activated T cell), sont hautement localisées au niveau des rafts lymphocytaires par une palmitoylation post-transductionnelle de ces protéines (Rodgers et coll., 1994 ; Zhang et coll., 1998). Stulnig et coll. (1998) ont mis en évidence que l'enrichissement en AGPI des membranes des lymphocytes Jurkat, conduit à un déplacement en dehors des rafts des tyrosines kinases Src, Lck et Fyn et, par conséquent, inhibe la signalisation en aval. Par la suite, il a été démontré que l'EPA inhibe l'activation cellulaire T en déplaçant les protéines acylées des rafts, qui sont impliquées dans la transduction du signal (Stulnig et coll. 2001). Plus récemment, Li et coll. (2005) ont démontré que le DHA altère la composition des rafts lymphocytaires et inhibe la signalisation de STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), en déplaçant partiellement des rafts les récepteurs à l'IL-2. Webb et coll. (2000) ont également mis en évidence que l'AA et l'EPA, inhibent la palmitoylation de Fyn et, par conséquent, la localisation de cette protéine au niveau des rafts. Par ailleurs, une étude nutritionnelle chez la souris, met en évidence qu'un régime alimentaire, supplémenté en huile de poisson, entraîne des modifications de la composition des rafts (Fan et coll., 2003).

Chapitre 4.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) et Acides gras poly-insaturés

Les PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*) suscitent un intérêt considérable depuis 1990 où ils ont été identifiés. Nos connaissances sur leurs rôles physiologiques ne cessent d'évoluer. Impliqués dans la régulation du métabolisme des lipides et des lipoprotéines, l'homéostasie du glucose, la prolifération cellulaire et la différenciation, les PPARs sont une cible pharmacologique pour le traitement de désordres métaboliques tels que les hyperlipidémies ou le diabète. Ils ont été récemment impliqués dans la réponse inflammatoire (Chinetti *et coll.*, 2000).

Dans ce chapitre, nous allons décrire, dans un premier temps les mécanismes moléculaires d'action des PPARs, leurs rôles physiologiques. Dans un second temps, nous mettrons un accent particulier sur PPAR α en évoquant son possible implication dans le rôle anti-inflammatoire.

4.1 Mécanismes moléculaires d'action des PPARs

4.1.1 Régulation de la transcription

Les PPARs, quand ils sont inactifs, sont probablement sous forme de complexes avec des protéines co-répresseurs et peuvent, dans certains types cellulaires, avoir une localisation plutôt cytoplasmique que nucléaire (Chinetti *et coll.*, 1998). En réponse à leur liaison avec un ligand, les PPARs se dissocient de leurs co-répresseurs et recrutent alors des protéines accessoires jouant le rôle de co-activateurs. La capacité des PPARs de recruter des co-facteurs et d'activer la transcription peut être modifiée par la phosphorylation de leur région amino-terminale. Les PPARs, après avoir formé des hétérodimères avec un autre récepteur nucléaire, le récepteur de l'acide 9-cis-rétinoïque (RXR : Retinoid X Receptor), reconnaissent les séquences spécifiques, les PPRE (PPAR response element) situées dans les régions promotrices des gènes cibles dont l'expression est alors stimulée (Chinetti *et coll.*, 2000) (**Figure 19**). Les PPRE sont constitués de deux répétitions directes de la séquence

hexamétrique AGGTCA, séparées par deux nucléotides. Ce processus de liaison des récepteurs aux PPRE correspond à la << trans-activation >>.

Les PPARs peuvent aussi réprimer la transcription de certains gènes interférant négativement avec des voies de signalisation de NF- κ B, STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) et AP-1 (*Activating Protein 1*). C'est ce que l'on appelle alors la << trans-répression >>. Les mécanismes impliqués regroupent entre autres des interactions protéine/protéine et la formation de complexes inactifs, la liaison aux cofacteurs de ces voies de signalisation qui deviennent alors inefficaces, ou l'induction d'I κ B α , inhibiteur majeur de la voie de signalisation NF- κ B. On pense actuellement que cette trans-répression pourrait être le mécanisme de base des propriétés anti-inflammatoires des PPARs (Delerive et coll., 2000).

4.1.2 Distribution tissulaire des PPARs

La distribution tissulaire et le niveau d'expression diffèrent selon l'isoforme considérée (Braissant et coll., 1996). PPAR α est exprimé principalement dans les tissus où le métabolisme des acides gras est important, tels que le foie, les reins, le cœur et les muscles. PPAR γ est exprimé de façon préférentielle dans le tissu adipeux et l'intestin, mais on le détecte aussi dans les glandes mammaires et dans de nombreux tissus. Les deux isoformes α et γ sont également exprimées dans les cellules de la paroi vasculaire : cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et monocytes/macrophages (Chinetti et coll., 1998). Alors que PPAR α , est exprimé aussi bien dans les monocytes que dans les macrophages, l'expression de PPAR γ est surtout mise en évidence dans les macrophages (Chinetti et coll., 1998). De plus, PPAR α et PPAR γ sont tous deux présents dans la plaque d'athérosclérose, au niveau de la région sous-endothéliale et dans le noyau lipidique des lésions athérosclérotiques où ils sont co-localisés avec des marqueurs spécifiques des macrophages, des cellules musculaires lisses et des cellules spumeuses (Ricote et coll., 1998 ; Chinetti et coll., 2000). Enfin l'expression tissulaire de PPAR β est ubiquitaire.

4.1.3 Ligands naturels et synthétiques des PPARs

Un large spectre de composés a été identifié comme ligands des PPARs (Kersten et coll., 2000). Les trois isotypes PPAR ont des ligands communs, tels que les acides gras poly-insaturés à longue chaîne, qui lient cependant PPAR α avec une plus grande affinité. Les eicosanoïdes 8(S) HETE et LTB $_4$ sont également des ligands de PPAR α , ainsi que les fibrates

utilisés en clinique comme molécules hypolipidémiantes. La 15-désoxy D-prostaglandine J2 est également un ligand naturel de PPAR γ . Quant aux principaux ligands synthétiques des PPARs, leurs noms sont bien connus en thérapeutique. Il s'agit, pour PPAR α , des fibrates, médicaments utilisés dans le traitement de l'hypertriglycéridémie et de l'hyperlipidémie ; et, pour PPAR γ des glitazones qui sont utilisés dans le traitement du diabète de type 2. (**Figure 19**) (Willson et Wahli, 1997).

D'autres agonistes naturels de PPAR α et PPAR γ sont dérivés de l'acide arachidonique par les voies de la cycloxygénase et de la lipoxygénase. On peut noter en particulier le leucotriène B4 (LTB4) et la 15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J2

Enfin, d'autres principes actifs comme des anti-inflammatoires non stéroïdes pourraient aussi être des agonistes des PPARs.

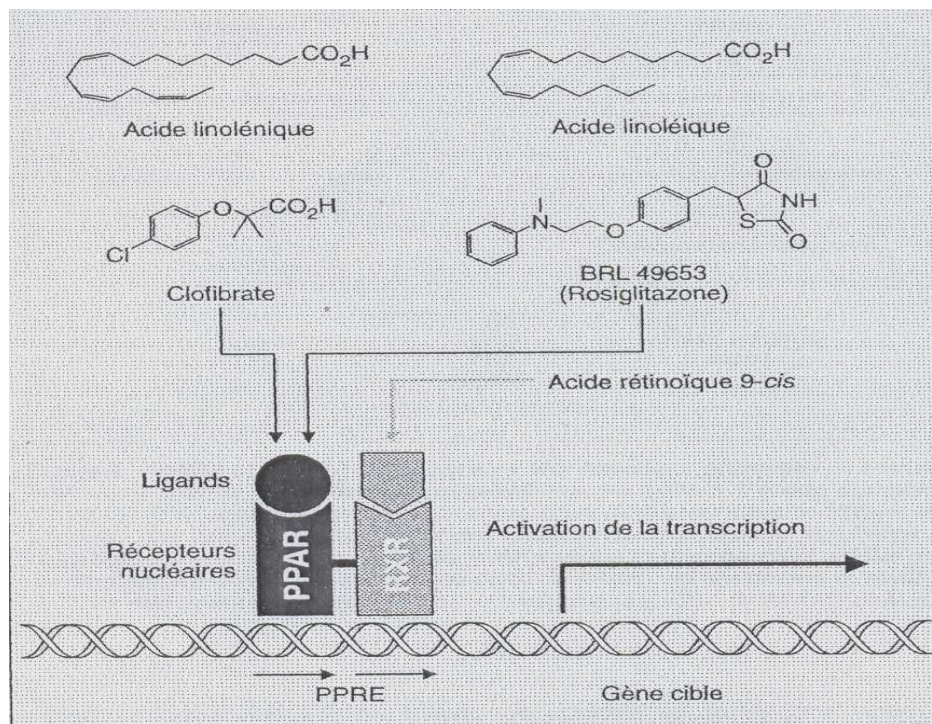


Figure 19 : Les PPAR: récepteurs nucléaires activés par un ligand. Les PPAR sont des facteurs de transcription dont l'activité dépend de l'interaction avec un ligand. Parmi ces derniers, les acides gras, tels que l'acide linoléique ou l'acide linoléique, lient les trois PPAR, avec cependant une préférence pour PPAR α . Le clofibrate est un ligand de PPAR α utilisé pour ses propriétés hypolipidémiantes. La rosiglitazone, ou BRL, appartient à la famille des thiazolidinediones, antidiabétiques ligands de PPAR γ . Après leur liaison avec un ligand, les PPAR, sous forme d'hétérodimères avec leur partenaire RXR, interagissent avec des séquences spécifiques appelées PPRE (PPAR response element) présent dans le promoteur de leurs gènes cibles, et activent alors la transcription de ces gènes. L'acide rétinoïque 9-cis est le ligand de RXR, qui peut également participer à l'activation du complexe PPAR-RXR. D'après (Mickalik et coll., 2002).

4.2 Rôles physiologiques des PPAR

Le rôle de l'hypercholestérolémie, et des dyslipidémies en général, est maintenant reconnu comme majeur dans le développement des maladies métaboliques. L'étude des effets des agonistes des PPARs a permis de montrer qu'ils procurent un bénéfice global sur le métabolisme général des lipoprotéines en contrôlant leurs concentrations plasmatiques et leur composition.

Si les fonctions biologiques de PPAR β dans le contrôle de la balance énergétique sont encore peu connues à l'heure actuelle, de nombreuses observations permettent de souligner les rôles opposés et complémentaires de PPAR α et PPAR γ dans la régulation du métabolisme lipidique (Figure 20).

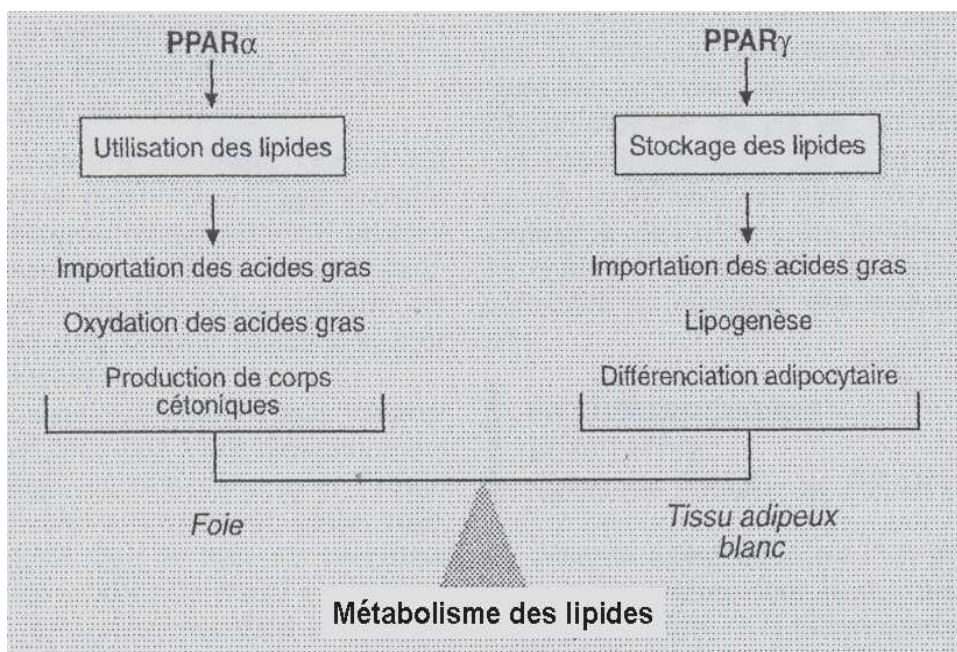


Figure 20 : PPAR α et PPAR γ : deux acteurs aux fonctions opposées et complémentaires dans la régulation du métabolisme des lipides. L'étude des gènes cibles de PPAR α et PPAR γ donne une vue d'ensemble de leurs fonctions respectives. Ces deux récepteurs sont des facteurs essentiels de la régulation du métabolisme lipidique. L'activité de PPAR α vise à l'utilisation des acides gras comme source d'énergie, tandis que celle de PPAR γ est destinée à la mise en réserve des lipides sous forme de triglycérides. Le rôle de PPAR β demeure obscur. D'après Mickalik et coll., 2002).

4.2.1 PPAR α

Il contrôle un ensemble de gènes impliqués dans diverses étapes du catabolisme des lipides, telles que le transport des acides gras à travers les membranes, leur transport intracytoplasmique, et leur oxydation microsomale, peroxisomale et mitochondriale (Desvergne et Wahli, 1999). Les activateurs de PPAR α , les fibrates, diminuent les concentrations circulantes de triglycérides et augmentent celles du cholestérol-HDL (Staels et coll., 1998). La réduction du taux de triglycérides est due à une diminution de la synthèse hépatique des lipoprotéines de très basse densité riches en triglycérides (VLDL), et une augmentation de la lipolyse intra-vasculaire de ces lipoprotéines. Les fibrates stimulent en effet l'entrée des acides gras dans les mitochondries et leur β -oxydation, ce qui diminue les quantités d'acides gras libres disponibles pour la synthèse hépatique des triglycérides des VLDL, et donc la sécrétion hépatique des triglycérides-VLDL. De plus, les fibrates augmentent l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme responsable de l'hydrolyse des triglycérides, par deux mécanismes : la stimulation de l'expression du gène qui code pour cette enzyme, et la diminution de la synthèse de l'apolipoprotéine CIII (apoCIII), inhibiteur naturel de la LPL. Enfin, c'est grâce, en partie, à leur capacité à augmenter la synthèse des apo (apolipoprotéin)-AI et apoAII, que les fibrates augmentent les concentrations plasmatiques de cholestérol-HDL. L'effet des ligands de PPAR α sur le métabolisme des LDL est en revanche plus modeste. On observe seulement, chez certains patients traités par les fibrates, une diminution du cholestérol-LDL. Cependant les LDL, qui acquièrent moins de triglycérides des VLDL, subissent une action limitée de la lipase hépatique, et leur taille diminue peu. Le nombre de LDL de petites tailles diminue donc au profit des LDL de grande taille, au moins athérogènes.

4.2.2 PPAR γ

A l'inverse de PPAR α , PPAR γ contrôle positivement des gènes impliqués dans la lipogenèse et fait partie intégrante du processus de différenciation adipocytaire (Rosen et coll., 1999). Lorsque la quantité moyenne d'énergie absorbée est supérieure à la quantité moyenne d'énergie consommée, l'excédent est mis en réserve dans le tissu adipeux blanc (triglycérides) et le foie (glycogène). L'excès de stockage sous forme de lipides dans le tissu adipeux blanc, caractéristique de l'obésité, fait intervenir à la fois une augmentation de la taille (hypertrophie) et du nombre (hyperplasie) des adipocytes. PPAR γ est un élément-clé dans ce processus, qui régit à la fois la différenciation du tissu adipeux blanc et la lipogenèse.

Deux observations ont initialement suggéré le rôle de PPAR γ dans la différenciation des adipocytes : la première est l'expression élevée de ce récepteur dans le tissu adipeux blanc, et la deuxième est l'augmentation de l'expression de PPAR γ dans des lignées cellulaires pré-adipocytaires, qui précède celle de marqueur de différenciation adipocytaires (Tontonoz et coll., 1994).

4.2.3 PPAR β

Est apparu comme un acteur potentiel de la cascade de différenciation adipocytaire (Bastie et coll., 1999). Les fonctions de PPAR β sont encore mal connues. Cependant, ce récepteur est exprimé en quantité significative dans le tissu adipeux blanc, et son expression augmente au cours des étapes initiales de la différenciation de pré-adipocytes en culture (Amri et coll., 1995). Son expression ectopique dans une lignée de fibroblastes murins suggère que PPAR β pourrait être un acteur précoce du processus de différenciation adipocytaire. Dans ce modèle, la différenciation des cellules en adipocytes n'est obtenue que si des activateurs de PPAR β et PPAR γ sont présents. L'activation de PPAR β par des acides gras à longue chaîne conduit à une augmentation de l'expression de PPAR γ , dont l'activité serait alors nécessaire à la différenciation finale de ces fibroblastes en adipocytes (Bastie et coll., 1999). Il est dès lors tentant de penser que PPAR β pourrait être impliqué dans l'augmentation du nombre de cellules adipeuses observée sous l'effet d'un régime riche en graisses. Chez la souris, l'ablation de deux allèles du gène codant pour PPAR β semble induire une légère diminution de la masse adipeuse, PPAR β pourrait donc jouer un rôle dans le développement du tissu adipeux blanc *in vivo*, sans toutefois être indispensable (Peters et coll., 2000).

4.3 PPARs et inflammation

Le rôle anti-inflammatoire de PPAR α avait été suggéré par Devchand et coll., (1996). Ils ont montré que le LTB₄ (leucotriène B₄), un eicosanoïde pro-inflammatoire, était un ligand de PPAR α impliqué dans la régulation de la dégradation oxydative des acides gras et de leurs dérivés, dont le LTB₄ lui-même. L'effet pro-inflammatoire du LTB₄ est donc contrecarré par la stimulation de sa propre dégradation par la voie de PPAR α . On sait maintenant que les agonistes de PPAR α diminuent la transcription de nombreux gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, et réduisent *in vivo* la concentration de certaines cytokines inflammatoires.

L'effet des ligands de PPAR γ sur l'inflammation est plus nuancé : des études ont montré que les ligands de PPAR γ inhibent la production par les monocytes/macrophages de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α , IL-1 β , IL-6 (Jiang et coll., 1998) et IL-12 (Chung et coll., 2000), alors qu'une autre équipe a montré que des ligands synthétiques spécifiques de PPAR γ n'avaient aucun effet sur la production de TNF α et IL-6 (Thieringer et coll., 2000). Une autre étude a suggéré que les effets anti-inflammatoires de certains ligands synthétiques seraient également indépendants de PPAR γ (Chawla et coll., 2001). Ces derniers résultats sont cependant à nuancer, les auteurs ayant utilisé des concentrations supra-pharmacologiques connues pour induire l'apoptose des macrophages (Chinetti et coll., 1998). Les ligands de PPARs diminuent la production de monoxyde d'azote (NO), un puissant vasorelaxant, par inhibition de la transcription d'une enzyme impliquée dans sa synthèse, la NO synthéase inductible (Ricote et coll., 1998 ; Colville-Nash et coll., 1998). Il semblerait que le mécanisme général d'action anti-inflammatoire des ligands des PPARs soit la trans-répression sur des voies NF-kB, STAT et AP-1 (Ricote et coll., 1998 ; Chung et coll., 2000 ; Delerive et coll., 2001).

Le rôle des PPARs ne peut donc plus être réduit à leur effet sur le métabolisme lipidique. Par des stimuli endogènes et pharmacologiques, ils modulent aussi la réponse inflammatoire et sont impliqués dans d'autres maladies chroniques telles que le diabète, l'obésité ou le cancer.

4.4 Hypothèse d'implication de PPAR α dans l'action des cellules T

Nous avons constaté que PPAR α intervient dans le catabolisme des acides gras. Par ailleurs, des études récentes ont montré que les activateurs de PPAR α peuvent jouer sur la régulation des réponses inflammatoires en inhibant la production de l'IL-2 et la prolifération des lymphocytes T (Marx et coll., 2002) (**Figure 21**). Etant donné que le diabète et l'obésité sont des pathologies associées à une perturbation du métabolisme lipidique et caractérisées par un état inflammatoire marqué par l'activation des cellules T, nous avons voulu savoir si ce récepteur PPAR α serait impliqué dans l'induction de la différenciation des cellules T, chez des souris.

Ainsi sera l'hypothèse de l'étude dont les résultats ont été publiés. (Article 2).

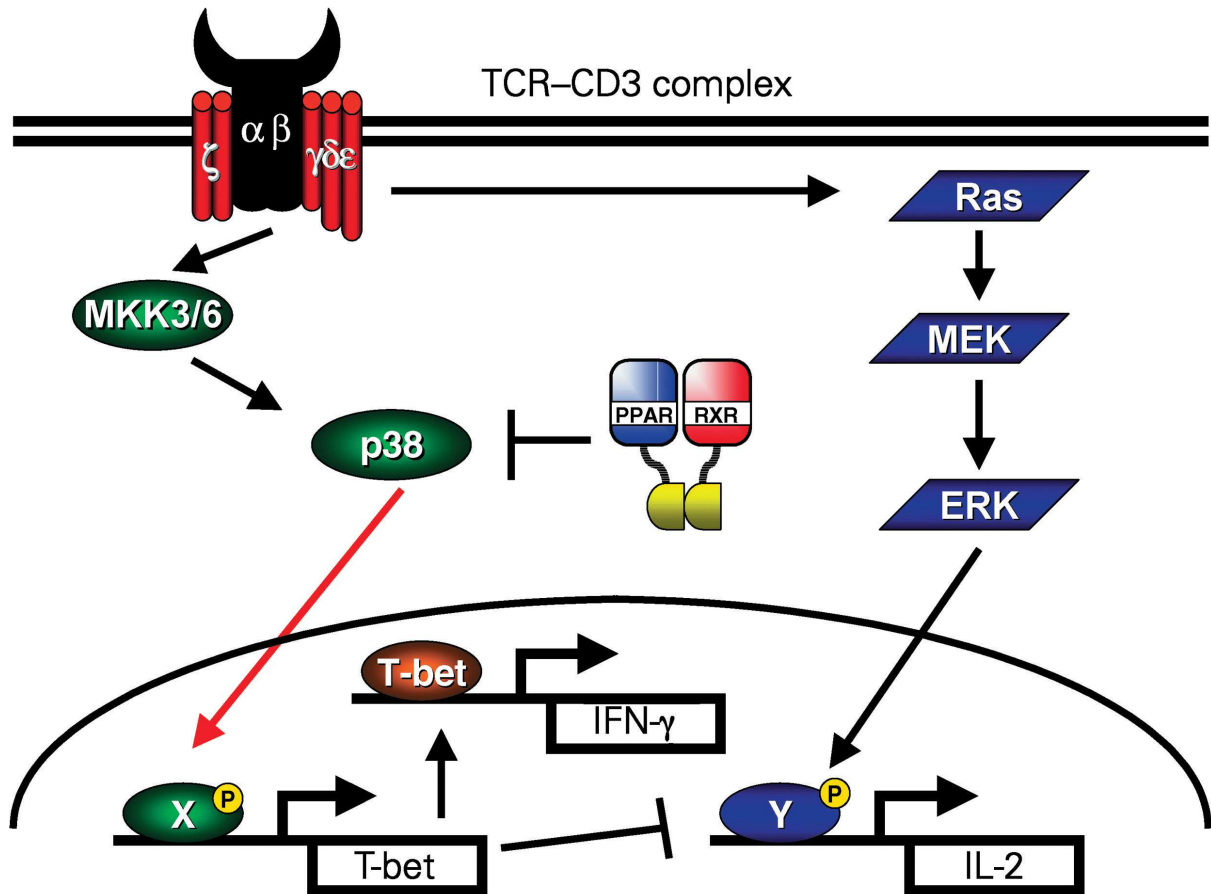


Fig 21 : Modèle indiquant la suppression de T-box expressed in T-cells (T-bet) médiée par peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR- α). La capacité de PPAR α à altérer l'induction cinétique de la transcription de T-bet pourrait être due à ce récepteur d'hormone nucléaire qui a la capacité de transitoirement de supprimer le phosphorylation de p38 MAP kinase après l'activation de la cellule T. TCR, T-cell receptor; MKK, MAP kinase kinase; p38, MAP kinase ; X, Y, facteurs de transcription inconnus X et Y respectivement; IFN- γ , interféron γ ; RXR, 9-cis-retinoic acid receptor; Ras, monomeric guanine nucleotide protein codée par le ras proto-oncogène; MEK, MAP kinase kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; IL-2, interleukin 2. D'après (Szabo et al., 2000).

En résumé de cette première partie, nous pouvons dire que le diabète et l'obésité sont des pathologies associées à une perturbation du métabolisme lipidique et caractérisées par un état inflammatoire marqué par l'activation des cellules T. Le rôle des PPARs ne peut donc plus être réduit à leur effet sur le métabolisme lipidique. Par des stimuli endogènes et pharmacologiques, ils modulent aussi la réponse inflammatoire et sont impliqués dans d'autres maladies chroniques telles que le diabète, l'obésité ou le cancer.

1. *Nous avons constaté d'une part que le récepteur PPAR α est un régulateur positif du catabolisme des lipides et des acides gras. Il intervient également dans la différenciation des cellules Th0 en Th1 et Th2. Le diabète et l'obésité étant deux pathologies impliquant l'activation des cellules T, nous avons investigué l'implication du récepteur PPAR α dans*

l'inflammation des tissus adipeux et donc la différenciation des cellules T, chez des souris WT et PPAR α -null. Les résultats de cette investigation sont publiés dans l'article n°1.

2. Par ailleurs, nous avons constaté, dans cette première partie, que:

Le DHA modulent l'activité des cellules immunocompétentes. L'étude publiée dans l'article n°2 rapporte les résultats de l'effet du DHA sur la différenciation des cellules T naïves (Th0) en cellules productrices de cytokines Th1 et Th2. Comme nous l'avons vu, le DHA est le produit final de la biosynthèse des AGPI de la série n-3 et est biologiquement plus stable. Le DHA est capable d'interférer avec les voies de signalisation intracellulaires. Les expériences ont été effectuées sur les lymphocytes isolés des souris PPAR α et PPAR α -null. Ainsi, nous avons évalué, dans l'article n° 2, l'effet du DHA sur l'activation des MAP kinases : ERK1/ERK2 ; p38 MAP kinase et la JNK/1/2/3 kinase induites par l'anti CD3 et l'anti CD28.



PARTIE II



Apports personnels



— Liste des publications & Communications —

Publications:

1. Akadiri Yessoufou, Jean-Marc Atègbo, Eugène Attakpa, Aziz Hichami, Kabirou Moutairou, Karim L. Dramane, Naim A. Khan. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α gene modulates insulin transcriptional factors and inflammation in adipose tissues.

Mol. Cell. Biochem 323 (2009): 101-111.

2. Eugène Attakpa, Aziz Hichami, Anne Marie Simonin, Esther Garcia Sanson, Karim L. Dramane, Naim Akhtar Khan. Docosahexaenoic acid modulates the expression of T-bet and GATA-3 transcription factors, independently of PPAR α , through suppression of MAP kinase activation.

Biochimie 91 (2009) : 1359-1365.

Communications:

1. Docosahexaenoic acid (DHA) modulates the differentiation of T-cells independently of PPAR- α gene activation in the mouse. Eugène Attakpa, A Hichami, KL Dramane, NA Khan. **Communication affichée au congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique du 09 au 11 Avril 2008 (Clermont-Ferrand, France).**
2. Docosahexaenoic acid modulates the expression of T-bet and GATA-3 transcription factors, independently of PPAR α , through suppression of MAP kinase activation. Eugène Attakpa, Aziz Hichami, Anne Marie Simonin, Esther Garcia Sanson, Karim L. Dramane, Naim Akhtar Khan. **Communication affichée au congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique du 23 au 25 Mars 2010 (Bordeaux, France).**

Publication n°1

Publication n°1

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α gene modulates insulin transcriptional factors and inflammation in adipose tissues in mice

Abbreviated title: PPAR α modulate transcription and inflammation

Authors:

Akadiri Yessoufou, Jean-Marc Atègbo, **Eugène Attakpa**, Aziz Hichami, Kabirou Moutairou, Karim L. Dramane, Khan NA.

Mol. Cell. Biochem 323 (2009): 101-111.

Objectif de l'étude

Le but de cette étude a été d'évaluer l'implication de l'absence de PPAR α dans la modulation de la transcription des gènes de l'insuline et l'inflammation des adipocytes chez les souris adultes C57BL/6J normales (WT) et les souris PPAR α -null.

Imprimer Article 1Eugène Sèlidji Attakpa (11 pages) :

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α gene modulates insulin transcriptional factors and inflammation in adipose tissues in mice

Abbreviated title: PPAR α modulate transcription and inflammation

Authors:

Akadiri Yessoufou*,^{1,3} Jean-Marc Atègbo*,^{2,3} **Eugène Attakpa**,^{2,3} Aziz Hichami,³ Kabirou Moutairou,¹ Karim L. Dramane,² Naim Akhtar Khan³

Authors' affiliations:

¹Laboratoire de Biologie et Physiologie Cellulaires, Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire, Faculté des Sciences et Techniques / Université d'Abomey-Calavi et Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA) ; Département de Physiologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Bénin. ; PRES EA 4183 Lipides et Signalisation Cellulaire, Faculté des Sciences de la Vie, Université de Bourgogne, 6 Boulevard Gabriel, 21 000 Dijon, France.

Résumé :

A jeun, les souris PPAR α -null sont hypoglycémiques par rapport aux animaux témoins WT. La concentration en insuline et l'expression de ses ARNm pancréatiques, par rapport aux animaux témoins, sont diminuées chez les souris PPAR α -null, suggérant que la suppression du gène de PPAR α contribuait à la faible transcription de ces gènes. De plus, la suppression du gène de PPAR α aboutit à la diminution des facteurs de transcription des gènes de l'insuline comme Pdx-1, Nkx6.1 et MafA. En outre, la capacité pancréatique fonctionnelle est aussi détériorée par la suppression du gène de PPAR α puisque le pancréas des souris PPAR α -null exprime de faibles taux de Glut2 et de glucokinase. Les souris PPAR α -null expriment des taux élevés d'adiponectine et de leptine comparées aux souris témoins. Dans les tissus adipeux, les souris PPAR α -null présentent une augmentation de l'expression de CD14 et CD68 généralement exprimés par les macrophages. La suppression du gène de PPAR α diminue, au niveau des adipocytes, l'expression de MCP-1, TNF α , IL-1 β , IL-6 et RANTES, alors que l'expression de TLR-2 et de TLR-4 (récepteurs pro-inflammatoires) était élevée dans les tissus adipeux. Ces résultats suggèrent qu'en condition normale, la déficience en PPAR α , chez les souris est impliquée dans la modulation de la transcription des gènes de l'insuline et le statut inflammatoire du tissu adipeux.

Pris en ensemble, les résultats suggèrent qu'en condition normale, la déficience en PPAR α -null, chez les souris est impliquée dans la modulation de la transcription des gènes de l'insuline et le statut inflammatoire du tissu adipeux.

Mots clés : Souris PPAR- α -Insuline-Tissu adipeux-Inflammation.

Publication n°2

Publication n°2**Docosahexaenoic acid modulates the expression of T-bet and GATA-3 transcription factors, independently of PPAR α , through suppression of MAP kinase activation**

Eugène Attakpa, Aziz Hichami, Anne Marie Simonin,
Esther Garcia, Karim L. Dramane, Naim Akhtar Khan

Biochimie 91 (2009) : 1359-1365.

Objectif de l'étude

L'un des objectifs de cette étude a été d'évaluer l'implication de l'absence de PPAR α dans la modulation de la transcription des facteurs de transcription T-bet et de GATA-3 chez les souris adultes C57BL/6J normales (WT) et PPAR α -null. Un autre objectif de cette étude a donc été de déterminer d'une part si les antis CD3 et CD28 induisent l'activation de ERK1/2 ; CJUN kinase ; p38 Kinase.

Imprimer Article 2 Eugène Sèlidji Attakpa (07 pages) :

Docosahexaenoic acid modulates the expression of T-bet and GATA-3 transcription factors, independently of PPAR α , through suppression of MAP kinase activation

Eugène Attakpa^{1,2}, Aziz Hichami², Anne Marie Simonin²,
Esther Garcia¹, Karim L. Dramane¹, Naim Akhtar Khan²

Authors' affiliations:

¹Laboratoire de Pharmacologie et d'Endocrinologie, Département de Physiologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques / Université d'Abomey-Calavi et Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA) ; Cotonou, Bénin. ; ²UPRES EA 4183 Lipides et Signalisation Cellulaire, Faculté des Sciences de la Vie, Université de Bourgogne, 6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France.

Biochimie 91 (2009) : 1359-1365.

Résumé:

Nous avons exploré la modulation des cellules T auxiliaires (Th) par l'acide docosahexaénoïque (DHA), acides gras poly-insaturés n-3 (AGPI n-3). Le DHA a exercé un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules T aussi bien chez les souris sauvages WT, sur un fond génétique de C57BL6/J que chez les souris PPAR α -null des souris déficientes en gène de PPAR α et des souris; cependant, cet acide gras a exercé des effets inhibiteurs plus marqués chez les WT que chez les PPAR α -null.

DHA a diminué la sécrétion d'interleukine-2 (IL-2) et IFN- γ dans tous les deux groupes de souris; cependant, cet acide gras a augmenté la sécrétion d'IL-4, une cytokine sécrétée par des cellules Th2. La sécrétion d'IL-4 par des cellules T induite par le DHA était plus importante chez les animaux WT que chez les souris PPAR α -null.

L'absence de gène PPAR α a abouti à l'augmentation de l'ARNm de T-bet, indiquant le fort statut pro-inflammatoire de ces animaux. Comme prévu, DHA contrôle négativement l'ARNm de T-bet, un facteur de transcription des cellules Th1, mais contrôle positivement l'ARNm de GATA-3, un facteur de transcription de cellules Th2.

Il apparaît donc clairement, à la vue de ces différents résultats (**article n°2**), que le DHA incite la différenciation Th2 de cellules Th0 et son mécanisme d'action pourrait être PPAR α -indépendant.

L'induction de l'expression de T-bet dans les cellules CD4+ a été positivement corrélée à l'activation de p38 la protéine mitogen-activée (MAP) kinase de MAPK (ERK1/ERK2). Quoique les cellules T des souris PPAR α -null aient exprimé un plus fort niveau de

phosphorylation de p38 que les cellules T de WT, la présence d'un ligand de PPAR α a effectivement supprimé leurs phosphorylations. L'activation de PPAR α avec un ligand fortement spécifique, le DHA, a diminué la phosphorylation des MAP kinases (p38 et ERK1/2) dans tous les deux les types cellulaires. Les inhibiteurs pharmacologiques des MAP kinases ont aussi diminué T-bet et augmenté GATA-3 dans les cellules T et s'est révélé être capable de supprimer la phosphorylation de p38 MAP kinase, de MAPK (ERK1/ERK2); l'expression de T-bet et augmenter l'expression de GATA -3.

Ces résultats démontrent une nouvelle influence régulatrice indépendante à la liaison ADN et un contrôle-agoniste régulateur par le récepteur d'hormone nucléaire PPAR α . Ils démontrent que DHA, via son action sur les MAP kinases, module l'expression des facteurs de transcription. En résumé, ces résultats expliquent aussi le mécanisme d'action de cet acide gras sur la différenciation des cellules T dans la maladie et la santé.

Mots clés: Souris PPAR- α -Acides gras-Cellules T- MAPK.

PARTIE III

Discussion générale & Perspectives

I. Discussion générale

1. PPAR α module la transcription des gènes des facteurs de transcription de l'insuline et l'inflammation dans des tissus adipeux des souris.

Nous avons vu, dans la première partie que pour éclairer l'implication de PPAR α dans la modulation de la transcription du gène de l'insuline et l'inflammation de l'adipocyte, nous avons conduit la présente étude sur les souris PPAR α -null et WT. La première question est comment PPAR α , en conditions de jeûne module les fonctions de cellules β . Dans notre étude, nous avons observé que des souris PPAR α -null ont développé l'hypoglycémie qui pourrait être liée à une baisse de l'oxydation de l'acide gras et à l'augmentation du besoin en glucose comme une source d'énergie (Kersten ., 1999). En outre, les souris PPAR α -null ont présenté des concentrations d'insuline et l'expression des transcriptions de l'ARNm basses en comparaison avec les souris WT. Ces observations corroborent avec l'étude de Bihan et coll. (2005) dans laquelle ces chercheurs ont montré que PPAR α est nécessaire pour assurer la sécrétion correcte de l'insuline et l'induction de son ARNm, qui fait partie de la réponse des cellules β à l'hyperglycémie.

Les cellules β pancréatiques produisent l'insuline en réponse à la demande physiologique et hyper glycémique, en 15 minutes, résultat de l'activation d'un réseau complexe par voies de signaux intracellulaires qui déclenchent la sécrétion de l'insuline (Leibiger B et coll., 2002). Les régulateurs transcriptionnels positifs sont Pdx-1 et MafA qui se lient au promoteur de l'insuline pour fournir un effet de synergie (Lawrence et coll., 2005). Nkx6.1 affecte aussi la sécrétion de l'insuline induite par le glucose (Schisler et coll., 2005). L'état hypo insulinémique des souris PPAR α -null peut être lié à l'expression diminuée de l'ARNm de Pdx-1, MafA et Nkx6.1 dans leur pancréas. De plus, la forte diminution de la transcription du gène de l'insuline chez les souris PPAR α -null pourrait être due à la baisse de l'expression de l'ARNm de Pdx-1 chez ces animaux que chez les WT. En effet, la délétion du gène Pdx-1 dans le pancréas aboutit aux concentrations d'insuline anormalement basses (Ahlgren et coll., 1998). Dans notre étude, l'action de la délétion de PPAR α sur l'hypo insulinémie ne semble pas être obtenue par médiation de C/EBP- β puisque l'expression de ce répresseur n'a pas significativement changé dans les deux groupes. Cependant, il n'est toujours pas clair de la manière dont PPAR α est impliqué dans l'inhibition de l'expression de l'ARNm de Pdx-1,

MafA et Nkx6.1. Ce phénomène est-il directement contrôlé par PPAR α ou est ce la lipotoxicité, causée par le PPAR α -null qui est responsable de ces observations ?.

La fonction des cellules β pancréatiques est associée l'activité de la glucokinase (GK). Nous l'avons observée chez les souris PPAR α -null, il y avait une expression basse de l'ARNm de GK en comparaison aux animaux WT. De là, l'expression diminuée l'ARNm de GK chez les souris PPAR α -null peut contribuer à réduire la fonction insulinique des cellules β pancréatiques (Liu et coll., 2000). Nos résultats le suggèrent que PPAR α peut être impliqué dans le contrôle de l'expression de l'ARNm de Glut2 ou de GK dans le pancréas. En effet, PPAR α est considéré comme un des facteurs de transcription impliqué dans l'augmentation de l'expression l'ARNm de Glut2 ou GK (Wang et coll., 1998). Yoshikawa et coll. (2001) ont aussi montré que les cultures à long terme de cellules pancréatiques avec palmitate ont été associées à l'expression réduite de l'ARNm des PPAR α et par conséquent à l'expression basse de Glut2, GK, ou l'expression de l'ARNm de preproinsuline passe probablement par l'inhibition de l'ARNm de Pdx-1.

Dans le foie, nous avons observé chez les souris PPAR α -null non seulement que les acides gras libres se sont abondamment accumulés, mais aussi TG. Nos observations corroborent les découvertes de plusieurs chercheurs (Park et coll., 2006) qui ont montré que chez les souris PPAR α -null s'accumule TG hépatique en liaison à l'alimentation et pendant le jeûne. Djouadi et coll. (1998) ont annoncé que chez les souris PPAR α -null se développent les accumulations massives de lipides du myocarde dans les conditions qui augmentent le flux des acides gras. Campbell et coll. (Campbell et coll., 2002) ont expliqué ce phénomène en démontrant qu'il y a une augmentation marquée de Malonyl-CoA, un puissant inhibiteur d'oxydation de l'acide gras, dans les coeurs des souris PPAR α -null. Nous voudrions nous rappeler que les agonistes de PPAR α baissent des niveaux de TG en augmentant l'expression de gène lipoprotéine lipase via un élément de réponse de PPAR (PPRE) dans le promoteur LPL (Schoonjans et coll., 1996) et diminuant les niveaux de apo C-III (Staels et coll., 1995). En plus, les souris PPAR α -null, dans notre étude, montrent un fort taux de CD36/FAT qui participera de nouveau à augmenter l'assimilation de lipides par le foie et contribuera en fin de compte au stéatose hépatique chez ces animaux. En outre, l'ARNm de SREBP1C est abaissé chez les souris PPAR α -null. SREBP1C contrôle la transcription du gène de la lipogénèse. De là, une forte accumulation de TG et de l'acide gras libre dans le foie, en liaison avec la forte expression de FAT/CD36, pourrait être responsable de l'expression basse de ce facteur de transcription chez ces animaux.

Autant que l'adipokine est concernée, nous avons observé une augmentation d'événement concomitant avec l'expression de l'ARNm de l'adiponectine et de la leptine chez les souris PPAR α -null et cette augmentation pourrait être liée à la grande taille des tissus adipeux chez ces animaux en comparaison au WT. Nos résultats sur la forte expression de l'ARNm de la leptine et l'adiponectine chez les souris PPAR α -null corroborent les observations de Bihan et coll. (2005) qui ont montré que les concentrations de ces adipokines sont élevées chez les souris PPAR α -null. Autant que l'inflammation est concernée, l'adiponectine élevée peut contrebalancer les effets de la leptine puisque le premier est antiathérogénique anti-inflammatoire et le dernier est pro-inflammatoire (Diez et Iglesias, 2003).

Pour déterminer l'inflammation dans les adipocytes, nous avons évalué quantitativement l'ARNm des marqueurs bien connus des macrophages. Étonnamment, nous avons observé que l'expression des ARNm de CD14 et CD68, mais pas celle de F4/80, était élevée chez les souris PPAR α -null. En effet, F4/80 est le vrai marqueur des macrophages. Dans notre étude, ceux-ci sont présents dans les adipocytes, mais n'ont pas infiltré les macrophages, qui expriment CD14 et CD68. Nos observations sont en accord avec les résultats de Khazen et coll. (2005) qui ont annoncé que les tissus adipeux humains murins expriment CD14 et CD68, mais pas F4/80, tant au niveau de l'ARNm qu'au niveau de la protéine. En plus, Cousin et coll. (1999) ont démontré que les pré adipocytes peuvent être différenciés dans les cellules macrophages semblables qui sont souillées avec MOMA-2, un marqueur d'origine monocyte macrophage, mais sont négatives pour F4/80.

MCP-1 est connu pour être sécrété par les tissus adipeux et ce facteur favorise l'infiltration et la différenciation des macrophages (Weisberg et coll., 2003). Nous avons observé chez les souris PPAR α -null que l'expression de l'ARNm de MCP-1 est plus basse que chez les WT, suggérant que la délétion du gène PPAR α explique la diminution de la population des macrophages des tissus adipeux. Conséquemment, l'expression des ARNm de IL-1 β , IL-6 et TNF- α est plus basse chez les souris PPAR α -null que celle de WT.

RANTES est considéré comme une adipokine avec son récepteur CCR5 exprimé principalement sur des cellules T infiltrées (Wu et coll., 2007). Dans notre étude, on n'a pas détecté l'expression de l'ARNm de TCR α et l'ARNm de CCR5 dans les tissus adipeux des souris. Cependant, nous avons observé que l'expression de l'ARNm de RANTES a été diminuée dans les tissus adipeux des souris PPAR α -null. L'adiponectine est capable de réguler l'expression de RANTES (Wu et coll., 2007). Le fort taux de l'ARNm de l'adiponectine dans les tissus adipeux de ces souris pourrait être responsable de la diminution de l'expression de l'ARNm de RANTES. Notre hypothèse peut être soutenue par l'étude de

Wu et coll. (2007) qui a montré que les niveaux de l'ARNm du RANTES étaient négativement corrélés avec l'adiponectine des tissus adipeux des souris.

On a montré *in vitro* que les adipocytes différenciés expriment TLR-2 et TLR-4 (Lin et coll., 2000). C'est connu depuis que les TLRs sont des médiateurs de la réponse cellulaire au lipopolysaccharide bactérien (LPS), cela n'est possible que lors d'une infection microbienne. Les adipocytes peuvent jouer un rôle dans l'immunomodulation (Creely coll., 2007). La forte expression de TLRs est associée à une inflammation accrue. L'augmentation des ARNm de TLR-2 et TLR-4 chez les souris PPAR α -null, suggère que PPAR α pourrait être impliqué dans la modulation d'endotoxémie. Autant que le mécanisme dans l'induction de l'expression de TLR est concerné, l'on a récemment montré que la leptine peut inciter l'expression de TLR1-9 dans les adipocytes (Batra et coll., 2007). Dans notre étude, le fort taux de l'ARNm de la leptine chez les souris PPAR α -null pourrait être responsable de l'augmentation des taux d'ARNm de TLR-2 et TLR-4.

Nos résultats ont également montré que PPAR α serait nécessaire pour la sécrétion de l'insuline. En effet, Bihan et coll. (2005) ont suggéré, dans leur étude, que PPAR α serait nécessaire pour assurer la sécrétion appropriée d'insuline dans une situation d'hyperglycémie.

Pour résumer, notre étude démontre que PPAR α Contrôle la transcription de gènes d'insuline et module l'inflammation par diminution de l'expression de l'ARNm de certains agents pro-inflammatoires comme l'ARNm de MCP-1, TNF- α , IL-6 et RANTES quoique le ARNm d'autres médiateurs pro inflammatoires comme TLR-2 et TLR-4 soient augmentés en absence de PPAR α . Cependant, de nouvelles études sont exigées pour clarifier le rôle de PPAR α , dans des conditions hyperglycémiques.

2. L'acide docosahexanoïque (DHA) module l'expression des facteurs de transcription T-bet et GATA-3, indépendamment de PPAR α , par suppression de l'activation des MAP kinases.

Nous avons rapporté, dans la première partie de ce document, que le système immunitaire occupe une place prépondérante dans l'installation du diabète et de l'obésité. Nous avons également vu que de nombreux chercheurs ont rapporté la faible incidence du diabète et des maladies cardiovasculaires dans les populations consommatrices des produits de mer, les poissons riches en AGPI n-3. De plus, nous avons rapporté des observations qui évoquent l'effet immunosuppresseur des AGPI. Le but de l'étude rapportée dans l'**article n°2** est d'évaluer l'implication de l'absence de PPAR α dans la modulation de la transcription des facteurs de transcription T-bet et de GATA-3 chez les souris adultes C57BL/6J normales (WT) et PPAR α -null. Lors de l'activation des cellules T, les voies de signalisation convergent vers l'activation des MAP kinases ERK1/2, qui sont importantes pour la prolifération cellulaire. De plus, il a été mis en évidence au laboratoire que le DHA inhibe les MAP kinases dans les lymphocytes T Jurkat. Un autre but de cette étude a donc été de déterminer d'une part si l'anti CD3 et CD28 induisent l'activation de ERK1/2, CJUN kinase, p38 Kinase et le DHA peut moduler ces activations d'autre part.

Un certain nombre d'études ont investigué sur les effets des acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI) dans la gestion des maladies auto-immunes comme la polyarthrite chronique évolutive (Kremer et coll., 1990), le psoriasis (Bittiner et coll., 1988) et la dermatite atopique (Bjorneboe et coll., 1987). Ces études ont démontré que le DHA exerce des effets bénéfiques et inhibe la prolifération de la cellule T (Kremer et coll., 1990, Bittiner et coll., 1988, Bjorneboe et coll., 1987). De même nous avons aussi observé que cet acide gras inhibe la prolifération des cellules T chez tous les deux groupes de souris. En outre, DHA a diminué la sécrétion d'IL-2 et IFN- γ dans tous les deux groupes de souris; cependant, cet acide gras a augmenté la sécrétion d'IL-4, une cytokine sécrétée par les cellules Th2. La sécrétion d'IL-4 par les cellules T induite par le DHA était observable aussi bien chez les Souris WT et PPAR α ^{null}. Ces observations suggèrent que DHA puisse changer des cellules Th1 en phénotype Th2. En plus, les cellules T des souris PPAR α ^{null} ont moins de réponses prolifératives en comparaison aux souris WT (et ceci en raison du fait qu'il y a moins de forme d'IL-2 sécrétée dans l'environnement extracellulaire. En fait, la prolifération des cellules T est un phénomène IL-2-dépendante. La différenciation des cellules T naïves en sous-ensembles Th1 et Th 2 est fermement régulée par l'activité des voies de signalisation

spécifiques et des facteurs de transcription (Ho et coll., 2002). Le facteur de transcription de T-bet, représente un régulateur clef de développement cellulaire Th1 par sa capacité à transactiver le gène IFN- γ en réprimant simultanément l'expression du gène IL-4 (Szabo et coll., 2000). Le GATA-3 représente un facteur de transcription clef pour le développement de cellules Th2. L'absence de GATA-3 dans des souris réduit l'expression de cytokines TH2 *in vitro* et *in vivo* (Yamashita et coll., 2004). Nous avons observé que l'absence de gène PPAR α a abouti à l'augmentation de l'expression de l'ARNm T-bet et une diminution de la transcription de GATA-3. Nous avons aussi observé que l'IFN- γ a fortement été sécrétée par les cellules T de PPAR α^{null} . Nos observations corroborent plusieurs études qui ont montré que les cellules T de PPAR α^{null} expriment abondamment l'ARNm de T-bet et sa protéine (Jones et coll., 2002; Gocke et coll., 2009). Il a été suggéré que la voie de signalisation IFN- γ des cellules T des souris PPAR α^{null} peut rapidement inciter l'expression de T-bet dans ces cellules (Lighvani et coll., 2001). Ces observations indiquent aussi le fort statut pro-inflammatoire des animaux PPAR α^{null} .

Quand les cellules T ont été traitées avec le DHA, nous avons observé que cet acide gras diminue l'expression de T-bet et augmente celle de GATA-3 tant chez les animaux WT que chez PPAR α^{null} . Ces résultats suggèrent que DHA engage la différenciation des cellules T vers le phénotype Th2 de façon PPAR α indépendante. Ces observations, en partie, corroborent plusieurs rapports qui ont montré qu'un régime enrichi en acide gras polyinsaturés de la famille n-3 (AGPI) augmente le phénotype TH2 des rats wistar (Khan et coll., 2006) et des rats BB (Kleeman et coll. 1998) Aucune étude n'est disponible sur la modulation de T-bet et de GATA-3 par l'acide gras polyinsaturés de la famille n-3 (AGPI); cependant, on a récemment montré que les prostaglandines diminuent l'expression de T-bet dans les cellules T (Napolitani et coll., 2009).

Pour éclairer l'implication de PPAR α dans les mécanismes d'action, nous avons utilisé WY14,643, un agoniste du récepteur PPAR α . Nous avons observé que WY14, 643 inhibe la prolifération des cellules T de WT. Cet agent inhibe aussi légèrement, quoique significativement la prolifération des cellules T chez les souris PPAR α^{null} (presque 10 %). Ces observations suggèrent que WY14,643 module la prolifération des cellules T de façon PPAR α -indépendante, au moins dans les cellules T PPAR α^{null} . En outre, DHA a exercé une réponse additive sur l'inhibition de la prolifération des cellules T de WT, suggérant de nouveau que les cibles de ces agents (de WY14,643 et DHA) sont différents autant que l'activation de cellules T est concernée. Il a été récemment démontré que DHA inhibe la

prolifération des cellules T, en interférant en amont au niveau de la cascade de signalisation (Denys et coll., 2005, Denys et coll., 2001, Denys et coll., 2004, Khan et coll., 2006).

Pour comparer les effets de WY14,643 avec DHA sur des facteurs de transcription, nous avons évalué par RT-PCR et le western blot l'expression de T-bet et GATA-3. Dans des cellules T de WT, DHA et WY14,643 ont exercé des effets additifs sur la diminution des facteurs de T-bet et une augmentation de GATA-3. De là, il est possible que WY14, 643 agisse via PPAR α dans les cellules T WT. Cependant, DHA agit vraiment sur une cible, autre que PPAR α ; car cet acide gras potentialise l'action de WY14,643 sur les facteurs transcription. Les observations sur WY14,643 peuvent être justifiées selon un rapport récent qui a démontré que gemfibrozil, un agoniste de PPAR α , protège les souris d'EAE en augmentant la transcription de GATA-3 et en diminuant celle de T-bet (Goetze et coll., 2009). Néanmoins, WY14, 643 agit aussi de façon PPAR α - indépendante comme cet agent exerce la même action dans les cellules T PPAR α^{null} . Le DHA augmente tant les niveaux de transcription de GATA-3 que de sa protéine. Aussi Il diminue l'expression de T-bet dans les cellules T PPAR α^{null} , suggérant que DHA agisse vraiment indépendamment de PPAR- α .

Nous avons observé une forte expression de p38 MAPK, mais pas d'ERK1/2 et JNK, dans les cellules T de PPAR α^{null} . Jones et coll. (2003) ont remarqué que dans les cellules T de PPAR α^{null} , l'express de p38 MAPK est fortement exprimée du fait que PPAR α réprime l'activation de p38 MAPK par un mécanisme de liaison ADN- indépendante (Jones et coll., 2002). Les mêmes auteurs ont proposé que la forte activité de MAP kinase dans les cellules T de PPAR α^{null} pourrait accélérer indirectement l'expression de T-bet. Plusieurs études ont bien montré que l'activité de MAP kinase est associée à la différenciation cellulaire vers le phénotype Th1 et à la production d'IFN- γ (Rincon et coll., 1998). Il a été récemment établi que les MAP kinases activées dans les cellules Th1 T CD4 + par une cascade de signalisation qui implique GADD45 γ , une protéine qui peut physiquement agir réciproquement avec PPAR α (Lu et coll., 2001). Alternativement, PPAR α peut supprimer l'activation de MAP kinase en s'associant avec certain complexe de protéines secondaires. Nous avons observé que tant DHA que WY14,643 a diminué l'expression des trois MAPK tant dans les cellules T de WT que dans PPAR α^{null} . D'autres auteurs ont aussi montré *in vivo* qu'une supplémentation avec DHA a pu diminuer l'activité de p38 MAP kinase dans les plaquettes (Lu et coll., 2001). Nous avons précédemment montré que DHA exerce des effets d'immunosuppresseurs via son action inhibitrice sur ERK1/2 dans les cellules T (Denys et coll., 2005; Denys et coll., 2001, Khan et coll., 2006).

Cependant, il reste à élucider comment le DHA en inhibant les MAPK augmente l'expression de GATA-3. Néanmoins, il est clair que l'inhibition des MAPK pourrait moduler l'expression des facteurs de transcription des cellules T comme nous l'avons observé avec l'utilisation de l'U0126, un inhibiteur de MEK1/2 et le SB202190, un inhibiteur de P38 MAPK qui a fait diminué l'expression de l'ARNm de T-bet et augmenté l'expression de l'ARNm le GATA-3 dans les cellules T de WT. De façon intéressante, Owakai et coll. (2006) ont démontré que les MAP kinases (p38 et ERK1/2) pourraient être impliqué dans la différenciation cellulaire Th1 où p38 agirait en amont de T-bet et ERK1/2 modulera et le mécanisme de différenciation et l'inhibition des activités de deux MAPK bloqueront complètement la différenciation cellulaire Th1 tandis que l'inhibition de p38 MAPK bloque partiellement ce processus. De là, nous pouvons présumer que le DHA via son action sur p38 bloquera l'expression de T-bet tandis que cet acide gras via l'action inhibitrice sur ERK1/2 sera responsable du blocage complet de la différenciation cellulaire Th1. Dans les cellules T de $PPAR\alpha^{null}$, SB202190, mais pas U0126, ont aussi exercé la même action sur la modulation de l'expression des facteurs de transcription des cellules T. Bachmann et coll. (2007) ont aussi montré que les expressions de l'ARNm de T-bet et de sa protéine ont été supprimées par l'inhibition de l'activité de p38 MAP kinase. SP600125, un inhibiteur de Jun N-terminal kinase/1/2/3, a modulé l'expression des facteurs de transcription des cellules T dans tous les deux types cellulaires (données non publiées). Dans l'ensemble, notre étude démontre que le DHA joue un nouveau rôle dans la régulation transcriptionnelle d'expression de gène de T-bet dans les cellules T. La capacité de DHA à négativement réguler l'expression de T-bet induite par l'activation des cellules T peut influencer la cinétique de Th1 vers le phénotype Th2. La capacité de DHA à supprimer l'activation des MAP kinases et par conséquent à augmenter l'expression de GATA-3 peut permettre de répondre aux facteurs exogènes qui peuvent influencer les effets sur les cellules T après leur stimulation. Notre étude montre aussi que DHA peut inciter la différenciation Th2 de façon $PPAR\alpha$ -indépendante, par conséquent, peut moduler la progression des maladies immuno-médiées.

II. Perspectives

Les principaux résultats, obtenus au cours de nos études, nous ont inspirés un certain nombre d'interrogations:

Le récepteur PPAR α ayant été décrit comme inhibiteur des cytokines Th1 et que la balance cytokinique Th1/Th2 jouant un rôle important, nous avons donc investiguer la modulation de la transcription des facteurs de transcription de l'insuline et l'inflammation dans des tissus adipeux, chez des souris sauvages sur fond génétique de C57BL6/J et leurs homologues chez qui le gène de PPAR α a été invalidé (PPAR α -null).

Nous avons observé, dans plusieurs articles que les souris diabétiques (diabète expérimental) et obèses ont présenté plusieurs anomalies métaboliques et immunitaires. Chez *l'homme*, à l'étape actuelle de nos connaissances, des controverses demeurent sur le diagnostic du diabète ne prenant pas en compte les perturbations métaboliques au cours de la grossesse. De plus, aucune étude n'a été réalisée sur le statut immunitaire des diabétiques *du Bénin*. C'est pourquoi, nous envisageons en perspective, après notre thèse, **d'étudier les anomalies métaboliques et l'évolution du statut immunitaire dans le diabète et dans l'obésité en général et de l'obésité infantile en particulier au Bénin.**

Cette étude sera effectuée dans le but de comprendre les altérations métaboliques, d'évaluer entre autre leur statut immunitaire humoral.

1. Effets antidiabétiques des extraits de plantes médicinales du Bénin

Dans un ouvrage exhaustif sur la **pharmacopée du Bénin**, plusieurs plantes, notamment *Anacardium occidentale*, *Anchomanes difformis*, *Bridelia ferruginea*, *Cassa occidentalis*, *Caesalminia pulcherrima*, *Ficus glumosa*, *Hexabolus monopetalus*, *Jatropha curcas*, *Jatropha gossypiiifolia*, *Lantana camara*, *Momordia chrantia* et *Terminalia catapa*, ont été décrites comme possédant des propriétés anti-diabétiques (Adjanohoun et coll., 1989).

Des études préliminaires sur *Momordia chrantia* ont montré que l'extrait de cette plante exercerait des *effets immunostimulateurs*.

Dans une étude récente, Ahmed et coll. (2001) ont constaté que l'extrait des fruits de *Momordia charantia* exercerait des effets hypotriglycémiques et hypocholestérolémiques chez le rat diabétique. De plus, l'extrait de fruit de *Momordia* exerce également une action antioxydante chez le rat (Raza et coll., 2001). Le fait que le pancréas est l'organe le plus touché lors du diabète, certaines équipes ont étudié la physiologie de cet organe et ont

démontré que le jus de fruit de *Momordia charantia* augmenterait le nombre de ces cellules β chez le rat diabétique (Ahmed et coll., 1998). L'extrait de fruit de cette plante est également utilisé dans d'autres pays, tels que l'Inde (Platel et Srinivasan, 1997) et les Emirats Arabes Unis (Raza et coll., 1996).

- Le diabète de type 1 étant une maladie auto-immune caractérisée par l'infiltration des cellules T autoréactives dans les îlots pancréatiques, nous envisageons, dans nos perspectives, ***d'élucider l'effet de quelques plantes sur l'activation des mécanismes précoces de la prolifération des cellules T.*** L'augmentation du taux de calcium intracellulaire fait partie de ces mécanismes.
- Des études ont montré, au cours de ces dernières années, que le principe actif de *Mormodica charantia*, ayant la propriété hypoglycémiante, serait le polypeptide P contenu dans le fruit de cette plante. En effet, nous ***étudierons l'effet du polypeptide P sur la prolifération des cellules T humaines.***
- **Nous étudierons également l'effet du polypeptide P sur l'expression de l'interleukine-2 (IL-2) par RT-PCR quantitative.**

2. Implication de PPAR-alpha dans la sécrétion de l'insuline

Certaines études ont montré que PPAR α serait également impliqué dans la sécrétion de l'insuline (Bihan et coll., 2005). Nous mènerons des études pour **élucider les effets bénéfiques exercés par les extraits des différentes plantes.** En effet, nos prochaines expériences nous permettront de prouver si ce récepteur PPAR α intervient dans la voie de signalisation de la cellule β pancréatique, aboutissant à la transcription des gènes de l'insuline.

- des îlots pancréatiques seront prélevés chez des souris PPAR α -null adultes et nous étudierons l'effet des agonistes PPAR α sur la mobilisation du calcium intracellulaire.
- Ces îlots seront également cultivés en présence des différentes doses de glucose et nous évaluerons, dans ces conditions, leur capacité à sécréter l'insuline.

Ces différentes expériences nous permettront de *mieux comprendre les mécanismes pathologiques et immunologiques* impliqués dans la progression du diabète humain. Elles nous fourniront des informations scientifiques concernant le *rôle des plantes médicinales dans l'activation des cellules T.*

Les résultats attendus de ces études, en perspectives, nous permettront également de *valider l'efficacité des extraits des plantes médicinales*, utilisées depuis des siècles en Afrique noire, comme un traitement de certaines pathologies comme les maladies cardiovasculaires et les inflammations. Sachant que le système immunitaire occupe une place importante dans l'installation du diabète et de l'obésité, nous allons étudier les effets des extraits de ces plantes médicinales sur le système immunitaire. Aussi nous allons étudier :

1. Le Rôle des extraits de ces plantes dans l'activation des MAP kinases post-phase S par la costimulation (CD28 / B-7.1/B-7.2)

L'activation des cellules T est déclenchée par la stimulation d'un antigène engendrant la production de l'IL-2 et l'expression de son récepteur (IL-2R) correspondant à la transition en phase-S du cycle cellulaire (Mueller et coll., 1989). Deux signaux membranaires ont été définis concernant l'activation des cellules T en phase de repos : un signal déclenché par la reconnaissance de l'antigène par le complexe TCR/CD3, l'autre mettant en jeu une costimulation via le récepteur CD28. Cette costimulation potentialise la production d'IL-2 par rapport à l'activation seule du TCR.

Le couplage de CD28 avec des protéines tyrosines kinases, la phospholipase C et l'homéostasie calcique a été démontré. Cependant, leur implication dans la transmission du signal dépend du type d'antigène reconnu par CD28.

Les molécules de costimulation les mieux caractérisées sur les cellules présentatrices de l'antigène sont les molécules B-7, B-7.1 et B-7.2. Ces molécules ont une structure homodimérique. Elles appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. B-7.1 et B-7.2 et sont exprimées exclusivement à la surface de cellules capables de stimuler la prolifération des lymphocytes T. Les molécules B-7 interagissent avec deux types de récepteurs présents à la surface des lymphocytes T : CD28 et CTLA-4. La ligation B-7/CD28 potentialise la prolifération des cellules T. CD28 est le seul récepteur des molécules de costimulation exprimé sur les cellules T naïves. Après leur activation, les cellules T peuvent exprimer le second récepteur des molécules B-7 c'est-à-dire CTLA-4. CTLA-4 a une forte homologie de séquence avec CD28 et les deux molécules sont codées par des gènes voisins sur le génome. CTLA-4 se fixe sur les molécules B-7 avec une affinité vingt fois supérieure à celle de CD28 et induit un signal inhibiteur aux lymphocytes T activés. De ce fait, CTLA-4 joue un rôle primordial dans le contrôle de la réponse immunitaire en limitant une expansion trop importante des lymphocytes T activés par l'antigène et en permettant l'arrêt de la réponse immunitaire. Ce rôle de CTLA-4 a été confirmé chez des souris mutées pour ce gène. Ces

souris présentent en effet un syndrome lymphoprolifératif massif fatal. Bien que de nombreuses molécules aient été impliquées dans les phénomènes de costimulation, jusqu'à présent, seules les molécules B-7.1 et B-7.2 sont capables, lors de leur interaction avec CD28, de produire les signaux nécessaires à l'induction d'une réponse immunitaire normale.

En ce qui concerne ERK1/ERK2, certains auteurs ont démontré que l'activation de CD28 par B-7.2 est couplée à l'activation de Vav permettant l'échange GDP/GTP sur p21 ras. La protéine p21-ras associée au GTP peut alors se lier à Raf pour l'activer. Raf phosphoryle MEK qui, à son tour, phosphoryle ERK1/ERK2 (Nunes et coll., 1994).

Par conséquent, il serait intéressant de déterminer le rôle des extraits de ces plantes sur l'activation des MAP kinases induite par costimulation CD3/CD28 lors du déclenchement des événements tardifs. Nous avons démontré que le DHA régule les événements précoces déclenchés par l'activation du complexe TCR/CD3 seul ; il semble intéressant **d'évaluer leurs effets sur le déclenchement des événements tardifs induits par costimulation du complexe TCR/CD3/CD28.**

La costimulation de CD28 active deux sous groupes de MAPK, p38 et c-jun amino-terminal kinase (JNK). Des études ont déjà mis en évidence que l'activation de la voie JNK induit la production d'IL-2. Il serait donc intéressant d'étudier le rôle des extraits des plantes sur cette voie de signalisation.

2. Rôle du calcium et extraits de plantes dans l'activation des MAP kinases

Atherfold et coll. (1999) ont mis en évidence que l'ionomycine induit l'activation d'ERK. La thapsigargin est également capable d'induire la phosphorylation des MAP kinases dans les cellules Jurkat-T. Ainsi selon ces auteurs, l'augmentation du calcium cytosolique joue un rôle dans le contrôle de la voie des MAP kinases. La concentration du calcium intracellulaire dans les cellules T en phase de repos est de l'ordre de 100nM alors que la concentration extracellulaire est de 1mM. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'activation des cellules T induit une sortie de calcium du réticulum endoplasmique (RE) par l'action de l'IP₃. Cette augmentation déclenche un efflux calcique du cytosol vers le milieu extracellulaire suivi d'un influx calcique du milieu extracellulaire vers le cytosol, permettant de maintenir l'élévation calcique dans ce compartiment. Il serait donc intéressant **d'étudier les effets des extraits de plante sur l'activation des MAP kinases vis-à-vis de l'augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules T.**

3. Rôle des AGPI n-3 sur la balance Th1/Th2 au cours d'une pathogénicité :

Les cellules T CD4+, nous l'avons vu dans le chapitre II, se différencient en cellules T inflammatoires (Th1) ou en cellules T auxiliaires (Th2). Le choix de l'orientation vers l'un ou l'autre type cellulaire est encore mal connu. L'élaboration de certaines cytokines, particulièrement les IL-12 et IL-4, pourraient agir sur les cellules CD4+ et orienter leur différenciation. L'agent infectieux capable d'induire la production de telle ou telle cytokine peut également intervenir. De nombreuses études ont démontré le rôle important joué par l'EPA et le DHA dans la différenciation cellulaire. Par conséquent, ceci laisse supposer que ces acides gras pourraient avoir un effet sur les cellules CD4+.

L'activation sélective des cellules T inflammatoires conduit à l'immunité à médiation cellulaire, alors que la production sélective de cellules T auxiliaires alimente l'immunité humorale. Ainsi, il serait intéressant **d'étudier le rôle des extraits de plante sur la différenciation des cellules CD4+ au cours de certaines pathologies.**

Ces résultats ouvriront des possibilités soutenues d'utilisation de ces extraits dans le traitement de ces maladies.

4. AGPI n-3 pourrait moduler l'activation de ces cellules chez des souris rendu allergiques ou atteintes d'un cancer

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont tout d'abord démontré que le DHA, sous forme d'acide gras libre, modifie les capacités suppressives et migratoires des cellules T régulatrices et T effectrices.

Comme nous l'avons décrit dans la première partie de cette thèse, la stimulation du TCR par un antigène spécifique permet la différenciation des cellules Th0 vers un phénotype Th1 ou Th2. Les phénotypes Th1 et Th2 diffèrent de par le profil des cytokines qu'ils produisent, ce qui leur confère des propriétés fonctionnelles spécifiques. Dans le diabète de type I ou diabète auto-immun, la destruction des cellules β pancréatiques (cellules impliquées dans la sécrétion de l'insuline) est associée à une expression importante de cytokines pro-inflammatoires de type Th1. Nous rappelons que les cytokines produites par les cellules Th2 sont impliquées dans l'immunité à médiation humorale. Une autre population de cellules T sont impliquées dans la réponse auto-immune, ce sont les cellules T régulatrices ou T-reg ($CD4^+/CD25^+$). Elles inhibent l'activité des cellules T auto-réactives. Il a été mis en évidence chez les souris NOD (*Non-Obese Diabetic*), qu'un déficit en cellules T-reg aggrave le diabète auto-immun.

Il serait intéressant de **déterminer si un régime enrichi en AGPI n-3 pourrait moduler l'activation de ces cellules chez des souris rendues allergiques ou atteintes d'un cancer.**

Comme nous l'avons mentionné dans l'étude de ce manuscrit, les lymphocytes T requièrent pour leur complète activation et prolifération, un deuxième signal de co-stimulation délivré par le récepteur CD28. Le couplage de CD28 avec les tyrosines kinases, la phospholipase C et l'homéostasie calcique a été mis en évidence. Certains auteurs ont également démontré que l'activation de CD28 est couplée à l'activation de Vav permettant ainsi l'échange GDP/GTP sur la protéine p21ras. La protéine p21ras associée au GTP peut alors se lier à Raf pour l'activer. Raf phosphoryle MEK qui à son tour phosphoryle ERK1/ERK2.

Il serait par conséquent intéressant de **déterminer l'action de DHA, sur les protéines Syk et Gab2.**



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Référence:

1. Adam DJ, Hansen AE, Wiese HF. Essential acids in infant nutrition II: effect of linoleic acid on caloric intake. *J. Nutr* 1958; 66:555-564.
2. Adjanooun EJ, Adjakidje V, Ahyi MRA, Ake Assi L, Akoegninou A, d'Almeida J, Apovo F, Boukef K, Chadare M, Cusset G, Dramane K, Eyme J, Gassita JN, Gbaguidi N, Goudote E, Guinko S, Houngnon P, Issa LO, Keita A, Kiniffo HV, Kone-Bamba D, Musampa Nseyya A, Saadou M, Sdogandji Th, de Souza S, Tchabi A, Zinsou Dossa C and Zohoun Th. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Bénin. Médecine traditionnelle et pharmacopée. Agence de Coopération Culturelle et Techniques 1989, pp 731-732.
3. Ahima RS, flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 327-332.
4. Ahmed I, Lakhani MS, Gillet M, John A and Raza H. Hypotriglyceridemic et hypocholesterolemie effects of anti-diabetic Momordica charantia (karela) fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabet. Res. Clin. Pract* 2001; 51: 155-161.
5. Ahmed I., Adeghate E, Sharma AK, Pallot DJ and Singh J. Effects of Momordica charantia fruit juice on islet morphology in the pancreas of the streptozotocin-diabetic rat. *Diabetes Res. Clin. Pract* 1998; 40: 145-151.
6. Ailhaud G. Adipose tissue as a secretory organ from adipogenesis to the metabolic syndrome. *C R Biol* 2006; 329:329-577.
7. Alaoui El Azher M, Havet N, Singer M, Dumarey C, Touqui L. Inhibition by unsaturated fatty acids of type II secretory phospholipase A2 synthesis in guinea-pig alveolar macrophages: evidence for eicosanoid-independent pathway. *Eur.J. Biochem* 2000; 267:3633-3639.
8. Alonso MA, Millan J. The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *J. Cell Sci* 2001; 114:3957-3965.
9. Amri EZ, Bonino F, Ailhaud G, Abumrad NA, Grimaldi PA. Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors. *J Biol Chem* 1995; 270: 2367-71.

10. Arita Y, kihara S, Ouchi N, takahashi M, maeda K, miyagawa J, hotta K, shimomura I, nakamura T, Miyaoka K, kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 79-83.
11. Arpaia E, Shahar M, Dadi H, Cohen A et Roifman CM. Defective T cell receptor signaling and CD8+ thymic selection in humans lacking zap-70 kinase. *Cell* 1994; 76:947-958.
12. Arrington JL, McMurray DN, Switzer KC, Fan YY et Chapkin RS. Docosahexaenoic acid suppresses function of the CD28 costimulatory membrane receptor in primary murine and Jurkat T cells. *J Nutr* 2001; 131:1147-1153.
13. Astashin EI, Khodorova AB, Surin AM. Arachidonic acid abolishes the mitogen-increase in cytosolic free ca^{2+} and intracellular Ph in rat thymocytes. *FEBS Lett* 1993; 329:72-74.
14. Atégbo JM, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, moutairou K, Miled A, Grissa A, Jerbi M, Tabka Z, Khan NA. Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *J Clin endocrinol Metal* 2006; 4137-4143.
15. Atherfold PA, Norris MS, Robinson PJ, Gelfand EW et Franklin RA. Calcium-induced ERK activation in human T lymphocytes. *Mol Immunol* 1999; 36:543-549.
16. Bachmann M, Dragoi C, Poleganov MA, Pfeilschifter J, Mühl H. Interleukin-18 directly activates T-bet expression and function via p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB in acute myeloid leukemia-derived predendritic KG-1 cells. *Mol Cancer Ther* 2007; 6:723-31.
17. Bahia L, Aguiar LG, Villela A, Bottino D, Godoy-Matos AF, Geloneze B, tambascia M, Bouskela E. Relationship between adipokines, inflammation, and vascular reactivity in lean controls and obese subjects with metabolic syndrome. *Clinics* 2006; 61: 433-440.
18. Bang HO, Dyerberg J, Sinclair HM. The composition of the Eskimo food in north western Greenland. *Am. J. Clin. Nutr* 1980; 33:2657-61.
19. Barone J; Hebert JR et Reddy MM. Dietary fat and natural-killer-cell activity. *Am J Clin Nutr* 1989; 50:861-867.

20. Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, Robert JJ, Capeau J, Hainque B. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2084-2089.
21. Bastie C, Holst D, Gaillard D, Jehl-Pietri C and Grimaldi PA. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor PPARdelta promotes induction of PPARgamma and adipocyte differentiation in 3T3C2 fibroblasts. *Biol Chem* 1999; 274: 21920-5.
22. Bechoua S, Dubois M, Vericel E, Chapury P, Lagarde M, Prigent AF. Influence of very low dietary intake of marine oil on some functional aspects of immune cells in healthy elderly people. *Br. J. Nutr* 2003; 89:523-531.
23. Begin ME, Ells G, Das UN and Horrobin DF. Differential killing of human carcinoma cells supplemented with n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *J Natl Cancer Inst* 1986; 77: 1053-10962.
24. Berger J, Moller DE. 2002. The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* 53:409.
25. Berman M A, Sandborg C I, Wang Z, Imfeld K L, Zaldivar F Jr, Dadufalza V and Buckingham BA. Decreased IL-4 production in new onset type I insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Immunol* 1996; 157: 4690-4696.
26. Bihan H, Rouault C, Reach G, Poitout V, Staels B and Guerre-Millo M. Pancreatic islet response to hyperglycemia is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *FEBS Lett* 2005; 579: 2284-8.
27. Bittiner SB, Tucker WF, Cartwright I et Bleehen SS. A double-blind, randomised, placebo-controlled trial of fish oil in psoriasis. *Lancet* 1988; 1:378-380.
28. Bittiner SB, Tucker WF, Cartwright I, Bleehen SS. A double-blind, randomised, placebo-controlled trial of fish oil in psoriasis. *Lancet* 1988; 378-380.
29. Bjorneboe A, Soyland E, Bjorneboe GE, Rajka G, Drevon CA. Effect of dietary supplementation with eicosapentaenoic acid in the treatment of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 117 1987; 463-469.
30. Bjornsson S, Hardardottir I, Gunnarsson E et Haraldsson A. Dietary fish oil supplementation increases survival in mice following *Klebsiella pneumoniae* infection. *Scand J Infect Dis* 1997; 29: 491-493.

31. Blok WL, Katan MB, van der Meer JW. Modulation of inflammation and cytokine production by dietary (n-3) fatty acids. *J.Nutr* 1996; 126:1515-11533.
32. Bondeva T, Pirola L, Bulgarelli-Leva G, Rubio I, Wetzker R et Wymann MP. Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK. *Science* 1998; 282:293-296.
33. Bonin A and Khan NA Regulation of calcium signalling by docosahexaenoic acid in human T-cells. Implication of CRAC channels. *J. Lipid Res* 2000; 41: 277-284.
34. Bonish B, Jullien D, Dutronc Y, Huang BB, Modlin R, Spada FM, Porcelli SA et Nickoloff BJ. Overexpression of CD1d by keratinocytes in psoriasis and CD1d-dependent IFN-gamma production by NK-T cells. *J Immunol* 2000; 165: 4076-4085.
35. Braissant O, fougelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS): tissue distribution of PPAR-Apha, beta, and-gamma in the adult rat. *Endocrinology* 1996; 137: 354-366.
36. Bray MA. Leukotrienes in inflammation. *Agents Actions* 1986; 19:87-99.
37. Breittmayer JP, Pelassy C, Cousin JL, Bernard A and Aussel C. The inhibition by fatty acids of receptor-mediated calcium movements in Jurkat T-cells is due to increased calcium extrusion. *J. Biol. Chem* 1993; 268: 20812-20817.
38. Brouard C, pascaud M. Modulations of rat human lymphocyte function by n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and acetylsalicylic acid. *Annu. Nutr. Metab* 1993; 37:146-159.
39. Bruinsma KA and Taren DL. Dieting, essential fatty acid intake and depression. *Nutr Rev* 2000; 58: 98-108.
40. Bu JY, Shaw AS et Chan AC. Analysis of the interaction of ZAP-70 and syk protein-tyrosine kinases with the T-cell antigen receptor by plasmon resonance. With the T-cell antigen receptor by plasmon resonance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**:5106-5110.
41. Burgess JR, Stevens L, Zhang W and Peck L. Long-chain polyunsaturated fatty acids in children with attention- deficit hyperactivity disorder. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 327S-330S.
42. Calde PC. Fatty acids, dietary lipide and lymphocyte fuctions. *Biochem. Soc. Trams* 1995; 23:302 309.

43. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids and cytokine production in health and disease. *Ann Nutr Metab* 1997; 41:203-234.
44. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammation, and immunity. *Lipids* 2001; 36:1007-1024.
45. Calder PC and Newsholme, E.A. Polyunsaturated fatty acids suppress human peripheral blood lymphocyte proliferation and interleukin-2 production. *Clin. Sci.* 1992; vol 82 (6), p. 695-700.
46. Calder PC et Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr* 2002 ; 56 Suppl 3:S14-19.
47. Calder PC et Newsholme EA. Polyunsaturated fatty acids suppress human peripheral blood lymphocyte proliferation and interleukin-2 production. *Clin Sci (Lond)* 1992; **82**:695-700.
48. Calder PC, Bevan SJ, Newsholme EA. The inhibition of T-lymphocyte proliferation by fatty acids is via an eicosanoid-independent mechanism. *Immunology* 1992; 75:108-115.
49. Calder PC, Yaqoob p, Thies FA, Miles EA. Fatty acids and lymphocyte functions. *Br.J.Nutr* 2002; 87 (Suppl 1):31-189.
50. Calviello G, Palozza P, Piccioni E, Maggiano N, Frattucci A, Franceschelli P and Bartoli GM. Dietary supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid inhibits growth of M.L. Hepatocarcinoma 3924A in rats: effects on proliferation and apoptosis. *Int J Cancer* 1998; 75: 699-705.
51. Carroll KK. Dietary fat and breast cancer. *Lipids* 1992; 27: 793-797.
52. Casabiel X, Pandiella A, Casanueva FF. Regulation of epidermal-growth-factor –receptor signal transduction by cis-unsaturated fatty acids. Evidence for a protein kinase C-independent mechanism. *Biochem. J* 1991 ; 278:679-687.
53. Cavallini L, Coassin M, Borean A, Alexandre A. Arachidonic acid activates a proton conductance pathway and the Na⁺/H⁺ exchanger in platelets. *Biochem.J* 1996; 319:567-574.
54. Chalon S, Vancassel S, Zimmer L, Guilloteau D and Durand G. Polyunsaturated fatty acids and cerebral function: focus on monoaminergic neurotransmission. *Lipids* 2001; 36: 937-944.
55. Chang HR, Dulloo AG, Vladoianu IR, Pigué PF, Arsenijevic D, Girardier L et Pechere JC. Fish oil decreases natural resistance of mice to infection with *Salmonella typhimurium*. *Metabolism* 1992 ; 41: 1-2.

56. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* 2001; 7:48-52.
57. Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signalling network. *Endocr Rev* 1995; 16(2):117-142.
58. Chen RH, Juo PC, Curran T et Blenis J. Phosphorylation of c-Fos at the C-terminus enhances its transforming activity. *Oncogene* 1996 ; 12:1493-1502.
59. Cher, DJ, Mosmann TR. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. *J Immunol* 1987, 138: 3688-3694.
60. Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, Mallat Z, Antonucci M, Poulain P, Chapman J, Fruchart JC, Tedgui A, Najib-Fruchart J, Staels B. CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferators-activated receptors. *Circulation* 2000; 101:2411-2417.
61. Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B. Activation of proliferators-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 1998; 273:25573-80.
62. Chow SC and Jondal, M. Polyunsaturated free fatty acids stimulate an increase in cytosolic Ca²⁺ by mobilizing the inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive Ca²⁺ pool in T cells through a mechanism independent of phosphoinositide turnover. *J. Biol. Chem* 1990; 265: 902-907.
63. Chung SW, Kang BY, Kim SH, Pak YK, Cho D, Trinchieri G, Kin TS. Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interaction between peroxisome proliferators –activated receptor-gamma and nuclear factor kappa B. *J Biol Chem* 2000; 275:32681-32687.
64. Civelek VN, Hamilton JA, Tornheim K, Kelly KI. Intracellular Ph in adipocytes: effects of free fatty acid diffusion across the plasma membrane, lipolytic agonists, and insulin. *Proc. Acad.Sci.USA* 1996; 93:10139-10144.
65. Clement K, Viguerie N, Poitou C, Carette C, Pelloux V, Curat CA, Rome S, Benis A, Zucker JD, Vidal H, Laville M, Barsh GS, Basdevant A, Stich V, Cancellato R, Langin D,

Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J* 2004; 18: 1657-1669.

66. Cobb MH; Boulton TG et Robbins DJ. Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress. *Cell Regul* 1991; 2:965-978.
67. Colley WC, Sung TC, Roll R, Jenco J, Hammond SM, Althuller y, Bar-sagi D, Morris AJ, Frhoman MA. Phosphopase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr. Biol* 1997; 7:191-201.
68. Colville-Nash PR, Qureshi SS, Willis D, Willoughby DA. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by peroxisome proliferators-activated receptor agonists: correlation with induction of heme oxygenase 1. *J Immunol* 1998; 161: 978-858.
69. Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, and Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp 30. *J Clin Invest* 2001; 108: 1875- 1881.
70. Coppack SW. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 2001; 60: 349-356.
71. Coso OA, Chiariello M, Kalinec G, Kyriakis JM, Woodgett J, Gutkind JS. Transforming G protein-coupled receptors potently activate JNK (SAPK). Evidence for a divergence from the tyrosine kinase signaling pathway. *J Biol Chem* 1995; 270:5620-4.
72. Coutinho A, Hori S, Carvalho T, Caramalho I and Demengeot J. Regulatory T cells: the physiology of autoreactivity in dominant tolerance and “quality control” of immune responses. *Immunol Rev* 2001;182, pp. 89–98.
73. Crabtree GR. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell* 1999; 96:611-614.
74. Cunard R, DiCampli D, Archer DC, Stevenson JL, RicoteM, Glass CK, Kelly CJ. WY14,643, a PPAR α ligand, has profound effects on immune responses in vivo. *J. Immunol* 2002; 169:6806.
75. Cunard R, RicoteM, DiCampli D, Archer DC, Kahn DA, Glass CK, Kelly CJ. Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors. *J. Immunol* 2002; 168:2795.

76. Cunard R, Dicampoli D, Archer DC, et al. WY14, 643, a PPAR alpha ligand, has profound effects on immune responses in vivo. *J Immunol* 2002 ; 169 : 6806-12.
77. Cunard R, Ricote M, Dicampoli D, et al. Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors. *J Immunol* 2002; 168: 2795-802.
78. Damm P, Kuhl C, Buschard K, Jakobsen BK, Svejgaard A, Sodoyez-Goffaux F, Shattock M, Bottazzo GF, Molsted-pedersen L. Prevalence and predictive value of islet- cell antibodies in women with previous gestational diabetes. *Diabetic Med* 1994; 11: 558-563.
79. Dandona P, Aljada A, bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 2004; 25:4-7.
80. Dandona P, Weinstock R, Thusu K, Abdel-Rahman E, Aljada A, Wadden T, and Tumor Necrosis Factor- α in sera of obese patients: Fall with Weight Loss. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 84:2907-2910.
81. Das UN. Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1999; 61:157-163.
82. Das UN. Tumorocidal action of cis-unsaturated fatty acids and their relationship to free radicals and lipid peroxidation. *Cancer Lett* 1991; 56: 235-243.
83. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000; 103:239-52.
84. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000; 103:239-52.
85. De Caterina R, Liano JK and Libby P. Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 213S-223S.
86. De Pablo et Alvarez de Cienfuegos G. Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. *Immunol. Cell Biol* 2000; 78: 31-39.
87. De Pablo MA, Ortega E, Gallego AM, Alvarez C, Pancorbo PL et Alvarez de Cienfuegos G. The effect of dietary fatty acid manipulation on phagocytic activity and cytokine production by peritoneal cells from Balb/c mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1998; 44:57-67.
88. Délaigle AM, Jonas JC, Bauche IB, Cornu O, Brichard SM. Induction of adiponection in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and studies. *Endocrinology* 2004; 145: 5589-5597.

89. Delerive P, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferators-activated receptors in inflammation control. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 169(3): 453-459. Review.
90. Delion S, Chalon S, Guilloteau D, Lejeune B, Besnard JC and Durand G. Age-related changes in phospholipids fatty acid composition and monoaminergic neurotransmission in the hippocampus of rats fed a balanced or an n-3 polyunsaturated fatty acid -deficient diet. *J Lipid Res* 1997; 38: 680-689.
91. Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J Biol Chem* 1994; 269:130560-13060.
92. Dennis EA. The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci* 1997; 22:1-2.
93. Denys A, Aires V, Hichami A, Khan NA. Thapsigargin-stimulated MAP kinase phosphorylation via CRAC channels and PLD activation: inhibitory action of docosahexaenoic acid. *FEBS Lett* 2004; 564: 177-82.
94. Denys A, Hichami A and Khan NA. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid modulate MAP kinase (ERK1/ERK2) signaling in human T cells. *J Lipid Res* 2001; 42: 2015-20.
95. Denys A, Hichami A, Khan NA. N-3 PUFAs modulate T-cell activation via protein kinase c-alpha and PKC-epsilon and the NF kappaB signalling pathway. *J Lipid Res* 2005; 46:752-758.
96. Denys A, Aires V, Hichami A, Khan NA. Thapsigargin-stimulated MAP kinase phosphorylation via CRAC channels and PLD activation: inhibitory action of docosahexaenoic acid. *FEBS Lett* 2004; 564: 177-82.
97. Desmedt M, Rottiers P, Doms H, Fiers W, Grooten J. Macrophages induce cellular immunity by activating Th1 cell responses and suppressing Th2 cell responses. *J Immunol* 1998; 160: 5300-5308.
98. Desvergne B and Wahli W. Peroxisome proliferators-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999; 20 : 649-88.
99. Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 1996; 384: 39-43.

100. Dhand R; Hiles I, Panayotou G, Roche S, Fry MJ, Gout I, Totty NF, Truong O, Vicendo P, Yonezawa K et al. PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. *EMBO J* 1994; 13:522-533.
101. Dhillon AS et Kolch W. Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Arch Biochem Biophys* 2002 ; 404:3-9.
102. Di Mario U, Dotta F, Garguilo P, Sutherland J, Adreani D, Guy K, Pachi A and Fallacca F. Immunology in diabetic pregnancy: Activated T-cells in diabetic mothers and neonates. *Diabetologia* 1987; 30: 66-71.
103. Diaz O, Berquand A, Dubois M, Di Agostino S, sette C, Bourgoïn S, Lagarde m, Nemoz G, Prigent AF. The mechanism of docosahexaenoic acid-induced phospholipase D activation in human lymphocytes involves exclusion of the enzyme from lipid rafts. *J. Biol. Chem* 2002; 277:39368-39378.
104. Diaz O, Mébarek-Azzam S, Benzaria M, Lagarde M, Némoz G, Prigent AF (2005). Disruption of lipid rafts stimulates phospholipase D activity in human lymphocytes: implication in the regulation of immune function. *J. Immunol* 175:8077-8086.
105. Diez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human and possible biological roles. *Eur J Endocrinol* 2003; 148: 293-300.
106. Downward J, Graves JD; Warne PH, Rayter S et Cantrell DA. Stimulation of p21ras upon T-cell activation. *Nature* 1990; 346:719-723.
107. Ebinu JO, Stang SL, Teixeira C, Bottorff DA, Hooton J, Blumberg PM, Barry M, Bleakley RC, Ostergaard HL et Stone JC. RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. *Blood* 2000; 95: 3199-3203.
108. Eckel RH, Insulin resistance: an adaptation for weight maintenance. *Lancet* 1992; 340(8833): 1452-1453.
109. Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, Giugliano G, Masella M, Marfella R, Giugliano D. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA* 2003; 289: 1799-1804.

110. Ettiger Jr. Why, Sun Who, Binkley N, Kouba E, Ershler W. Interleukin-6 cause's hypocholesterolemia in middle-aged and old rhesus monkeys. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1995; 50: M 137-M140.
111. Evers IM, de Valk HW and. Visser GH. Risk of complications of pregnancy in women with type 1 diabetes: nationwide prospective study in the Netherlands. *Br. Med. J* 2004; 328: 915-920.
112. Fan YY, McMurray DN, LY LH, Chapkin RS. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids remodel mouse T-cell lipid rafts. *J.Nutr* 2003 ;133:1913-1920.
113. Faris M, Kokot N, Lee L et Nel AE. Regulation of interleukin-2 transcription by inducible stable expression of dominant negative and dominant active mitogen-activated protein kinase kinase kinase in jurkat T cells. Evidence for the importance of Ras in a pathway that is controlled by dual receptor stimulation. *J Biol Chem* 1996; 271:27366-27373.
114. Favier JC; Feinberg M et Ireland-Ripert J. Répertoire général des aliments -Tables de composition. *Ta* 2000.
115. Fernandez-Real JM, Vendrell J, Ricart W, Broch M, Guitierrez C, CasaminitjanaR, Oriola J, Richard C. Polymorphism of the tumor necrosis factor-alpha receptor 2 gene is associated with obesity, leptin levels, and insulin resistance in young subjects and diet-treated type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2000; 23: 831-837.
116. Filaci G, Bacchetta R et Zanetti M. Is there a role for NK cells in the pathogenesis of multiple sclerosis? A case study. *Hum Immunol* 1999. 60:231-238.
117. Fortin PR, Lew RA, Liang MH, Wright EA, Becket LA, Chalmers TC and Sperling RI. Validation of a meta-analysis: the effects of fish oil in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Epidemiol* 1995; 48: 1379-1390.
118. Franson R, Raghupathi R, Fry M, Saal J, Vishwanath B, Ghosh SS, Rosenthal MD. Inhibition of human phospholipases A2 by cis-unsaturated fatty acids and oligomers of prostaglandin B1. *Adv.Exp.Med.Biol* 1990. 279:219-230.
119. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 847-850.

120. Fritsche K. Fatty acids as modulators of the immune response. *Annu. Rev. Nutr* 2006; 26:45-73.
121. Frohman MA, Sung TC, Morris AJ. Mammalian phospholipase D structure and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1439:175-186.
122. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbel-Reed D, Erickson MR, Bihain BE, Lodish HF. Proteolytic cleavage product of 30-KDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(4): 2005-2010.
123. Fukuda M, Gotoh I, Adachi M, Gotoh Y et Nishida E. A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Role of nuclear export signal of MAP kinase kinase. *J Biol Chem* 1997; 272:32642-32648.
124. Fumeron F, Brigant L, Ollivier V, de Prost D, Driss F, Darcet P, Bard JM, Parra HJ, Fruchart JC and Apfelbaum M. n-3 polyunsaturated fatty acids raise low-density lipoproteins, high-density lipoprotein 2, and plasminogen-activator inhibitor in healthy young men. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 118-122.
125. Funahashi T, Nakamura T, Shimomura I, Maeda K, Kuriyama H, Takahashi M, Arita Y, Kihara S, Matsuzawa Y. Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. *Intern Med* 1999; 38(2): 202-206.
126. Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, Handman E, McFarlane C, Nicola NA, Alexander WS, Hilton DJ, Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 24564-14568.
127. Garrity PA, Chen D, Rothenberg EV et Wold BJ. Interleukin-2 transcription is regulated in vivo at the level of coordinated binding of both constitutive and regulated factors. *Mol Cell Biol* 1994; 14:2159-2169.
128. Gasic S, Tian B, and Green A. Tumor necrosis factor- α stimulate lipolysis in adipocytes by decreasing Gi protein concentrations. *J Biol Chem* 1999; 274: 6770-6775.
129. Giordano C. Immunobiology of normal and diabetic pregnancy. *Immunol. Today* 1990; 11: 301-303.

130. Gocke AR, Hussain RZ, Yang Y, Peng H, Weiner J, Ben LH, PD, Drew O. Stuve, A.E. Lovett-Racke, M.K. Racke.. Transcriptional modulation of the immune response by peroxisome proliferator-activated receptor- α agonists in autoimmune disease. *J Immunol* 2009; 182: 4479-87.
131. Goldyne ME, Burrish GF, Poubelle P et Borgeat P. Arachidonic acid metabolism among human mononuclear leukocytes. Lipoxygenase-related pathways. *J Biol Chem* 1984; 259: 8815-8819.
132. Goodwin JS et Ceuppens J. Regulation of the immune response by prostaglandins. *J Clin Immunol* 1983 ; 3:295-315.
133. Guerre-Millo M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab* 2004; 30: 13-19.
134. Gulbins E, Coggeshall KM, Langlet C; Baier G, Bonnefoy-Berard N, Burn P, Wittinghofer A; Katzav S et Altman A. Activation of Ras in vitro and in intact fibroblasts by the Vav guanine nucleotide exchange protein. *Mol Cell Biol* 1994; 14:906-913.
135. Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Bostwick DG et Mukhtar H. Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate* 2000; 42: 73-78.
136. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995; 269: 543-546.
137. Hammond SM, Altshuller YM, Sung TC, Rudge SA, Rose K, Engebrecht J, Morris AJ, Frohman MA. Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *J. Biol. Chem* 1995; 270: 29640-29643.
138. Hansen AE, Haggard ME, Boelsche AN, Adam DJ, Adam DL, Wiese HF. Essential fatty acids in infant nutrition III: clinical manifestations of deficiency. *J. Nutr* 1958; 66:565-576.
139. Harris RB. Leptin much more than a satiety signal. *Annu Rev Nutr* 2000; 20: 45-75.
140. Hauner H, Petruschke T, Russ M, Rohrig K, Eckel J. Effects of tumor necrotic factor- α (TNF- α) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. *Diabetologia* 1995; 38: 764-771.

141. Hirai SI, Ryseck RP, Mechta F, Bravo R et Yaniv M. Characterization of junD: a new member of the Jun proto-oncogene family. *EMBO J* 1989; 8:1433-1439.
142. Ho IC, Glimcher LH. Transcription: tantalizing times for T cells. *Cell* 2002 (109); S109.
143. Hori S, Nomura T and Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299 2003; pp. 1057–1061.
144. Horrobin DF. The membrane phospholipids hypothesis as a biochemical basis for the neurodevelopmental concept of schizophrenia. *Schizophr Res* 1998; 30: 193-208.
145. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; 95: 2409-2415.
146. Hotamisligil GS, Budavari Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . *J Clin Invest* 1994; 94: 1543-1549.
147. Hotamisligil GS, Shargill NS, and Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259: 259-91.
148. Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensibility during the progression of type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 2001; 50: 1126-1133.
149. Hunkar T, Aktan F, Ceylan A and Karasu C. Antioxidants in Diabetes-Induced Complications (ADIC) Study Group. Effects of cod liver oil on tissue antioxidant pathways in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Cell Biochem Funct* 2002; 20: 297-302.
150. Hurley TR, Hyman R et Sefton BM. Differential effects of expression of the CD45 tyrosine protein phosphatase on the tyrosine phosphorylation of the lck, fyn, and c-src tyrosine protein kinases. *Mol Cell Biol* 1993; 13:1651-1656.
151. Husain S, Jafri F. prostaglandin F (2 α) stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1. *Biophys. Res. Commun* 2002; 297:1102-1107.
152. Hwang D. Essential fatty acids and immune response. *FASEB J* 1989; 3:2052-2061.

153. Hwang D, Scollard D, Byrne J et Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 455-460.
154. Hwang SC, Jhon DY, Bae YS, Kim JH, Rhee SG. Activation of phospholipase C-gamma by inositol action of tau proteins and arachidonic acid. *J. Biol. Chem* 1996; 271: 18642-18349.
155. Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*. 1997; 275:90-4.
156. Irvine RF, Letcher AJ, Dawson RM. Fatty acid stimulation of membrane phosphatidylinositol hydrolysis by brain phosphatidylinositol phosphodiesterase. *Biochem.J* 1979; 178:497-500.
157. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990; 347: 645.
158. Izquierdo M, Downward J, Graves JD et Cantrell DA. Role of protein kinase C in T-cell antigen receptor regulation of p21ras: evidence that two p21ras regulatory pathways coexist in T cells. *Mol Cell Biol* 1992; 12:3305-3312.
159. Jain J, Loh C et Rao A. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 333-342.
160. Jaramillo A, Gill BM and Delovitch TL. Insulin dependent diabetes mellitus in the non-obese diabetic mouse: a disease mediated by T cell anergy? *Life Sci* 1994; 55: 1163-1177.
161. Jeffery NM, Yaqoob P, Newsholme EA et Calder PC. The effects of olive oil upon rat serum lipid levels and lymphocyte functions appear to be due to oleic acid. *Ann Nutr Metab* 1996; 40: 71-80.
162. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998; 391: 82-86.
163. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; 298: 1911-2.
164. Jones DC, Ding X, Daynes RA. Nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) is expressed in resting murine lymphocytes. The PPARalpha in T and B

- lymphocytes is both transactivation and transrepression competent. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 6838-45
165. Joulain C, Garpenster G. The regulation of phospholipase γ 1: regulation of enzyme function and role in growth factor-dependent signal transduction. *Cytokine Growth Rev* 1993 8:109-117.
166. Jpenberg I, Jeannin AE, Wahli W, Desvergne B. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA: a functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J. Biol. Chem* 1997; 272: 20108.
167. Kageyama Y, Koide Y, Miyamoto S, Yoshida TO et Inoue T. Leukotrien B₄-induced interleukin-1 beta in synovial cells from patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1994; 23: 148-150.
168. Kambe T, Murakami M, Kudo I. Polyunsaturated fatty acids potentize interleukin-1-stimulated arachidonic acid release by cells overexpressing type IIa secretory phospholipase A₂. *FEBS Lett* 1999; 453: 81-84.
169. Kassi T, Ohguchi K, Nakashima S, Ito Y, Naganawa T, Kondo N, Nozawa Y. Increased activity of oleate-dependent type phospholipase D during actinomycin D-induced apoptosis in Jurkat T cells. *J. Immunol* 1998; 161: 6469-6474.
170. Kastrukoff LF, Morgan NG, Zecchini D, White R, Petkau AJ, Satoh J et Paty DW. A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1998; 86: 123-133.
171. Kauffmann-Zeh A, Rodriguez-Viciana P, Ulrich E, Gilbert C, Coffey P, Downward J et Evan G. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* 1997; 385: 544-548.
172. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simbsole RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 1995; 95:2111-2119.
173. Kersten S, Wahli W peroxisome proliferators activated receptor agonists. *EXE* 2000; 89/41-151.

174. Khan NA, Nishimura K, Aires V, Yamashita T, Oaxaca-Castillo D, Kashiwagi K, Igarashi K. Docosahexaenoic acid inhibits growth of mouse mammary cancer cells by interfering with p27/kip1, Cdk2, ERK1/ERK2 and retinoblastoma phosphorylation. *J Lipid Res* 2006; 47: 2306-2313.
175. Khan NA, Yessoufou A, Kim M, Hichami AN-3 fatty acids modulate TH1 and TH2 dichotomy in diabetics pregnancy and macrosomia. *J Autoimmun* 2006; 26(4): 268-277.
176. Kleeman R, Scott FW, Wörz-Pagentert U, Nimal Ratnayake WM, Kolb H. Impact of dietary fat on Th1/Th2 cytokine gene expression in the pancreas and gut of diabetes-prone BB rats. *J Autoimmun* 1998; 11: 97-03.
177. Klimiuk P.A, Goronzy J.J and Weyand C.M. Il-16 as an anti-inflammatory cytokine in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1999; 162: pp. 4293–4299.
178. Kodaki T, Yamashita S. Cloning expression, and characterization of a novel phospholipase D complementary DNA from rat brain. *J. Biol.Chem* 1997; 272: 11408-11413.
179. Kopp HP, Kopp CW, Festa A, Krzyzanowska K, Kriwanek S, Minar E Roka R, Schernthaner G. Impact of Weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients. *Arterioscler Thrombn Vasc Biol* 2003; 23: 1042-1047.
180. Kremer JM, Lawrence DA, Jubiz W, DiGiacomo R, Rynes R, Bartholomew LE et Sherman M. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 810-820.
181. Kromann N and Green A. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta Med Scand* 1980; 208: 401-406.
182. Kromhout D, Bosschieter EB, Lezenne Coulander C. The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N. Engl.J.Med* 1985; 312: 1205-1209.
183. Kromhout D. N-3 fatty acids and coronary heart disease: epidemiology from Eskimos to Western populations. *J Intern Med* 1989; 225: 47-51.

184. Kurata H, Lee HJ, O'garra A, Arai N. Ectopic expression of activated Stat6 induces the expression of Th2-specific cytokines and transcription factors in developing Th1 cells. *Immunity* 1999 ; 11 : 677-88.
185. Kyriakis JM, App H, Zhang XF, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR et Avruch J. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 1992; 358: 417-421.
186. Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*. 1994; 369:156-60.
187. La cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; 4/371-379.
188. Lacasa D, Taleb S, Keophiphath M, Miranvill A, Clement K Macrophages-secreted factor impair human adipogenesis: involvement of pro-inflammatory state in preadipocytes *endocrinology* 2006; 148(2): 868-877.
189. Lanier LL. The origin and functions of natural killer cells. *Clin Immunol* 2000; 95: S14-18.
190. Lapolla A, Sanzari MC, Znacano F, Masin M, Guerriero A, Piva I, Toniato R, Erle G, Plebani M and Fedele D. Study on lymphocyte subpopulation in diabetic mothers at delivery and in their newborns. *Diabetes Nutr. Metab* 1999; 12: 394-399.
191. Lauritzen L, Hansen HS, Jorgensen MMH and Michaelsen KF. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res* 2001; 40: 1-94.
192. Lewis RS et Cahalan MD. Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca²⁺ and transmembrane Ca²⁺ current in human leukemic T cells. *Cell Regul* 1989 ; 1:99-112.
193. Li M, Pascual G, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor γ -dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol. Cell. Biol* 2000; 20:4699.
194. Li Q, Wang M, Tan L, Wang C, Ma J, Li N, Li Y, Xu G, Li J. Docosahexaenoic acid changes lipid composition and interleukin-2 receptor signaling in membrane rafts. *J. Lipid Res* 2005; 46:1904-1913.
195. Liblau RS, Singer SM and McDevitt HO. Th1 and Th2 CD4⁺ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol. Today*. 1995; 16: 34-38.

196. Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti JB, Hissong BD, Nguyen V, Gadina M, Sher A, Paul WE, O'Shea JJ. T-bet is rapidly induced by interferon- γ in lymphoid and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 15137.
197. Lihn AS, Richelsen B, Pedersen SB, Haugaard SB, Rathje GS, Madsbad S, Andersen O. Increased expression of TNF-alpha, IL-6 AND IL-8 in HALS: implications for reduced adiponectin expression and plasma levels. *Am J physiol Endocrinol. Metab* 2003; 285:E1072-E1080.
198. Lin JX et Leonard WJ. The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene* 2000; 19:2566-2576.
199. Liu J. FK506 and cyclosporin, molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Immunol Today* 1993; 14:290-295.
200. Liz, Soloski MJ, Diehl AM. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 880-885.
201. Lopez-Botet M, Bellon T, Liano M, Navarro F, Garcia P, de Miguel M. Paired inhibitory and triggering NK cell receptors for HLA class I molecules. *Hum. Immunol* 2000 ; 61:7-17.
202. Lopez-Botet M, Bellon T, Llano M, Navarro F, Garcia P et de Miguel M. Paired inhibitory and triggering NK cell receptors for HLA class I molecules. *Hum Immunol* 2000 ; 61:7-17.
203. Lovett-Racke AE, Hussain RZ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists as therapy for autoimmune disease. *J Immunol* 2004 ; 172 : 5790-8.
204. Madani S, Hichami A, Cherkaoui-Malki M, Khan NA. Diacylglycerols containing Omega 3 and Omega 6 fatty acids bind to RasGRP and modulate MAP kinase activation. *J Biol Chem* 2004; 279 : 1176-83.
205. Madani S, Hichami A, Legrand A, Belleville J, Khan NA. Implication of acyl chain of diacylglycerols in activation of different isoforms of protein kinase C. *FASEB J* 2001; 15: 2595-601.
206. Marignani PA, Epand RM, Sebaldt RJ. Acyl chain dependence of diacylglycerol activation of protein kinase C activity in Vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2004; 225:469-473.
207. Martin A. Apports Nutritionnels Conseillés Conseillés la population française, Afssa, Cnerma-CNRS, Ed. *Tec&Doc* 2001.

208. Maruyama S, Kato K, Kodama M, et al. Fenofibrate, a a peroxisome proliferator-activated receptor alpha activator, suppresses experimental autoimmune myocarditis by stimulating the interleukin-10 pathway in rats. *J Atheroscler Thromb* 2002; 9 : 87-92.
209. Marx N, Kehrle B, Kohlhammer K, et al. PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ Res* 2002 ; 90 : 703-10.
210. Matsuzaki J, Tsuji T, Imazeki I, Ikeda H, Nishimura T. Immunosteroid as regulator for Th1/Th2 balance: its possible role in autoimmune diseases. *Autoimmunity* 2005; 38: 369-375.
211. Mattioli B, Straface E, Quaranta MG, Giordani L, Viora M. Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for the priming. *J Immunol* 2005; 174 68206-6825.
212. Max N, Kehrle B, Kohlhammer K, Grub M, Koenig W, Hombach V, Libby P, Plutzky J. PPARalpha activators as anti-inflammatory mediators in human T lymphocytes implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis *Circ Res* 2002; 90(6): 703-710.
213. Mayser P, Grimm H et Grimminger F. n-3 fatty acids in psoriasis. *Br J Nutr* 2002; 87 (Suppl 1): S77- S82.
214. McDermott M, Wakelam MJO, Morris AJ. Phospholipase D. *Biochem. Cell Biol* 2004; 82: 225-253.
215. McDermott MF. TNF and TNFR biology in health and Disease: cell *Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2001; 47: 619-635.
216. Meller M, Qiu C, Vadachkoria S, Abetew DF Luthy DA ;Williams MA, changes in placental adipocytokine gene expression associated with gestational diabetes mellitus. *Physiol Res* 2006; 55(5): 501-512.
217. Merzouk H and Khan NA. Implication of lipids in macrosomia of diabetic pregnancy: can n-3 polyunsaturated fatty acids exert beneficial effects? *Clin Sci* 2003; 105: 519-529.
218. Michalik L, Desvergne B, Dreyer C, Gavillet M, Laurini RN and Wahli W. PPAR expression and function during vertebrate development. *Int J Dev Biol* 2002; 46:105-114.

219. Miles EA, Calder PC. Modulation of immune function by dietary fatty acids. *Proc. Soc* 1998; 57:277-292.
220. Mills GB, Cheung RK, Grinstein S et Gelfand EW. Increase in cytosolic free calcium concentration is an intracellular messenger for the production of interleukin 2 but not for expression of the interleukin2 receptor. *J Immunol* 1985; 134: 1640-1643.
221. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin, JS, Klein S, Coppel SW. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6 but not tumor necrosis-alpha *in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4196-4200.
222. Mohanty P, Hamouda W , Garg R, Aljada A , Ghanim H, Dandona P. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2970-2973.
223. Morris AM, Sennello JA, Fayad RA, Eckel RH, Dinarello CA, Fantuzzi G. T cell-mediated hepatic inflammation modulates adiponectin levels in mice: role of tumor necrosis factor alpha. *Metabolism* 2006; 55: 555-559.
224. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986, 136: 2348-2357.
225. Mueller DL; Jenkins MK et Schwartz RH. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:445-480.
226. Müller A, Schott-Ohly P, Dohle C and Gleichmann H. Differential regulation of Th1-type and Th2-type cytokine profiles in pancreatic islets of C57BL/6 and BALB/c mice by multiple low doses of streptozotocin. *Immunobiology* 2002; 205: 35-50.
227. Napolitani G, Acosta-Rodriguez EV, Lanzavecchia A, Sallusto F. Prostaglandin E2 enhances Th17 responses via modulation of IL-17 and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *Eur J Immunol* (2009); 39 1301-12.
228. Neuringer M, Connor WE, Lin DS, Barstad L and Luck S. Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 4021-4025.

229. Niedel JE, Kuhn LJ et Vandenberg GR. Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80:36-40.
230. Nishizuka Y. Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 1986; 258:607-614.
231. Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 1995; 9:484-496.
232. Nunes JA; Collette Y; Truneh A; Olive D et Cantrell DA. The role of p21ras in CD28 signal transduction: triggering of CD28 with antibodies, but not the ligand B7-1, activates p21ras. *J Exp Med* 1994; 180: 1067-1076.
233. Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, Bhattacharya D, Murphy TL, Sha WC, Murphy KM. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4 independent mechanism. *Immunity* 1998; 9: 745-55.
234. Owaki T, Asakawa M, Fukai F, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 induces Th1 differentiation via p38 MAPK/T-bet- and intercellular adhesion molecule-1/LFA-1/ERK1/2-dependent pathways. *J Immunol* 2006; 177: 7579-87.
235. Pacifico L, Di renzo L, Anania C, Oshborn JF, Ippoliti F, Schiavo E, Chiesa C. Increased T-helper interferon-gamma-secreting cells in obese children. *Eur J Endocrinol* 2006; 154: 691-697.
236. Palacio A, Lopez M, Perez-Bravo F, Monkeberg F, Schlesinger L. Leptin levels is associated with immune response in malnourished infants. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3040-3046.
237. Papathanassoglou E, El-Haschimi K, Li XC, Matarese G, Strom T, Mantzoros C. Leptin receptor expression and signalling in lymphocytes: kinetics lymphocyte activation, role in lymphocyte survival, and response to high fat diet mice. *J Immunol* 2006; 176: 7745-7752.
238. Paul KP, Leichsenring M, Pfisterer M, Mayatepek E, Wagner D, Domann M; Sonntag HG et Bremer HJ. Influence of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on the resistance to experimental tuberculosis. *Metabolism* 1997; 46: 619-624.

239. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001; 22:153-83.
240. Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, Reitman ML, Hudson LD and Gonzalez FJ. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferators-activated receptor beta (δ). *Mol Cell Biol* 2000; 20: 5119-28.
241. Petitt TR, Wakelam MJ. Bombesin stimulates distinct time-dependent changes in the sn-1,2-diradylglycerol molecular species profile from swiss 3T3 fibroblasts as analysed by 3,5-dinitrobenzol derivatization and h.p.l.c separation. *Biochem.J* 1993; 289:487-495.
242. Pettitt DJ and Knowler WC . Long-term effects of the intrauterine environment, birth weight, and breast-feeding in Pima Indians. *Diabetes Care* 1998 ; 21: B138-41.
243. Platel K and Srinivasan K. Plant foods in the management of diabetes mellitus: vegetables as potential hypoglycaemic agents. *Nahrung* 1997; 41: 68-74.
244. Polit L, Rotstein N and Carri N. Effects of docosahexaenoic acid on retinal development: cellular and molecular aspects. *Lipids* 2001; 36: 927-935.
245. Pond CM. Adipose tissue and the immune system. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005; 73: 17-30.
246. Powrie F, Leach M.W, Mauze S, Caddle L.B and Coffman R.L. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C B17 scid mice. *Int Immunol* 5 (1993); pp. 1461–1471.
247. Prichard BN, Smith CC, Lig KL and Betteridge DJ Fish oils and cardiovascular disease. *Brit Med J* 1995; 310: 819-820.
248. Prins JB, Niesler CU, Winterford CM, Bright NA, Siddle K, O’Rahilly S, Walker NI, Cameron DP. Tumor necrosis factor- α induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes* 1997; 46: 1939-1944.
249. Rabinovitch A. Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes* 1994; 43: 613-621.

250. Raghupathy R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin. Immunol* 2001; 13: 219-327.
251. Randak C, Brabletz T, Hergenrother M, Sobotta I et Serfling E. Cyclosporin A suppresses the expression of the interleukin 2 gene by inhibiting the binding of lymphocyte-specific factors to the IL-2 enhancer. *EMBO J* 1990; 9:2529-2536.
252. Randriamampita C et Tsien RY. Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx. *Nature* 1993; 364: 809-814.
253. Rayner DV, Trayhum P. Regulation of leptin production: sympathetic nervous system interactions. *J Mol Med* 2001; 79:8-20.
254. Raza H, Ahmed I, John A and Sharma AK Modulation of xenobiotic metabolism and oxidative stress in chronic streptozotocin-induced diabetic rats fed with *Momordica charantia* fruit extract. *J. Biochem. Mol. Toxicol* 2001; 14: 131-139.
255. Raza H, Ahmed I, Lakhani MS, Sharma AK, Pallot D and Montague W. Effect of bitter melon (*Momordica charantia*) fruit juice on the hepatic cytochrome P450-dependent monooxygenases and glutathione S-transferases in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem. Pharmacol* 1996; 52: 1639-1642.
256. Razzaq TM, Ozegbe P, Jury EC, Sembi P, Blackwell NM, Kabouridis PS. Regulation of T-cell receptor signalling by membrane microdomains. *Immunology* 2004; 113: 413-426.
257. Reddy BS, Burill C and Rigotty J Effect of diets high in omega-3 and omega-6 fatty acids on initiation and postinitiation stages of colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1991; 51: 487-491.
258. Rengarajan J, Szabo SJ and Glimcher LH. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol. Today* 2000; 21: 479-483.
259. Rhee SG Regulation of phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem* 2001; 70:281-312.
260. Ricote M, Huang J, Li A, Welch J, Najil J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass GK. Expression of the peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:7614-7619.

261. Robbins DJ, Zhen E, Owaki H, Vanderbilt CA, Ebert D, Geppert TD et Cobb MH. Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 *in vitro*. *J Biol Chem* 1993; 268: 5097-5106.
262. Roder JC et Klein M. Target-effector interaction in the natural killer cell system. IV. Modulation by cyclic nucleotides. *J Immunol* 1979; 123: 2785-2790.
263. Rodgers W, Crise B, Rose JK. Signals determining protein tyrosine kinase and glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein targeting to a glycolipid enriched membrane fraction. *Mol. Cell. Biol* 1994; 14:5384-5391.
264. Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD et Downward J. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 1994; 370: 527-532.
265. Rola-Pleszczynski M; Gagnon L et Sirois P. Leukotriene B4 augments human natural cytotoxic cell activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1983 ; 113:531-537.
266. Roncarolo M.G, Bacchetta C, Bordignon C, Narula S and Levings M.K. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 182 (2001); pp. 68–79.
267. Roshk AK, Capper E, Stevenson C, Eichman C, Marshall LA. Human calcium-independent phosphopase A2 mediates lymphocyte proliferation. *J. Biol. Chem* 2000; 275:35692-35698.
268. Rotondo D, Earl CR, Laing KJ et Kaimakamis D. Inhibition of cytokine-stimulated thymic lymphocyte proliferation by fatty acids: the role of eicosanoids. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1223: 185-194.
269. Ruan H. Lodish HF. Regulation of insulin sensitivity by adipose tissue-derived hormones and inflammatory cytokines. *Curr Opin Lipidol* 2004; 15: 297-302.
270. Ryder K, Lanahan A, Perez-Albuerne E et Nathans D. Jun-D: a third member of the Jun gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 ; 86:1500-1503.
271. Sabapathy K, Wagner EF. JNK2: a negative regulator of cellular proliferation. *Cell Cycle*. 2004; 3: 1520-3.
272. Samad F, Uysal KT, Wiesbrock SM, Pandey M, Hotamisligil GS, Loskutoff DJ. Tumor necrosis factor is a key component in the obesity-linked elevation of plasminogen activator inhibitor I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96/ 66902-66907.

273. Sanchez-Muniz FJ; Bastida S; Viego JM and Terpstra AH. Small supplements of N-3 fatty acids change serum low density lipoprotein composition by decreasing phospholipid and apolipoprotein B concentrations in young adult women. *Eur J Nutr* 1999; 38: 20-27.
274. Sanderson P, Calder PC. Dietary fish oil appears to prevent the activation of phospholipase C- γ in lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; 1392:300-308.
275. Sartipy P, Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003. 100: 7265-7270.
276. Schobitz B, De Kloet ER, Sutanto W, Holsboer F. Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Eur J Neurosci* 1993; 5: 1426-1435.
277. Schwartz R, Teramo KA. Effects of diabetic pregnancy on the fetus and newborn. *Semin perinatol* 2000; 24(2): 120-135.
278. Sekiya F, Base YS, Jhon DY, Hwang SC, Rhee SG. AHNAK. A protein that binds and activates phospholipase C- γ 1 in the presence of arachidonic acid. *J. Biol. Chem* 1999; 274: 13900-13907.
279. Sergeeva M, Strokin M, Wang H, Uhl JJ, Reiser G. Arachidonic acid and docosahexaenoic acid suppress thrombin-evoked Ca^{2+} response in rat astrocytes by endogenous arachidonic acid liberation. *J. Neurochem* 2002; 82:1252-1261.
280. Serhan CN, Haegstrom JZ, Leslie CC. Lipid mediator networks in cell signalling: update and impact of cytokines. *FASEB J* 1996; 10: 1147-1037.
281. Shikano M; Masuzawa Y, Yazawa K, Kudo I, Inoue K. Complete discrimination of docosahexaenoate from arachidonate by 85 kDa cytosolic phospholipase A₂ during the hydrolysis of diacyl-sn-alkenylacylglycerophosphoethanolamine. *Biochim. Biophys Acta* 1994; 1212: 211-216.
282. Siczkowski E, Cohen FE, Bishop JM. A human gene (AHNAK) encoding unusually large protein with 1.2-micron polyionic rod structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 5472-5476.
283. Siddiqui RA, Jenks LJ, Neff K, Harvey K, Kovacs RJ and Stillwell W. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in Jurkat cells by a protein phosphatase-mediated process. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1499: 265-275.

284. Siegel I, Liu TL, Yaghoubzadeh E, Keskey TS and Gleicher N. Cytotoxic effects of free fatty acids on ascites tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 1987; 78: 271-277.
285. Siess W, Lapetina EG. Ca²⁺ and phorbol esters stimulate platelet aggregation and secretions synergistically through protein kinase C. *Biochem.J* 1988; 225: 309-318.
286. Soyland E, Nenseter MS, Braathen L et Drevon CA. Very long chain n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids inhibit proliferation of human T-lymphocytes in vitro. *Eur J Clin Invest* 1993; 23: 112-121.
287. Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 1998; 98: 2088-2093.
288. Staels B, Koenig W, Habib A., Merval R., Lebret M, Torra I P, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, et al. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR γ activators. *Nature* 1998; 393:790.
289. Staiger K, Stefan N, Staiger H, Brendel MD, Brandhorst D, Bretzel RG, Machicao F, Kellerer M, Stumvoll M, Fritsche A, Haring HU. Adiponectin is functionally active in human islets but does not affect insulin secretory function or beta-cell lipooptosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6707-6713.
290. Stefan N, Bunt JC, Salbe AD, Funahashi T, Matsuzawa Y, Tataranni PA. Plasma adiponectin concentration in children: relationships with obesity and insulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(10): 4652-4656.
291. Sternberg EM. The stress response and the regulation of inflammatory disease. *Ann Intern Med* 1992; 117: 854-866.
292. Stokoe D, Macdonald SG, Cadwallader K, Symons M, Hancock JF. Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* 1994; 264:1463-7.
293. Su B, Jacinto E, Hibi M, Kallunki T, Karin M et Ben-Neriah Y. JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* 1994 ; 77:727-736.
294. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000; 6: 655-69.
295. Thieringer R, Fenyk-Melody JE, Le Grand CB, Shelton BA, Detmers PA, Somers EP, Carbin L, Moller DE, Wrighr SD, Berger J . Activation of peroxisome proliferators-activated

- receptor gamma does not inhibit Il-6 or TNF- α response of macrophages to lipopolysaccharide in vitro or in vivo. *Immunol* 2000; 164: 1046-1054.
296. Thies F, Nebe-von-Caron G, Powell JR, Yaqoob P, Newsholme EA et Calder PC. Dietary supplementation with eicosapentaenoic acid, but not with other long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids, decreases natural killer cell activity in healthy subjects aged >55 y. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:539-548.
297. Trayhum P, Bing C, Woold IS. Adipose tissue and adipokines-energy regulation from the human perspective. *J Nutr* 2006; 136: 1935-1939.
298. Trayhum P, Wood IS. Adipokines inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004; 92: 347-355.
299. Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8:205-215.
300. Tsujii M, Kawano S et DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 ; 94: 3336-3340.
301. Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Zhang F, Teng L, Daly JM, Soslow RA, Masferrer JL, Woerner BM, Koki AT et Fahey TJ, 3rd. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 987-990.
302. Umlauf SW, Beverly B, Lantz O et Schwartz RH. Regulation of interleukin 2 gene expression by CD28 costimulation in mouse T-cell clones: both nuclear and cytoplasmic RNAs are regulated with complex kinetics. *Mol Cell Biol* 1995; 15:3197-3205.
303. Verwaerde C, Delanoye A, Macia L, Tailleux A, Wolowczuk I. Influence of high-fat feeding on both naïve and antigenexperienced T-cell immune response in DO10.11 mice. *Scand J Immunol* 2006; 64: 457-466.
304. Viardot A, Gery ST, Mackay F, Chisholm D. Potential anti-inflammatory role of insulin via the preferential polarization of effector T cells towards a T-helper 2 phenotype. *Endocrinology* 2007; 148(1): 346-353.
305. Vigneron A, Cherier J, Barre B, Gamelin E, Coqueret O. The cell cycle inhibitor p21 waf1 binds to the myc and CDC 25A promoters upon DNA damage and induces transcriptional repression. *J Biol Chem* 2006; 281: 34742-34750.

306. Voss A, Reinhart M, Sankarappa S, Sprecher H. The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *J. Biol. Chem* 1991; 266: 19995-20000.
307. Wallace FA, Miles EA, Evans C, Stock TE, Yaqoob P et Calder PC. Dietary fatty acids influence the production of Th1- but not Th2-type cytokines. *J Leukoc Biol* 2001; 69:449-457.
308. Wallenius K, Wallenius V, Sunter D, Dickson SL, Jansson JO. Intracerebroventricular interleukin-6 treatment decreases body fat in rats. *Bochem Bophys. Res Commun* 2002; 293: 560-565.
309. Weis M, Schlegel J, Kass GE, Holmstrom TH, Peters I, Eriksson J, Orrenius S and Chow SC. Cellular events in Fas/APO-2-mediated apoptosis in JURKAT T lymphocytes. *Exp Cell Res* 1995; 219: 699-708.
310. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AWjr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1796-1808.
311. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta T, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hyperinsulinemia in obesity and type2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia . *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(5): 1930-1935.
312. Wing K, Ekmark A, Karlsson H, Rudin A and Suri-Payer E. Characterization of human CD25+CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology* 106 (2002), pp. 190–199.
313. Winkler G, Cseh K, Baranyi E, Melczer Z, Speer G, Hajos P, Salamon F, Turi Z, Kovacs M, Vargha P, Karadi I. Tumour necrosis factor system in insulin resistance in gestational diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2002; 56: 93-99.
314. Woldman I, Varinou L, Ramsauer K, Rapp B et Decker T. The Stat1 binding motif of the interferon-gamma receptor is sufficient to mediate Stat5 activation and its repression by SOCS3. *J Biol Chem* 2001; 276: 45722-45728.
315. Wolf AM, Wolf D, Avila MA, Moschen AR, Berasain R, Enrich B, Rumpold H, Tilg H, Up-regulation of anti-inflammatory adipokine adiponectin in acute liver failure in mice. *J Hepatol* 2006; 44: 537-543.

316. Wolf CM, Reynolds JE, Morana SJ and Eastman A The temporal relationship between protein phosphatase, ICE/CED-3 proteases, intracellular acidification, and DNA fragmentation in apoptosis. *Exp Cell Res* 1997; 230: 22-27.
317. Wood SC, Rao TD and Frey AB. Multidose streptozotocin induction of diabetes in BALB/cBy mice induces a T cell proliferation defect in thymocytes which is reversible by interleukin-4. *Cell. Immunol* 1999; 192: 1-12.
318. Xu X, Star RA, Tortorici G et Muallem S. Depletion of intracellular Ca²⁺ stores activates nitric- oxide synthase to generate cGMP and regulate Ca²⁺ influx. *J Biol Chem* 1994; 269: 12645-12653.
319. Yamashita M, Ukai-Tadenuma M, Miyamoto T, Sugaya K, Hasegawa HA, Kimura M, Taniguchi M, DeGregori J, Nakayama T. Essential role of GATA3 for the maintenance of type 2 helper T (Th2) cytokine production and chromatin remodeling at the Th2 cytokine gene loci. *J Biol Chem* 2004; 279: 26983-90.
320. Yamashita N, Yokoyama A, Hamazaki T et Yano S. Inhibition of natural killer cell activity of human lymphocytes by eicosapentaenoic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 138: 1058-1067.
321. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin recerses insulin resistance associated with both lipopatropy and obesity. *Nat Med* 2001; 7(8): 941-946.
322. Yang XY, Wang LH, Chen T, et al. Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J Biol Chem* 2000; 275: 4541-4.
323. Yaqoob P et Calder PC. The effects of fatty acids on lymphocyte functions. *Int J Biochem* 1993; 25: 1705-1714.
324. Zang DH, Yang L, Cohn L, Parkyn L, omer R, Ray P, Ray A. Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity* 1999; 11: 473-82.

325. Zang DH, Yang L, Ray A. Differential responsiveness of the IL-5 and IL-4 genes to transcription factor GATA-3. *J Immunol* 1998; 161: 3817-3821.
326. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 2005; 15:11-8.
327. Zhang J, Zhang F, Ebert D, Cobb MH et Goldsmith EJ. Activity of the MAP kinase ERK2 is controlled by a flexible surface loop. *Structure* 1995; 3: 299-307.
328. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 2002; 12:9-18.
329. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-432.
330. Zheng W and Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for T2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997; 89: 587-596.
331. Zhou BB, Li H, Yuan J and Kirschner MW. Caspase -dependent activation of cyclin-dependent kinases during Fas- induced apoptosis in Jurkat cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6785-6790.
332. Zimmer L, Vancassel S, Cantagrel S, Breton P, Delamanche S, Guilloteau D, Durand G and Chalon S. The dopamine mesocorticolimbic pathway is affected by deficiency in n-3 polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2002; 75: 662-667.
333. Zoller KE, MacNeil IA et Brugge JS. Protein tyrosine kinases Syk and ZAP-70 display distinct requirements for Src family kinases in immune response receptor signal transduction. *J Immunol* 1997; 158: 1650-1659.

Résumé

Notre étude a montré l'implication de la déficience de PPAR α dans la modulation de la transcription des gènes de l'insuline et de l'inflammation des adipocytes chez les souris adultes C57BL/6J (WT) et PPAR α -null. A jeun, les souris PPAR α -null sont hypoglycémiques par rapport aux animaux témoins WT. La concentration en insuline et l'expression de ses ARNm pancréatiques, par rapport aux animaux témoins, sont diminuées chez les souris PPAR α -null, suggérant que la suppression du gène de PPAR α contribuait à la faible transcription de ces gènes. De plus, la suppression du gène de PPAR α aboutit à la diminution des facteurs de transcription des gènes de l'insuline comme Pdx-1, Nkx6.1 et MafA. En outre, la capacité pancréatique fonctionnelle est aussi détériorée par la suppression du gène de PPAR α puisque le pancréas des souris PPAR α -null exprime de faibles taux de Glut2 et de glucokinase. Les souris PPAR α -null expriment des taux élevés d'adiponectine et de leptine comparées aux souris témoins. Dans les tissus adipeux, les souris PPAR α -null présentent une augmentation de l'expression de CD14 et CD68 généralement exprimés par les macrophages. La suppression du gène de PPAR α diminue, au niveau des adipocytes, l'expression de MCP-1, TNF α , IL-1 β , IL-6 et RANTES, alors que l'expression de TLR-2 et de TLR-4 (récepteurs pro-inflammatoires) était élevée dans les tissus adipeux. Ces résultats suggèrent qu'en condition normale, la déficience en PPAR α , chez les souris est impliquée dans la modulation de la transcription des gènes de l'insuline et le statut inflammatoire du tissu adipeux.

En outre, l'inactivation du gène de PPAR α dans les cellules T a abouti à l'augmentation de T-bet et la diminution de GATA-3 tant aux niveaux de la protéine que de l'ARNm. Comme prévu, l'acide Docosahexaénoïque (DHA) a exercé non seulement un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules T, mais aussi a diminué la sécrétion d'IFN- γ et stimulé la sécrétion de l'IL-4 dans les deux types cellulaires. Le DHA a aussi diminué T-bet et augmenté GATA-3 tant au niveau de la transcription qu'au niveau de la protéine. Quoique les cellules T des souris PPAR α -null ont exprimé un plus fort niveau de phosphorylation de p38 MAP kinase que les cellules T de WT, le DHA a diminué la phosphorylation des MAP kinases (p38 et ERK1/2) dans tous les deux les types cellulaires. Les inhibiteurs pharmacologiques des MAP kinases ont aussi diminué T-bet et augmenté GATA-3 dans les cellules T. Ces résultats démontrent que le DHA, via son action sur les MAP kinases, module l'expression des facteurs de transcription. Ces résultats expliquent aussi le mécanisme d'action de cet acide gras sur la différenciation des cellules T dans la maladie et la santé.

Mots clés: Souris PPAR α -Insuline-Tissu adipeux-Inflammation-AGPI n-3-Cellules T-MAPK.

Abstract

We, therefore, assessed, in this study, the effects of PPAR α deficiency on the expression of mRNA encoding for the insulin gene transcription factors in pancreatic β -cells along with those implicated in inflammation in adipose tissues. On fasting, the adult PPAR α -null mice were hypoglycemic. Serum insulin concentrations and its pancreatic mRNA transcripts were downregulated in PPAR α -null mice, suggesting that PPAR α gene deletion contributes to low insulin gene transcription. The PPAR α gene deletion downregulates the mRNA expression of insulin gene transcription factors, i.e., Pdx-1, Nkx6.1, and MafA. Besides, the pancreatic function was diminished by PPAR α deficiency as PPAR α -null mice expressed low pancreatic Glut2 and glucokinase mRNA. PPAR α -null mice also expressed high adiponectin and leptin mRNA levels compared to wild type animals. Adipose tissues of PPAR α -null mice exhibited upregulation of CD14 and CD68 mRNA, generally expressed by macrophages. PPAR α gene deletion downregulates the adipocyte mRNA of certain pro-inflammatory agents, like MCP-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6, and RANTES, though pro-inflammatory TLR-2 and TLR-4 mRNAs were upregulated in the adipose tissues. Our results suggest that PPAR α deficiency, in mice, is implicated in the modulation of insulin gene transcription and inflammatory status in adipose tissues. The present study was conducted on CD4⁺ T cells, isolated from wild type (WT) and PPAR α -null mice, in order to assess the mechanism of action of docosahexaenoic acid (DHA), an n-3 fatty acid, in the modulation of two transcription factors, i.e., T-bet and GATA-3, implicated in T-cell differentiation towards, respectively, TH1 and TH2 phenotype. The T-cells from PPAR α -null mice secreted higher IFN- γ and lower IL-4 concentrations than WT T-cells. Furthermore, the deletion of PPAR α gene in T-cells resulted in the upregulation of T-bet and downregulation of GATA-3 both at mRNA and protein levels. DHA exerted not only an inhibitory effect on T-cell proliferation, but also diminished IFN- γ and stimulated IL-4 secretions in both cell types. DHA also downregulated T-bet and upregulated GATA-3 both at transcription and protein levels. Though the T-cells from PPAR α -null mice expressed higher p38 phosphorylation than WT T-cells, DHA diminished the MAP kinase phosphorylation (p38 and ERK1/2) in both the cell types. The pharmacological inhibitors of MAP kinases also downregulated T-bet and upregulated GATA-3 in T-cells. Altogether, these results demonstrate that DHA, via its action on MAP kinases, modulates the expression of transcription factors. These results also explain the mechanism of action of this fatty acid on T-cell differentiation in disease and health.

Keywords: Mouse PPAR α -Insulin-Adipose tissue-Inflammation- Fatty acids- T-cells- MAPK