HAL
open science

Peptides antimicrobiens : un lien entre l'immuno-inflammation et les facteurs de risque du syndrome métabolique et des maladies cardiovasculaires

Hamanou Benachour

▶ **To cite this version:**

Hamanou Benachour. Peptides antimicrobiens : un lien entre l'immuno-inflammation et les facteurs de risque du syndrome métabolique et des maladies cardiovasculaires. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2010. Français. NNT : 2010NAN10012 . tel-01748661

HAL Id: tel-01748661

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748661

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Nancy-Université
Université Henri Poincaré

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I
2009

ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT »
UFR de Pharmacie

THESE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I

Mention « Sciences de la Vie et de la Santé »

Présentée et soutenue publiquement

par **Hamanou BENACHOUR**

Le 5 Février 2010

Peptides antimicrobiens : un lien entre l'immuno-inflammation et les facteurs de risque du syndrome métabolique et des maladies cardiovasculaires

MEMBRES DU JURY

Président :

Chantal FINANCE Professeur, Nancy-France

Examinateurs :

Mohamed ZAIOU Docteur (HDR), Nancy-France (*Directeur de thèse)*
Sophie VISVIKIS-SIEST Directeur de recherche, Nancy-France
Giuseppina CALIGIURI Directeur de recherche, Paris-France

Rapporteurs :

Djamel DRIDER Docteur (HDR), Nantes-France
Marie-Hélène METZ-BOUTIGUE Directeur de recherche, Strasbourg-France

Laboratoire EA 4373 « Génétique Cardiovasculaire »
Nancy-Université, Faculté de Pharmacie, 30 rue Lionnois, 54000 Nancy

A mes parents

A mes Sœurs

A mes Frères

Remerciements

A Monsieur le **docteur Mohamed Zaiou**, pour m'avoir encadré et soutenu tout au long de ces années de thèse et pour ses conseils scientifiques.
Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

A Madame le **docteur Sophie Visvikis-Siest**, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

A Madame le **docteur Marie-Hélène Metz-Boutigue** et à Monsieur le **docteur Djamel Drider**, auxquels j'adresse mes plus profonds remerciements pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mon mémoire de thèse.

A Madame le **professeur Chantal Finance** et à Madame le **docteur Giuseppina Caligiuri**, pour avoir accepté d'honorer ce travail en étant juges. Qu'elles trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements.

Je tiens à remercier Biologie Prospective, L'INSERM et la Société Française de Cardiologie pour m'avoir allouée une bourse de thèse qui m'a permis la réalisation de ce projet.

Merci aux membres du Programme PluriFormation (PPF) - Biomarqueurs du Vieillissement - de Nancy-Université/CHU Brabois pour les échanges scientifiques que nous avons pu avoir pendant deux années de collaboration, et à toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer de près ou de loin tout au long de ces années de thèse.

Merci à Bernard Herbeth pour l'aide apportée, en particulier en statistique, au long de ce travail. Merci à Michèle Pfister, Daniel Lambert, Christine Masson, pour leur soutien si précieux, en particulier sur les plans technique et méthodologique.

Merci à tous les membres de l'équipe « Génétique Cardiovasculaire », présents et passés, pour les échanges scientifiques et humains si sympathiques que nous avons pu avoir. Merci plus particulièrement à : Patricia, Brigitte, Shu Min, Christine, Michèle, Suzanne, Annie, Sébastien, Daniel, Bernard, …

Merci à Sébastien et Virginie pour leur soutien si précieux. Une pensée toute particulière leur est vouée.

Merci aux ami(e)s qui m'ont soutenu moralement, de près ou de loin, dans l'accomplissement de ce travail.

Enfin, un immence merci à mes parents, mes frères, mes sœurs et à toute ma famille qui m'ont soutenu tout au long de mes études et jusqu'à aujourd'hui. C'est aussi grace à eux !

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1 : Les différents récepteurs TLR reconnaissent des motifs microbiens spécifiques et participent à l'activation des réponses immunitaires innées et adaptatives.

Figure 2 : Représentation shématique en roue hélicoïdale d'une séquence d'un peptide cationique (la cathélicidine humaine LL-37).

Figure 3 : Schéma de la structure secondaire d'un peptide linéaire comme la magainine 2 et d'un peptide cyclique comme la défensine α-3 humaine.

Figure 4 : Structure secondaire d'un peptide en hélice-α.

Figure 5 : Structure secondaire d'un peptide linéaire non structuré.

Figure 6 : Structure des peptides cycliques à ponts disulfure.

Figure 7 : Schéma de synthèse et libération des défensines-α des granules de stockage des neutrophiles humains.

Figure 8 : Modèle de Shai-Matsuzaki-Yang expliquant le mode d'action des peptides antimicrobiens.

Figure 9 : Schéma des relations spécifiques entre peptide antimicrobien et les membranes d'organismes pluricellulaires animaux et des bactéries.

Figure 10 : Représentation schématique d'un précurseur de peptides antimicrobiens.

Figure 11 : Alignement de séquences des défensines-α humaines.

Figure 12 : Structure cyclique de la défensine-θ-1 des macaques Rhésus.

Figure 13 : Organisation schématique des gènes et peptides des défensines.

Figure 14 : Schéma représentant le précurseur de la cathélicidine humaine et la libération protéolytique du peptide actif, LL-37.

Figure 15 : Représentation schématique de l'organisation génomique et peptidique de la cathélicidine humaine hCAP18/LL-37.

Figure 16 : Fonctions multiples des peptides antimicrobiens (AMPs) dans la défense de l'organisme et dans les processus biologiques associés.

Figure 17 : Recrutement et activation des macrophages et formation des lésions d'athérosclérose.

Figure 18 : Schéma résumant les interactions entre le tissu adipeux et le système immuno-inflammatoire durant l'obésité et ses complications.

Figure 19 : Accumulation des défensines-α au niveau des lésions artérielles d'athérosclérose.

Figure 20 : Surexpression de LL-37 dans des lésions athérosclérotiques.

Figure 21 : Propositions de différents mécanismes à travers lesquels les défensines affecteraient l'homéostasie vasculaire.

Figure 22 : La cathélicidine LL-37/hCAP-18 pourrait affecter les fonctions vasculaires par de nombreux mécanismes.

Figure 23 : Les défensines stimulent la fixation (A) et l'internalisation (B) des lipoprotéines (a) [Lp (a)] par les cellules vasculaires endothéliales et musculaires lisses.

Figure 24 : Fixation des défensines et des complexes défensine-Lp(a) sur la matrice des cellules vasculaires endothéliales.

Figure 25 : Schéma de l'organisation transmembranaire du récepteur FPR humain.

Figure 26 : Organisation schématique des gènes des récepteurs FPRs humains sur le chromosome 19q13.4.

Figure 27 : Principaux polymorphismes identifiés dans le gène *FPR1.*

MATERIEL ET METHODES

Figure 28 : Courbe standard pour le dosage de LL-37 par ELISA.

Figure 29 : Courbe de fusion.

Figure 30 : Gamme étalon et droite de régression linéaire.

Figure 31 : Courbe de quantification.

Figure 32 : Profil de restriction du polymorphisme *FPR1 c.32C>T* sur gel de polyacrylamide 10%.

Figure 33 : Chromatogramme des fragments de restriction en fonction du génotype *FPR1 c.32C>T.*

Figure 34 : Schéma du système de co-culture.

Figure 35 : Profil d'électrophorèse des produits de PCR des *DEFA1-3* sur gel de polyacrylamide à 10 %.

RESULTATS ET DISCUSSION

Figure 36 : Expression des transcrits du gène de LL-37 selon le sexe.

Figure 37 : Expression des transcrits de LL-37 chez les hommes et les femmes en fonction des classes d'IMC.

Figure 38 : Corrélation entre le taux des transcrits et le taux des peptides de LL-37 dans les PBMCs.

Figure 39 : Corrélation entre le taux plasmatique de LL-37 et son taux de transcrits dans les PBMCs.

Figure 40 : Expression des transcrits des DEFA1-3 dans les PBMCs en fonction du sexe.

Figure 41 : Expression différentielle des ARNm des DEFA1-3 chez les sujets avec (n=28) et sans SM (n=150).

Figure 42 : Corrélation entre l'expression des transcrits de LL-37 et celle des transcrits du gène de FPR (FPR1) dans les PBMCs.

Figure 43 : Concentration de la E-sélectine circulante en fonction des génotypes de FPR1 c.32C>T dans l'échantillon étudié.

Figure 44 : Concentration de la E-sélectine circulante en fonction des génotypes de FPR1 c.32C>T après exclusion des sujets sous traitement médicamenteux.

Figure 45 : Profil d'expression des gènes *DEFA1-3* dans les lignées cellulaires HL-60 et U-937.

Figure 46 : Expression des ARNm de CD11b dans les cellules HL-60 traitées par 1,2 ou 1,3% de DMSO pendant le temps indiqué.

Figure 47 : Expression de *CD14* dans les cellules HL-60 traitées avec 100 nM de PMA pendant les durées indiquées.

Figure 48 : Régulation de l'expression des ARNm des DEFA1-3 dans les neutrophiles dérivés des cellules HL-60 par le glucose ou/et l'insuline.

Figure 49 : Coloration *Oil red O* des lipides dans les cellules 3T3-L1 en culture non différenciées (A) et après 7 jours de différenciation en adipocytes (B).

Figure 50 : Effet de la différenciation adipocytaire sur l'expression du gène de CRAMP dans les cellules 3T3-L1.

Figure 51 : Régulation de l'expression des ARNm de CRAMP dans les adipocytes 3T3-L1 par le glucose ou/et l'insuline.

Figure 52 : Expression de *CRAMP* dans les adipocytes 3T3-L1 traités ou non avec le milieu de culture conditionné par les macrophages U-937.

Figure 53 : Expression de *CRAMP* dans les adipocytes 3T3-L1 en co-culture avec les macrophages U-937 ou cultivés séparémment.

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

Tableau 1 : Principales classes de peptides antimicrobiens cationiques présentées selon la structure et la composition en acides aminés des peptides qu'elles regroupent.

Tableau 2 : Principales caractéristiques des défensines-α et -β humaines.

Tableau 3 : Liste des principaux agonistes des récepteurs FPRs.

MATERIEL ET METHODES

Tableau 4 : Critères de définition du syndrome métabolique selon NCEP-ATPIII (2001) et IDF (2005).

Tableau 5 : Séquences d'oligonucléotides et conditions d'amplification des gènes étudiés par RT-PCR semi-quantitative.

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 6 : Caractéristiques cliniques et biologiques des sujets de la cohorte STANISLAS ayant fait l'objet d'une étude d'expression du gène de LL-37 par RT-PCR en temps réel.

Tableau 7 : Corrélations entre les paramètres cliniques et biologiques et le taux des ARNm de LL-37 chez les hommes et les femmes.

Tableau 8 : Corrélations significatives ($p \leq 0,05$) entre le taux des ARNm de LL-37 et les paramètres cliniques et biologiques après analyse de régressions multiples et ajustement sur l'IMC et le tour de taille.

Tableau 9 : Taux d'expression des ARNm de LL-37 en fonction du syndrome métabolique.

Tableau 10 : Corrélations entre le taux des ARNm des DEFA1-3 et les paramètres cliniques et biologiques des 178 sujets de la cohorte STANISLAS, après ajustement sur l'âge et le sexe.

Tableau 11 : Corrélations partielles significatives ($p \leq 0,05$) entre le taux des ARNm des DEFA1-3 et les paramètres cliniques et biologiques après ajustement sur l'âge, le sexe, l'IMC et le tour de taille.

Tableau 12 : Corrélations entre le taux des ARNm de FPR et les paramètres cliniques et biologiques et les ARNm de LL-37 chez les hommes et les femmes.

Tableau 13 : Caractéristiques cliniques et biochimiques de l'échantillon des 325 sujets ayant fait l'objet de l'étude du polymorphisme *FPR1 c.32C>T*.

Tableau 14 : Fréquences génotypiques et allèliques du polymorphisme *FPR1 c.32C>T* dans l'échantillon étudié.

Tableau 15 : Association du polymorphisme *FPR1 c.32C>T* avec les indices inflammatoires et les molécules d'adhésion cellulaire.

ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AMPs	*Antimicrobial peptides*
ANOVA	*ANalyse Of Variance*
Apo	Apolipoprotéine
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ATCC	*American Type Cell Collection*
BPI	*Bactericidal/permeability-increasing protein*
BSA	*Bovin serum albumin*
C/EBP	*CCAAT/enhancer-binding protein*
CAMP	*Cathelicidin antimicrobial peptide*
CCR6	*CC chemokine receptor 6*
c-IAP-2	*Inhibitor apoptosis protein 2*
CRAMP	*Cathelin-related antimicrobial peptide*
CRP	*C-reactive protein (protein C-réactive)*
CVD	*Cardiovascular diseases*
DEFA1-3	Défensines-alpha 1, 2 et 3
DHPLC	*Denaturing High Pressure Liquide Chromatography*
DMSO	Dimethyl-sulfoxyde
dNTP	Désoxyribonucléotides triphosphates
EDTA	Ethylène diamine tetra acétate
EGFR	*Epidermal growth factor receptor*
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
ERK	*Extracellular signal-regulated kinases*
f-MLF	Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
FPR	*Formyl peptide receptor*
FPRL1	*FPR-like 1*
GGT	Gamma glutamyl transférase
HBD	*Human beta defensin*
hCAP18	*human cathelicidin antimicrobial peptide 18 kilo Dalton*
HD	*Human defensin*
HDL-C	*High density lipoprotein-cholesterol*
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique)
HL-60	*Human leukemia cells-60*
HNP	*Human neutrophil peptide*
ICAM-1	*Inter-cellular adhesion molecule 1*
IDF	*International diabetes federation*
IGF-BP3	*IGF-binding protein 3*
IGF-I	*Insulin-like growth factor I*
IL-	Interleukine-
IMC	Indice de masse corporelle
INT-α	Interféron-α
IP-10	*Interferon-gamma-inducible protein 10*
kDa	kilo Dalton
LBP	*LPS-binding protein*
LDL	*Low density lipoprotein*

LDL-C	*Low density lipoprotein-cholesterol*
LDL-R	*LDL receptor*
LL-37	Leucine leucine-37
Lp (a)	Lipoprotéine (a)
LPS	Lipopolysaccharides
LXA4	Lipoxine A4
MAPK	*Mitogen activated protein kinase*
MCP-1	*Monocyte chemoattractant protein 1*
MCV	Maladies cardiovasculaires
MIP-3α	*Macrophage inflammatory protein-3α*
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate (en forme réduite)
NCEP-ATPIII	*National Cholesterol Evaluation Program Adult-Treatment Panel III*
NF-IL-6	*Nuclear factor-interleukine-6*
NF-kB	*Nuclear factor-kappa B*
NK	*Natural killer*
NOD2	*Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*
PAD	Pression artérielle diastolique
PAI-1	*Plasminogen activator inhibitor 1*
PAS	Pression artérielle systolique
PBMCs	Cellules mononuclées du sang périphérique
PBS	*Phosphate buffered saline*
PCR-RFLP	*Polymerase Chaine Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
RANTES	*Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*
RCPG	Récepteur couplé aux proteins G
RT-PCR	*Reverse transcription-polymerase chain reaction*
SM	Syndrome métabolique
SNP	*Single nucleotide polymorphisme*
STANISLAS	Suivi Temporaire Annuel Non Invasif de la Santé de Lorrains Assurés Sociaux
STAT	*Signal transducer and activator of transcription*
TBE	Tris-borate- EDTA
TEAA	*Triéthyl ammonium acétate*
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGO	Transaminase glutamique oxalo-acétique
TGP	Transaminase glutamique pyruvique
TLR	*Toll like receptor*
TNF	*Tumor necrosis factor*
TNF-RII	*TNF-receptor II*
VCAM-1	*Vascular cell adhesion molecule-1*
VDR	*Vitamin D receptor*
VDR-RE	*VDR-response element*
VEGF	*Vascular endothelial growth factor*

RESUME

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont des affections immuno-inflammatoires chroniques qui sont liées à de nombreux facteurs de risque. Les défensines et les cathélicidines sont des peptides antimicrobiens considérés comme des effecteurs clés de l'immunité innée, mais aussi des réponses inflammatoires. Il a été postulé que ces peptides sont impliqués dans le développement de l'athérosclérose. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'expression des gènes de la cathélicidine LL-37 et des défensines-α DEFA1-3 dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) dans la cohorte Stanislas. Nous avons démontré que l'expression des ARNm de ces gènes est significativement corrélée avec les indicateurs de risque des MCV, à savoir l'obésité, la pression artérielle, les taux circulants des triglycérides et du glucose, l'hypo-HDL-C et les leucocytes. De plus, des taux élevés des ARNm de ces gènes sont associés au syndrome métabolique. Nous avons aussi démontré que l'expression des gènes des DEFA1-3 et de LL-37 est corrélée avec celle du récepteur chimio-attractant FPR et que le génotype TT du polymorphisme *FPR1 c.32C>T* est associé à une diminution des taux circulants de la E-sélectine, suggérant que ces peptides pourraient agir *via* FPR et que le polymorphisme *c.32C>T* affecte la fonction endothéliale. Enfin, nos études *in vitro* ont montré que l'expression des gènes des DEFA1-3 et de CRAMP, cathélicidine de la souris, est modulée par le glucose et l'insuline, respectivement dans les neutrophiles HL-60 et les adipocytes 3T3-L1. L'ensemble de ces études suggère que les DEFA1-3 et LL-37 pourraient constituer un lien entre le système immunitaire inné et le risque des MCV et du syndrome métabolique.

Mots clés : peptides antimicrobiens, défensines, cathélicidines, immunité innée, inflammation, risque cardiovasculaire, syndrome métabolique, FPR.

ANTIMICROBIAL PEPTIDES : A LINK BETWEEN IMMUNO-INFLAMMATION AND METABOLIC SYNDROME AND CARDIOVASCULAR DISEASE RISK FACTORS.

Hamanou Benachour, PhD thesis.

ABSTRACT

Multiple risk factors for atherosclerosis and cardiovascular diseases (CVD) act in a synergistic way through inflammatory pathways. Most of CVD risk factors stimulate the release of inflammatory mediators. Defensins and cathelicidins are antimicrobial peptides (AMPs) produced mainly by inflammatory cells. Beside their role in host defense, AMPs are also considered as effectors of inflammatory responses. They have been suggested to play a role in atherosclerosis. To verify this hypothesis, we studied α-defensins DEFA1-3 and cathelicidin LL-37 in a sample of the STANISLAS cohort. We demonstrated that mRNA levels of LL-37 and DEFA1-3 genes in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of studied subjects are significantly correlated with indicators of obesity, blood pressure, circulating triglycerides and fasting glucose levels, hypo-HDL-C, and leukocytes counts suggesting a role of these genes in CVD. Further analysis revealed that high expression of these genes might be associated with metabolic syndrome. We also showed that expression of LL-37 and DEFA1-3 genes was positively associated with that of *FPR* receptor gene and that the TT genotype of *FPR1 c.32C>T/I11T* polymorphism was significantly associated with decreased levels of soluble E-selectin suggesting that these peptides may act through this receptor and such a polymorphism may has an impact on endothelial cells function. In an *in vitro* model, we found that glucose and insulin modulate the expression of DEFA1-3 and CRAMP cathelicidin genes in human HL-60 neutrophils and mouse 3T3-L1 adipocytes cell lines, respectively. Together, our studies demonstrated that DEFA1-3 and LL-37 could be a potential link between innate immunity and CVD and metabolic syndrome.

Key words : antimicrobial peptides, defensins, cathelicidins, innate immunity, inflammation, cardiovascular risk, metabolic syndrome, FPR.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE **2**

INTRODUCTION **5**

I. Les peptides antimicrobiens en tant qu'éléments du système immunitaire **7**
I.1. Systèmes de défense immunitaire 7
I.2. Les peptides antimicrobiens 9
I.2.1. Définition 9
I.2.2. Structure et diversité 9
I.2.3. Sources et distributions 13
I.2.4. Mécanismes d'action des peptides antimicrobiens cationiques 14
I.3. Les peptides antimicrobiens chez l'Homme 19
I.3.1. La famille des défensines 20
I.3.2. La famille des cathélicidines 25
I.4. Rôle multifonctionnel des défensines et des cathélicidines 30
I.4.1. Neutralisation des endotoxines LPS 31
I.4.2. Défensines et cathélicidines en tant qu'effecteurs inflammatoires 31
I.4.3. Rôle dans la cicatrisation 33
I.4.4. Rôle dans l'angiogenèse 34
I.4.5. Rôle dans l'apoptose 34
I.5. Implication physiopathologique des défensines et des cathélicidines 36
I.5.1. Affections cutanées : psoriasis, dermatite atopique 36
I.5.2. Maladies gastro-intestinales inflammatoires (maladie de Crohn) 36
I.5.3. Les cancers 37

II. Peptides antimicrobiens et processus immuno-inflammatoire des maladies cardiovasculaires **38**
II.1. Définition et épidémiologie des maladies cardiovasculaires 38
II.2. Facteurs de risque cardiovasculaire 38
II.3. Physiopathologie cardiovasculaire 39
II.3.1. Athérosclérose et inflammation 39
II.3.2. Obésité, dyslipidémies, diabètes, hypertension artérielle, et inflammation 42
II.3.3. Le syndrome métabolique et l'immuno-inflammation 43
II.4. Défensines, cathélicidines et risque d'athérosclérose 45
II.4.1. Rôle des peptides antimicrobiens dans le métabolisme des lipides et des lipoprotéines 48
II.4.2. Dysfonctionnement vasculaire 50
II.4.3. Fibrinolyse 50
II.4.4. Angiogenèse 51
II.4.5. Diabètes 51

III. Récepteurs de molécules chimio-attractantes : « Formyl Peptide Receptors (FPRs) » . **53**
III.1. Description des récepteurs FPRs 53
III.2. Localisation cellulaire et tissulaire des récepteurs FPRs 55
III.3. Ligands des récepteurs FPR s 55
III.4. Polymorphismes génétiques des récepteurs FPRs 57

IV. Objectifs **58**

MATERIEL ET METHODES **63**

I. Etudes épidémiologiques **65**
I.1. Populations étudiées 65
I.1.1. Cohorte STANISLAS 65
I.1.2. Echantillons en provenance de l'Etablissement Français du Sang (EFS) 66
I.2. Paramètres cliniques et biologiques 67
I.2.1. Données médicales et cliniques 67
I.2.2. Prélèvements et dosages biologiques 68
I.3. Analyse de l'expression des protéines 70
I.3.1. Dosage des protéines totales contenues dans les PBMCs 70
I.3.2. Dosage de LL-37 72
I.4. Analyse transcriptomique 75
I.4.1. Isolement des cellules mononuclées du sang périphérique 75
I.4.2. Extraction, contrôle qualité et reverse transcription des ARN en ADN complémentaire 75
I.4.3. Quantification de l'expression des gènes par RT-PCR en temps réel 76
I.5. Génotypage du polymorphisme *FPR1* c.32C>T 82
I.5.1. Extraction de l'ADN génomique 82
I.5.2. PCR-RFLP 82

II. Modèles cellulaires **88**
II.1. Lignées cellulaires 88
II.1.1. Cellules U-937 88
II.1.2. Cellules HL-60 88
II.1.3. Cellules 3T3-L1 89
II.2. Cultures cellulaires 89
II.2.1. Cellules U-937 89
II.2.2. Cellules HL-60 89
II.2.3. Cellules 3T3-L1 90
II.3. Conditions de conservation 90
II.4. Test de viabilité et numération cellulaire 90
II.5. Différenciation et révélation des cellules différenciées 91
II.5.1. Différenciation des cellules U-937 en macrophages 91
II.5.2. Différenciation des cellules HL-60 en macrophages et en neutrophiles 92
II.5.3. Différenciation des cellules 3T3-L1 en adipocytes 92
II.6. Traitements des cellules 93
II.6.1. Solutions de traitement 93
II.6.2. Traitements 93
II.6.3. Co-culture des lignées cellulaires U-937 et 3T3-L1 94
II.7. Analyse transcriptionnelle des gènes des DEFA1-3 et de CRAMP 95
II.7.1. Extraction et contrôle de qualité des ARN 95
II.7.2. Quantification des peptides antimicrobiens par RT-PCR semi-quantitative 96

III. Analyses statistiques **100**

RESULTATS ET DISCUSSION **103**

I. Association entre l'expression de la cathélicidine et des défensines-α dans les PBMCs et les facteurs de risques métaboliques et cardiovasculaires dans la cohorte STANISLAS .. **106**
I.1. Analyse quantitative de l'expression du gène de la cathélicidine LL-37 par RT-PCR en temps réel (*Publication 1*). 106

I.1.1. Caractéristiques de l'échantillon étudié 106
I.1.2. Quantification de l'expression des ARNm du gène de LL-37 108
I.1.3. Association entre l'expression du gène de LL-37 et les facteurs de risque cardiovasculaire et du syndrome métabolique 109
I.1.4. Discussion 115
I.2. Analyse quantitative de l'expression des défensines-α DEFA1-3 par RT-PCR en temps réel (*Publication 3, soumise*) 121
I.2.1. Expression des ARNm des gènes *DEFA1-3* 121
I.2.2. Corrélations entre l'expression des ARNm des DEFA1-3 et les facteurs de risque cardiovasculaire et du syndrome métabolique 122
I.2.3. Discussion 125

***II. Lien entre le gène du récepteur FPR (FPR1) et l'expression de LL-37, des DEFA1-3 et les marqueurs d'inflammation* 130**
II.1. Lien entre l'expression des ARNm de LL-37 et DEFA1-3 et celle des ARNm de *FPR1* dans les PBMCs 130
II.1.1. Expression des ARNm de *FPR1* dans les PBMCs 130
II.1.2. Corrélations de l'expression des ARNm de *FPR1* 131
II.1.3. Discussion 132
II.2. Association entre le polymorphisme *FPR1 c.32C>T* et le taux circulant de la E-sélectine (*Publication 2*) 135
II.2.1. Caractéristiques de l'échantillon étudié 135
II.2.2. Fréquence du polymorphisme *FPR1 c.32C>T* dans l'échantillon étudié 136
II.2.3. Association entre le polymorphisme *FPR1 c.32C>T* et le taux circulant de la E-sélectine 137
II.2.4. Discussion 141

***III. Etude de la régulation de l'expression des défensines-α et des cathélicidines in vitro* 144**
III.1. Régulation de l'expression des *DEFA1-3* en réponse au traitement par le glucose ou/et l'insuline 144
III.1.1. Etablissement du modèle cellulaire 144
III.1.2. Régulation de l'expression des *DEFA1-3* dans les neutrophiles dérivés des cellules HL-60 148
III.1.3. Discussion 150
III.2. Etude de la régulation de l'expression de la cathélicidine de souris (CRAMP) dans la lignée de cellules 3T3-L1 152
III.2.1. Etablissement d'un modèle cellulaire 152
III.2.2. Régulation de l'expression du gène de la cathélicidine CRAMP dans les adipocytes dérivés des cellules 3T3-L1 155
III.2.3. Discussion 159

***IV. Synthèse* 162**

***CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES* 167**

***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES* 173**

***PUBLICATIONS ET CONFERENCES* 197**

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies cardiovasculaires sont des affections complexes et d'importance majeure en santé publique, car elles constituent l'une des premières causes de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés. La connaissance de la physiopathologie cardiovasculaire est de ce fait un enjeu majeur tant fondamental que clinique. Il est bien établi que les affections du système cardiovasculaire sont souvent liées à l'athérosclérose et se développent progressivement sous l'influence de facteurs environnementaux et de prédispositions génétiques. Il s'agit donc de maladies multifactorielles.

L'âge, le tabagisme, les dyslipidémies, l'hypertension artérielle, la résistance à l'insuline et le surpoids ont été identifiés comme les principaux facteurs de risque cardiovasculaire. Ces facteurs de risque tendent à se regrouper chez un individu donné et interagir entre eux pour déterminer le risque de survenue de la pathologie cardiovasculaire. Cependant, ces facteurs ne permettent pas de prédire tous les accidents cardiovasculaires et n'expliquent pas à eux seuls la variabilité interindividuelle du risque de mortalité et de morbidité cardiovasculaires, d'où l'importance d'identifier de nouveaux facteurs de risque explicatifs. Le processus immuno-inflammatoire apparaît de plus en plus comme étant un facteur commun pour ces facteurs de risque cardiovasculaire et un élément déterminant dans le développement de la pathologie.

De nombreuses voies biologiques sont impliquées dans le développement et la progression des maladies cardiovasculaires, notamment dans le processus athérosclérotique. Parmi ces voies, il faut noter le métabolisme des lipides et des lipoprotéines, la croissance cellulaire, l'adhésion cellulaire, la régulation de la pression artérielle, le stress oxydant, l'inflammation et le système immunitaire. Le système immuno-inflammatoire est particulièrement intéressant à étudier, car le rôle des médiateurs inflammatoires et des cellules immunitaires a été mis en évidence dans l'initiation, la progression et les complications de la plaque d'athérome. Bien que le dépôt de lipides athéromateux et l'accumulation des cellules spumeuses dans l'intima soit la caractéristique morphologique majeure de l'athérosclérose, des changements très subtils dans l'environnement des parois vasculaires, stimulés par l'influx des cellules immuno-inflammatoires et la libération locale des cytokines et autres médiateurs inflammatoires, sont maintenant reconnus comme facteurs en cause de l'athérosclérose.

Les cellules immunitaires qui se trouvent dans l'espace sous-endothélial sont activées et sécrètent une variété de médiateurs inflammatoires comme les cytokines pro-inflammatoires et les chimiokines. Ces médiateurs favorisent, entre autres, le recrutement de nouveaux leucocytes, entretenant ainsi une réponse inflammatoire chronique dans l'espace endothélial. Ces cellules immunitaires sécrètent également des molécules à activités antimicrobiennes comme les enzymes et les peptides antimicrobiens cationiques tels que les **défensines et les cathélicidines.** Les défensines et les cathélicidines sont des peptides naturels jouant un rôle clé dans la défense immunitaire innée de l'organisme. En plus de leur activité antimicrobienne, ces peptides ont de nombreuses fonctions biologiques, notamment la chimio-attraction des cellules immunitaires, la régulation de la production des cytokines inflammatoires et la modulation de la croissance cellulaire. Dans le contexte d'athérosclérose, des études expérimentales ont montré une surexpression des défensines-α et de la cathélicidine LL-37 dans des lésions athérosclérotiques au niveau des vaisseaux cérébraux et coronariens humains. Les défensines-α semblent être impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines favorisant l'accumulation des particules de lipoprotéines athérogènes sur les cellules vasculaires. La cathélicidine LL-37 induit l'expression des molécules d'adhésion et des chimiokines dans les cellules endothéliales et module la mort des cellules vasculaires des muscles lisses. L'ensemble de ces observations suggère que ces peptides antimicrobiens pourraient être impliqués dans le processus immuno-inflammatoire et le dysfonctionnement vasculaire associé à l'athérosclérose.

L'obésité, notamment abdominale, est un facteur de risque cardiovasculaire majeur, étroitement associée aux dyslipidémies, à l'hypertension artérielle et à l'insulinorésistance. L'obésité est également associée à un état d'inflammation chronique de bas niveau, dit « bas-grade ». Chez les obèses, l'inflammation chronique se caractérise par l'activation des voies de signalisation inflammatoires, une augmentation de concentration en leucocytes circulants, des taux élevés de marqueurs d'inflammation dans la circulation tels que la CRP, l'IL-6 et le TNF-α. Le tissu adipeux a maintenant acquis le statut de glande endocrine qui sécrète de nombreuses cytokines, appelées adipokines, dotées de multiples activités biologiques de type auto-, para- et endocrine. De plus, outre les adipocytes, le tissu adipeux est constitué d'une fraction stromale vasculaire composée en grande partie de cellules immuno-inflammatoires (macrophages, lymphocytes,…). Des études comparatives ont clairement démontré que la majorité des cytokines provenant du tissu adipeux, à l'exception de l'adiponectine et de la leptine, sont sécrétées par des cellules d'origine non adipocytaire, en particulier par les

macrophages infiltrant le tissu adipeux. Cela suggère que les cellules immunitaires joueraient un rôle central dans la perpétuation des états inflammatoires associés à l'obésité et à ses complications. D'ailleurs, des études récentes ont associé l'obésité à l'inflammation vasculaire par des mécanismes de signalisation de l'immunité innée. Dans un modèle animal, il a été montré que l'obésité est associée à l'insulinorésistance vasculaire et la signalisation pro-inflammatoire par la voie du récepteur TLR-4. Les acides gras, dont les taux circulants augmentent dans les états d'obésité, activent les voies de signalisation dépendantes de TLR-4 aussi bien dans les adipocytes que dans les macrophages. Ainsi, les peptides antimicrobiens, en tant qu'effecteurs de l'immunité innée et liés aux voies de signalisation des récepteurs TLR, pourraient être associés au processus immuno-inflammatoire de l'obésité et ses complications métaboliques et cardiovasculaires.

Dans ce contexte, ce travail de thèse a visé à étudier les relations éventuelles entre les peptides antimicrobiens, défensines-α et cathélicidines, et les facteurs de risque du syndrome métabolique et des maladies cardiovasculaires.

INTRODUCTION

I. Les peptides antimicrobiens en tant qu'éléments du système immunitaire

I.1. Systèmes de défense immunitaire

Au cours de l'évolution, deux systèmes de défense immunitaire ont été caractérisés : l'immunité **innée** et l'immunité **adaptative** ou **acquise**. Ces deux systèmes sont étroitement liés (Pasare *et coll.,* 2004). L'immunité adaptative n'existe que chez les vertébrés et présente deux caractéristiques essentielles ; la spécificité de reconnaissance et la mémoire. La différence entre les réponses immunitaires innées et adaptatives est principalement liée aux mécanismes de reconnaissance des microorganismes, les cellules impliquées et leurs mécanismes d'action.

Dans le système immunitaire inné, la reconnaissance est médiée par des récepteurs spécifiques. La présence de ces récepteurs a été confirmée chez les plantes, les invertébrés et les vertébrés, suggérant un processus d'évolution très ancien. Ces récepteurs sont exprimés par de nombreux types de cellules qui sont susceptibles d'interagir avec des micro-organismes et donc jouent un rôle dans la défense immunitaire innée. Parmi ces cellules, on note les monocytes, les macrophages, les cellules tueuses naturelles NK (*Natural Killer*), les cellules T, les cellules dendritiques et certaines cellules épithéliales et endothéliales. Le spectre de reconnaissance de ces récepteurs est dirigé vers des motifs structuraux microbiens communs à de nombreux micro-organismes mais absents des cellules de l'hôte. Parmi ces motifs structuraux, se trouvent les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram-négatif, les peptidoglycanes bactériens, l'acide lipotéicoique des bactéries Gram-positif (Medzhitov *et coll.,* 2000), et les mannanes et les β-(1,3)-glucanes des champignons et des levures.

La présence des récepteurs de l'immunité innée, comme *Toll-like receptors* (TLRs) et *Formyl peptide receptors* (FPRs), confère à ce système de défense une capacité de réponse

immédiate qui peut être induite par des micro-organismes. La reconnaissance des micro-organismes par les récepteurs de la réponse innée déclenche, selon le cas, des réactions différentes et complémentaires. La reconnaissance par un récepteur phagocytaire induit des modifications au niveau de la membrane et du cytosquelette de la cellule phagocytaire, suivie de l'internalisation du micro-organisme et sa mort. La cellule infectée utilise son arsenal de défense pour éliminer le micro-organisme, à savoir : la synthèse d'oxyde nitrique hautement bactéricide, la production d'anions superoxydes et de radicaux libres, de protéases lysosomales et de **peptides antimicrobiens** relargués à haute concentration dans la vacuole de phagocytose.

L'activation des récepteurs de l'immunité innée déclenche également des cascades de signalisation intracellulaire aboutissant, entre autres, à l'induction de la transcription des gènes de la réponse immune, comme les gènes codant les peptides antimicrobiens (**Figure 1**).

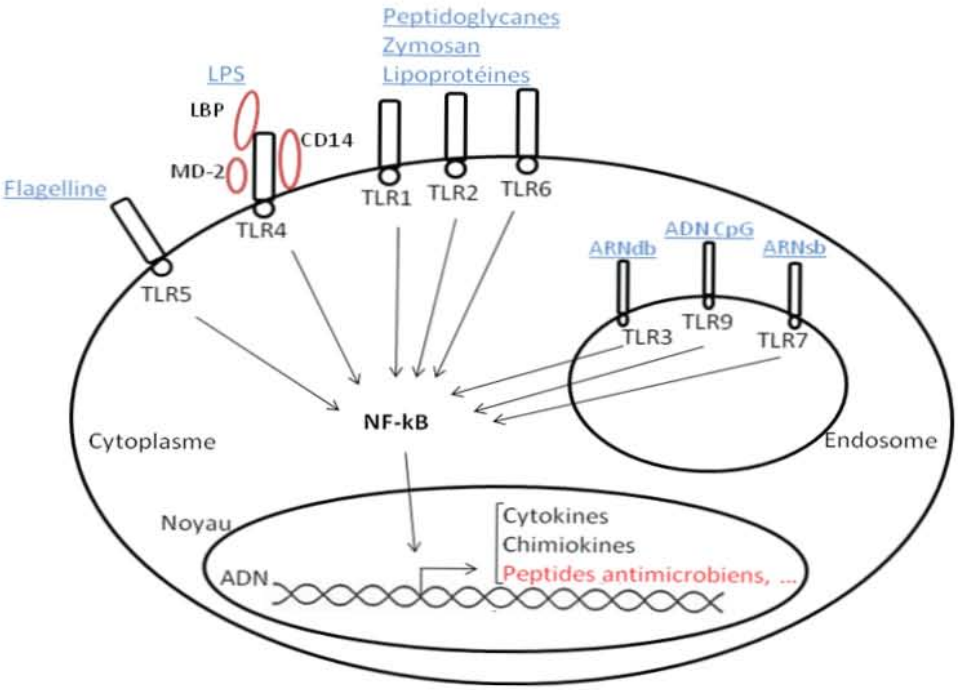


Figure 1 : ***Les différents récepteurs TLR reconnaissent des motifs microbiens spécifiques et participent à l'activation des réponses immunitaires innées et adaptatives***.
D'après (Nestle et coll., 2009).

I.2. Les peptides antimicrobiens

I.2.1. Définition

Les peptides antimicrobiens sont considérés comme l'un des éléments clés de la défense immunitaire innée des organismes multicellulaires (Boman, 2003 ; Hoffmann *et coll.,* 1999 ; Zaiou, 2007). Il s'agit d'un ensemble de peptides de petite taille (2-6 kDa), généralement chargés positivement, avec une structure amphipatique. Ces peptides endogènes, appelés aussi antibiotiques naturels sont définis par le code génétique des cellules productrices, en particulier les cellules immunitaires et les cellules épithéliales. Ils sont les principales molécules effectrices de l'immunité innée de l'organisme hôte et présentent un large spectre d'activité antibactérienne et antifongique, voire antivirale (Bulet *et coll.,* 2004).

La production de ces peptides antimicrobiens fait donc partie intégrante de la réponse immunitaire innée aux infections microbiennes. Ils sont issus de différents organismes allant des mammifères aux plantes en passant par les insectes et les amphibiens (**Tableau 1, page 10**). On trouve également des peptides antimicrobiens chez des bactéries et des champignons. A l'heure actuelle, plus de 1200 peptides à activité antimicrobienne d'origines diverses ont été identifiés ou prédits (Lai et Gallo, 2009). Ils présentent une grande diversité structurale et la majorité d'entre eux est répertoriée dans des bases de données comme : http://aps.unmc.edu/AP/main.php et http://www.bbcm.units.it/~tossi/pag1.htm.

I.2.2. Structure et diversité

Malgré leur grande diversité, les peptides antimicrobiens présentent certaines caractéristiques communes. Ce sont principalement des molécules de petite taille dont un grand nombre d'entre elles ont des séquences riches en résidus arginine et/ou lysine (**figure 2**) leur permettant d'acquérir une charge globale positive, d'où le nom de **peptides cationiques**.

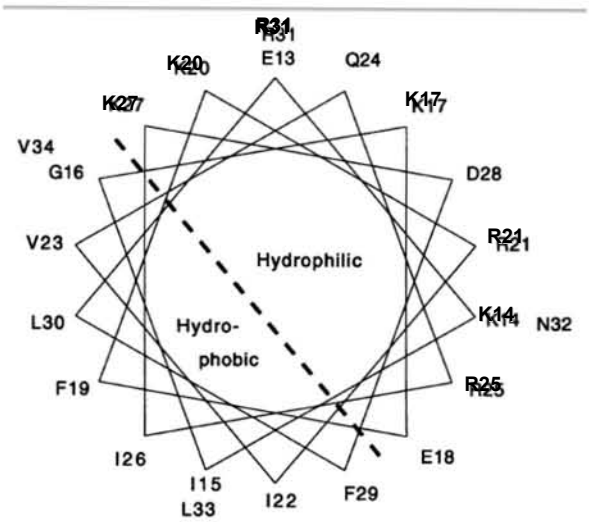


Figure 2 : ***Représentation shématique en roue hélicoïdale d'une séquence d'un peptide cationique (la cathélicidine humaine LL-37). Les acides aminés sont présentés par le code à une lettre. Les résidus cationiques lysine (K) et arginine (R) sont indiqués en grisé. La ligne en pointier divise l'hélice en deux domaines hydrophobe et hydrophile. Agerberth et coll., 1995.***

Le caractère commun à presque tous les peptides antimicrobiens cationiques est la faculté d'adopter, dans une structure secondaire, une conformation amphipatique. Le caractère amphiphile de ces peptides se définit par l'existence de domaines hydrophobes (≈ 50% de résidus hydrophobes) et cationiques distincts (**Figure 3**).

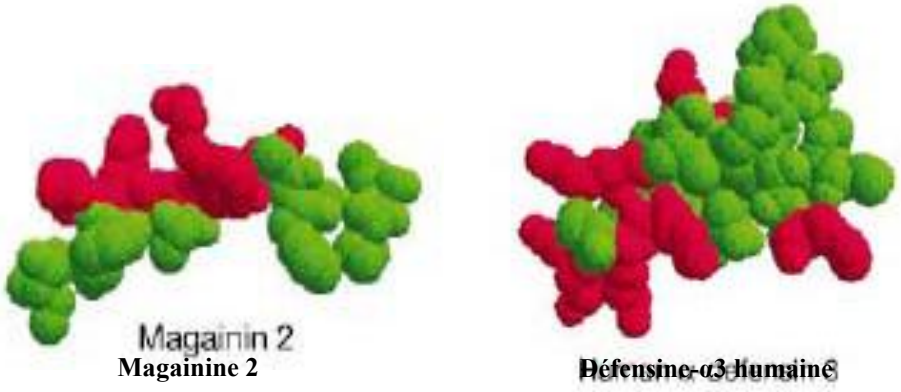


Figure 3 : ***Schéma de la structure secondaire d'un peptide linéaire comme la magainine 2 et d'un peptide cyclique comme la défensine α-3 humaine. Les résidus cationiques (en rouge) et hydrophobes (en vert) se regroupent dans deux domaines distincts. D'après (Zasloff M, 2002).***

Sur la base de leur composition en acides aminés et leurs caractéristiques structurelles (Bulet *et coll.,* 2004), les peptides antimicrobiens cationiques peuvent être divisés en trois grandes familles (**Tableau 1**) :

- Les peptides linéaires structurés en hélice-α amphipatique.
- Les peptides linéaires riches en certains acides aminés particuliers.
- Les peptides cycliques à 1 ou pluieurs ponts disulfure.

Tableau 1 : ***Principales classes de peptides antimicrobiens cationiques présentées selon la structure et la composition en acides aminés des peptides qu'elles regroupent (Doc. personnelle).***

		ORIGINE		Exemple organisme	Exemple peptide
Linéaires	Hélice -α	Insecte		Anophèle	Cécropine
		Amphibien		Xenopus laevi	Magainine
		Mammifère		Homme et animaux domestiques	Cathélicidines
	Riches en certains acides aminés	Insecte	Riche en Pro	Drosophile	Drosocine
			Riche en Gly	Mite	Glovérine
		Mammifère	Riche en His	Homme, Primates	Histatines
			Riche en Trp	Bovins	Indolicidine
			Riche en Pro et Arg	Porc	PR-39
Cycliques	1 pont S-S	Insecte		Punaise	Thanatine
		Amphibien		Grenouille verte	Esculentine
		Mammifère		Bovin	Bactenecine
	2 ponts S-S	Arthropode		Scorpion	Androctine
		Mammifère		Porc	Protégrine
	3 ou 4 ponts S-S	Insecte		Drosophile	Drosomycine
		Mammifère		Homme, macaque	Défensines, Hepcidine

Pro : proline, Gly : glycine, His : histidine, Trp : triptophane, Arg : arginine

D'autres peptides antimicrobiens enfin ne sont pas cationiques. Ce sont des dérivés de neuropeptides (Goumon *et coll.,* 1998), des peptides aromatiques et des dérivés des protéines fixant l'oxygène comme l'hémoglobine (Froidevaux *et coll.,* 2001).

I.2.2.1. Peptides linéaires structurés en hélice-α amphipatique

Ce sont des peptides linéaires dépourvus de résidus cystéine et qui adoptent une structure en hélice-α amphipatique (**Figure 4**), comme les magainines des amphibiens (Powers et Hancock, 2003) ou la **cathélicidine humaine LL-37** (Bulet *et coll.,* 2004).

Figure 4 : ***Structure secondaire d'un peptide en hélice-α (Hancock, 2001)***

En général, ces peptides ne se structurent qu'au contact de la membrane des bactéries ou en solution (Braff *et coll.,* 2005). Ils sont également de petite taille (< 40 acides aminés), très amphiphiles et nettement chargés, ce qui leur permet l'interaction avec les phospholipides des membranes des micro-organismes et de ce fait leur insertion dans ces membranes.

I.2.2.2. Peptides linéaires riches en certains acides aminés particuliers

Ces peptides, n'adoptant pas de structure secondaire en hélice-α ou en feuillet-β, sont appelés « *extended peptides* » (Hancock, 2001 ; Lai et Gallo, 2009) (**Figure 5**). Ils possèdent une séquence riche en certains acides aminés particuliers.

Figure 5 : ***Structure secondaire d'un peptide linéaire non structuré (Hancock, 2001)***

Parmi les peptides non structurés les plus répandus sont ceux riches en : Glycine (ex. Diptéricines), Histidine (ex. Histatines), Tryptophane (ex. Indolicidine), Proline et Arginine (ex. PR39) (Epand et Vogel, 1999 ; Bulet *et coll.,* 2004). Les résidus cationiques et hydrophobes sont répartis sur la séquence peptidique pour former deux domaines distincts.

I.2.2.3. Peptides cycliques à ponts disulfure

La famille des peptides antimicrobiens dits cycliques est caractérisée par la présence de paires de cystéine (cystibiotiques) qui ont la propriété de former des ponts disulfure (**Figure 6**), comme **les défensines** (**a**) (Selsted *et coll.,* 1985) et la bacténécine (**b**) (Romeo *et coll.,* 1988).

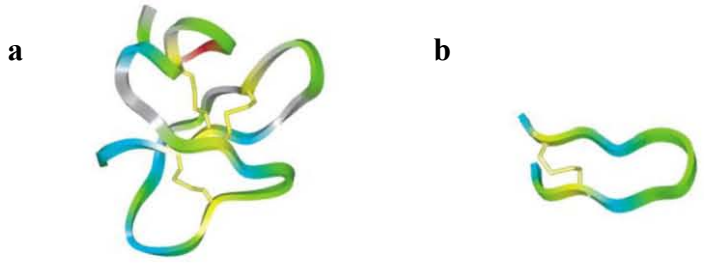


Figure 6 : ***Structure des peptides cycliques à ponts disulfure (Hancock, 2001)***

En fonction du nombre de ponts disulfure qu'ils contiennent, ces peptides adoptent différentes structures : en feuillets-β, en épingle à cheveux (*hairpin-like*), en structure mixte contenant à la fois des hélices-α et des feuillets-β (*open-ended*), ou totalement cycliques. Ils sont souvent caractérisés par une série de feuillets-β anti-parallèles et la présence de ponts disulfure donne à la structure des peptides une certaine rigidité et stabilité.

I.2.3. Sources et distributions

Les peptides antimicrobiens cationiques sont largement distribués dans l'organisme animal, mais ils se concentrent dans certaines zones stratégiques plus particulièrement exposées à l'environnement extérieur comme la peau, les voies respiratoires, le tractus gastro-intestinal et l'appareil uro-génital. On trouve aussi ces peptides anti-infectieux dans la circulation (lymphe, sérum) et dans les sécrétions telles que le liquide séminal, le lait, la sueur,…

Au niveau cellulaire, ces molécules sont produites principalement par les cellules immuno-inflammatoires (notamment les neutrophiles, monocytes, macrophages, lymphocytes, et les cellules dendritiques), et par les cellules épithéliales des muqueuses comme les cellules de Paneth intestinales et les kératinocytes cutanés. Ils sont souvent stockés

dans des granules comme les granules azurophiles des neutrophiles (**Figure 7**) ou les granules des cellules de Patneth. En réponse à divers stimuli, ces molécules peuvent être libérées dans le milieu extracellulaire par dégranulation des cellules productrices pour être rapidement disponibles au niveau des sites d'infections microbiennes.

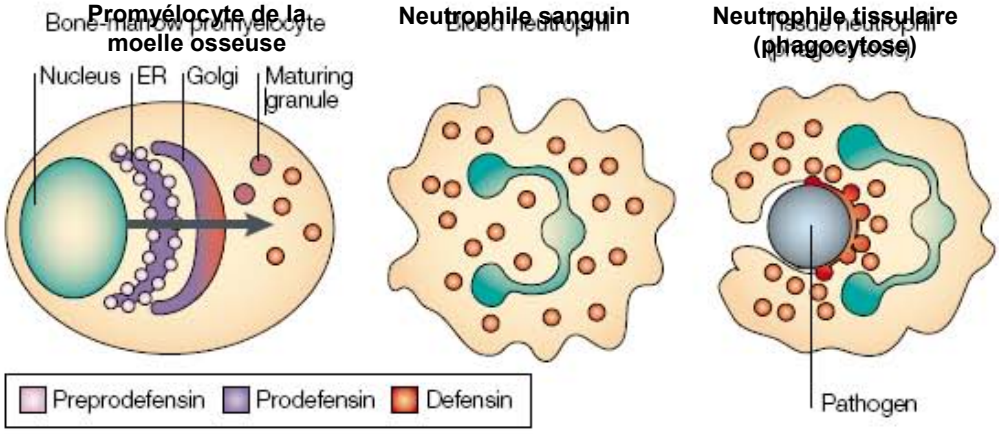


Figure 7 : ***Schéma de synthèse et libération des défensines-α des granules de stockage des neutrophiles humains (Ganz, 2003).***

I.2.4. Mécanismes d'action des peptides antimicrobiens cationiques

Les peptides antimicrobiens sont connus pour leur fonction antimicrobienne qui consiste en l'élimination des micro-organismes qui envahissent l'organisme. Ils sont actifs contre des bactéries Gram-négatif et Gram-positif, des champignons filamenteux, des levures, des parasites et certains virus enveloppés (Zasloff, 2002). La plupart d'entre eux semblent agir directement sur la membrane des micro-organismes, tandis que d'autres agissent après internalisation sur des éléments intra-cytoplasmiques comme l'ADN et l'ARN (Park *et coll.,* 1998) et les protéines cytoplasmiques afin d'inhiber leur synthèse.

Les caractéristiques principales déterminant l'action d'un peptide antimicrobien sont liées essentiellement à sa charge, sa conformation, son amphipathie et son hydrophobicité. Dans le cas des peptides cationiques, la charge nette positive permet leur attraction électrostatique initiale, ensuite leur intégration ou leur translocation dans la membrane bactérienne grâce à leur caractère amphiphile (Yeaman et Yount, 2003).

I.2.4.1. Mode d'action

Le mode d'action de ces peptides se fait en plusieurs étapes (Zasloff, 2002 ; Yeaman et Yount, 2003), allant de la fixation initiale du peptide jusqu'à la mort cellulaire. Si la fixation initiale grâce à des interactions électrostatiques est bien connue, le mode d'intégration des peptides et de déstabilisation de la membrane bactérienne a fait l'objet de nombreux travaux, à l'origine de plusieurs propositions de modèles pour expliquer le mode d'action des peptides antimicrobiens (Brogden, 2005).

De manière générale, trois facteurs conditionnent l'interaction peptide/membrane :

- *Le seuil d'activité :* il est dépendant de la concentration du peptide, de sa capacité à s'auto-assembler, de la composition et de la fluidité de la membrane cellulaire (Yang *et coll.,* 2000),

- *La conformation :* le changement de conformation du peptide au contact de la membrane a été largement décrit pour les peptides à hélice alpha. De nombreux travaux ont ainsi démontré le changement de conformation, de linéaire à hélicoïdale, des magainines au contact de la membrane cellulaire (Bechinger *et coll.,* 1993). Au contraire, les structures secondaires à feuillet β, que l'on retrouve dans les peptides à pont disulfure, présentent une grande stabilité de conformation au contact des phospholipides membranaires. Leur activité pourrait être conditionnée à une modification de leur structure quaternaire, ou à une monomérisation (Yeaman et Yount, 2003),

- *L'auto-assemblage :* de nombreux travaux ont démontré l'existence d'interactions entre peptides et phospholipides membranaires, qui conduisent à la formation de structures plus complexes. Ce potentiel, propre à chaque peptide, est fonction de la composition et de la conformation du peptide monomérique. Ainsi, par exemple, les peptides à domaines hydrophobes et hydrophiles bien distincts, peuvent s'auto-assembler par la simple orientation favorable de ces domaines. De tels assemblages permettent la création de pores au niveau de la membrane.

Ces trois facteurs, variables pour chaque peptide étudié, expliquent la diversité des modèles proposés pour expliquer le mode d'action des peptides antimicrobiens. De façon très schématique, la perméabilisation de la membrane serait le résultat d'une interaction des

peptides avec les bicouches lipidiques membranaires, soit par la formation de structures de type pores ou canaux suivie de la fuite extracellulaire du cytoplasme (Yang *et coll.,* 2000), ou par rupture membranaire par excès d'incorporation de peptides (Tossi *et coll.,* 2000). Plusieurs modèles sont ainsi décrits :

- ***Le modèle des pores transmembranaires (Barrel-stave model)***
- ***Le modèle des pores toroïdaux (Toroidal pore, wormhole model)***
- ***Le modèle « carpet-like », qui est souvent décrit comme un mécanisme de type détergent***
- ***Le modèle de Shai-Matsuzaki-Yang :***

Shai-Matsuzaki-Yang (Matsuzaki *et coll.,* 1999 ; Shai, 1999 ; Yang *et coll.,* 2000) ont proposé un modèle structure-fonction des peptides antimicrobiens cationiques. Ce modèle résume l'ensemble des hypothèses et modèles décrits auparavant dans la littérature (Zasloff, 2002) (**Figure 8**).

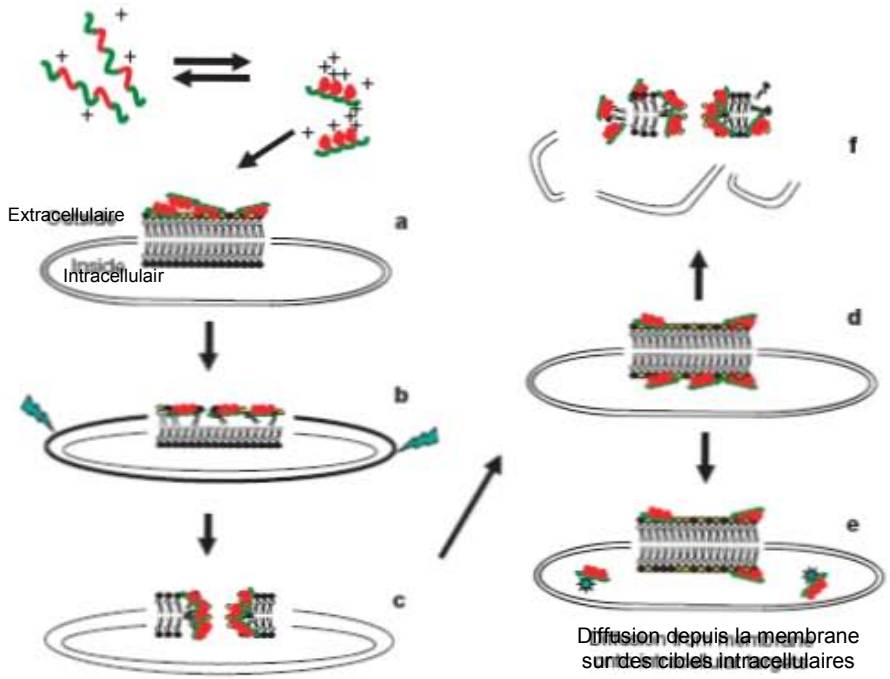


Figure 8 : ***Modèle de Shai-Matsuzaki-Yang expliquant le mode d'action des peptides antimicrobiens. D'après (Zasloff, 2002).***

De manière générale : **a)** le peptide antimicrobien, étant chargé positivement, est attiré par des forces électrostatiques aux groupes de phospholipides chargés négativement sur la membrane bactérienne [lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram-négatif, les peptidoglycanes (acide téichoique et teichuroniques) et le lysophosphatidylglycérol des bactéries Gram-positif]. **b)** En s'insérant dans la membrane, le peptide provoque une contrainte sur la bicouche lipidique (Brogden, 2005) ; **c)** le peptide s'étale puis s'intègre à la membrane créant alors une déstabilisation générale de la structure membranaire en formant des pores qui entraînent une osmolyse. Si cette déstabilisation ne suffit pas à entraîner la rupture de la membrane, le mécanisme peut alors se poursuivre par **d)** le déplacement de lipides et de peptides vers le feuillet interne de la membrane, puis **e)** diffusion du peptide antimicrobien sur des cibles intracellulaires ou **f)** la défragmentation de la membrane bactérienne par l'action du peptide antimicrobien.

Par ailleurs, ces peptides à concentration physiologique ne semblent pas être toxiques pour les cellules de l'hôte, suggérant une spécificité d'action sur les cellules microbiennes.

I.2.4.2. Spécificité d'action

L'action des peptides antimicrobiens requiert une reconnaissance spécifique des cellules microbiennes, ce qui leur permet la distinction entre les cellules infectieuses et les cellules de l'hôte. Cette reconnaissance spécifique est particulièrement importante, notamment en terme de toxicité et repose sur plusieurs facteurs biophysico-chimiques, basés sur les différences de constitution entre membranes eucaryotes et procaryotes (**Figure 9**).

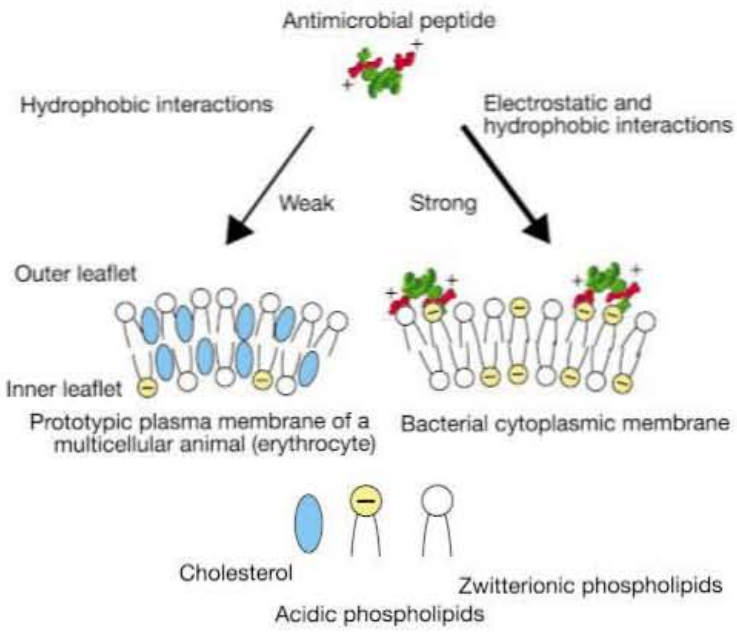


Figure 9 : ***Schéma des relations spécifiques entre peptide antimicrobien et les membranes d'organismes pluricellulaires animaux et des bactéries. D'après (Zasloff, 2002).***

Parmi les différences principales de structure entre membrane eucaryotes et procaryotes, on note :

- Les membranes des cellules animales contiennent des glycolipides et du cholestérol sans aucune charge nette, dont sont dépourvues la plupart des cellules procaryotes.
- L'asymétrie membranaire diffère entre la membrane eucaryote et bactérienne (procaryote). La composition du feuillet externe des membranes bactériennes en phospholipides hydroxylés rend la charge de surface très négative.
- Si les phospholipides chargés négativement peuvent être considérés comme des sites récepteurs privilégiés, des interactions autres, de type ligand-récepteur, ont aussi été proposées pour expliquer la spécificité de reconnaissance des peptides antimicrobiens (Edgerton *et coll.,* 1998).

Outre ces différences structurelles entre les cellules eucaryotes et les cellules procaryotes, les effets cytotoxiques des peptides antimicrobiens pour les cellules de l'hôte *in vivo* sont considérablement atténués par des constituants du sérum, notamment les apolipoprotéines A-I et B qui peuvent se fixer sur les peptides antimicrobiens (Sorensen *et coll.,* 1999).

I.3. Les peptides antimicrobiens chez l'Homme

La plupart des peptides antimicrobiens naturels sont synthétisés sous forme de précurseurs (prépropeptides), avec une séquence signal, un pro-domaine et une séquence carboxy-terminale appelée également peptide (Zasloff, 2002) (**Figure 10**). Le pro-domaine est généralement constitué de séquences conservées entre des peptides de la même famille, aussi bien dans la même espèce qu'entre des espèces différentes, alors que la séquence du peptide carboxy-terminal varie d'une espèce à l'autre, bien qu'elle contienne des motifs spécifiques (Bévins., 2004 ; Gudmundsson et Agerberth, 2004). Les longueurs du pro-domaine et du peptide carboxy-terminal peuvent varier selon les familles de peptides.

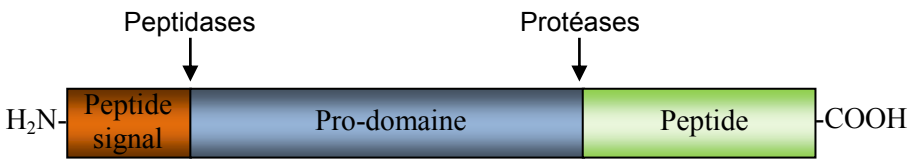


Figure 10 : ***Représentation schématique d'un précurseur de peptides antimicrobiens. D'après (Zasloff, 2002).***

Sur la base de ces caractéristiques, de nombreuses familles de peptides antimicrobiens ont été définies chez l'Homme comme les **histatines**, **l'hepcidine**, les **défensines** et les **cathélicidines**. Ces peptides jouent un rôle clé dans la première ligne de défense de l'organisme, ainsi que dans l'activation de la réponse immunitaire adaptative (Chertov *et coll.,* 1996 ; De Yang *et coll.,* 2000).

La famille des **défensines** (Ganz, 2003) et celle des **cathélicidines** (Zanetti, 2005) sont les plus caractérisées chez l'Homme. Les peptides appartenant à ces deux familles sont produits de manière constitutive ou inductible en réponse à des stimuli endogènes (ex. cytokines) ou exogènes (ex. agents microbiens) (Lai et Gallo, 2009) dans les cellules épithéliales et les cellules immuno-inflammatoires. Ce sont des molécules très conservées entre de nombreuses espèces attestant de leur importance majeure comme effecteurs de la défense de l'organisme (Kolls *et coll.,* 2008). Outre leur rôle clé dans la défense immunitaire innée, il a été démontré que les défensines et les cathélicidines ont plusieurs autres fonctions biologiques (Lai et Gallo, 2009), suggérant un rôle de ces peptides dans de nombreuses pathologies inflammatoires. **Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes consacrés à l'étude des défensines et des cathélicidines, que nous décrivons ci-après.**

I.3.1. La famille des défensines

I.3.1.1. Source et classification

Les défensines constituent une famille très complexe de peptides antimicrobiens cationiques appartenant à la classe des peptides à ponts disulfure. Ils possèdent six résidus cystéine conservés (motif consensus) permettant la formation de trois ponts disulfure intramoléculaires (Chen *et coll.,* 2006).

Sur la base de leur taille et la disposition des ponts disulfure, les défensines sont classées en trois groupes : les défensines-α, -β, et -θ. Seules les défensines-α et -β sont présentes chez l'Homme (Izadpanah et Gallo, 2005) (**Tableau 2**). La majorité des recherches se sont focalisées sur ces deux familles.

Tableau 2 : ***Principales caractéristiques des défensines-α et -β humaines (Ramasundara et coll., 2009).***

	Taille du précurseur	Taille du peptide mature	Liaisons de cystéine	Défensine	Distribution tissulaire	Stimuli
Défensines alpha	~90-105 aa	~30-34 aa	1-6, 2-4, 3-5	HNP 1-4	Neutrophiles infiltrant la membrane des muqueuses. Dans l'inflammation active observée dans les cellules épithéliales intestinales en dispersion	Augmentées en inflammation active, probablement le résultat d'une augmentation de l'influx des neutrophiles
				HD 5-6	Cellules de Paneth et les cellules épithéliales des villosités du duodénum, jéjunum et de l'ileum	Exprimées constitutivement, mais requièrent une maturation pour l'activité biologique
Défensines béta	~60-70 aa	~36-44 aa	1-5, 2-4, 3-6	HBD 1	Epithélia des muqueuses, notamment du côlon	Exprimée constitutivement
				HBD 2-4	Epithélia des muqueuses, notamment du côlon. Plasma des cellules du côlon	IL-1α et les bactéries entéroinvasives

aa, acides aminés ; **HBD**, human β-defensin ; **HD**, human α-defensin; **HNP**, human neutrophil peptides; **IL**, interleukin.

a) *Défensines-α*

Les défensines-α sont de petites molécules constituées de 29 à 35 acides aminés (Yang *et coll.,* 2002). Les trois ponts disulfure sont formés entre les résidus cystéine 1-6 ; 2-4 et 3-5

(**Figure 11**). Six sous-types de défensines-α sont présents chez l'Homme : quatre sont appelés peptides des neutrophiles humains HNP (*human neutrophil peptide*) -1, -2, -3 et -4, appelés ainsi car ils ont été isolés la première fois dans des neutrophiles et les deux autres nommés défensines humaines HD (*human defensin*) 5 et 6 (Chen *et coll.,* 2006). Les HNP1-4 sont stockés dans les granules azurophiles des polynucléaires neutrophiles, où la quantité des HNP1-3 est très importante, alors que celle de HNP-4 y est moindre (Ganz *et coll.,* 1990). De plus, les HNP1-3 sont également détectés dans les lymphocytes B, les cellules NK (*natural killer*) et les monocytes (Selsted et Ouellette, 2005). Les deux autres défensines-α HD-5 et -6, découvertes respectivement en 1992 et en 1993, sont présentes dans les granules des cellules de Paneth dans l'intestin grêle (Jones et Bevins, 1992 et 1993), où HD-5 est activée par la trypsine (Ghosh *et coll.,* 2002). De plus, HD-5 et HD-6 ont été identifiées plus tard dans des cellules épithéliales du tractus urogénital (De Smet et Contreras, 2005).

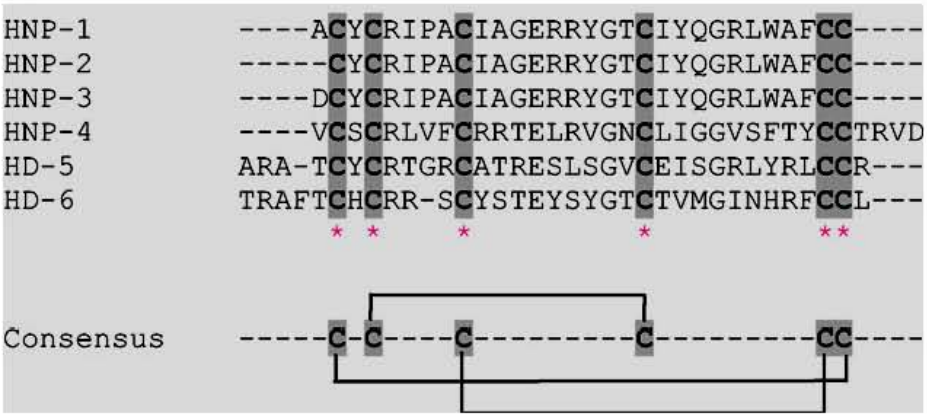


Figure 11 : ***Alignement de séquences des défensines-α humaines***. Les astérisques (*) indiquent le motif consensus des résidus cyctéines impliqués dans la formation des 3 ponts disulfure (Combet *et coll.,* 2000).

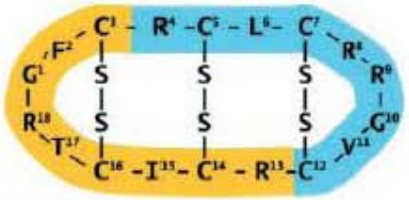
b) *Défensines-β*

Les défensines-β sont des peptides constitués de 38 à 50 acides aminés (Yang *et coll.,* 2002 ; Jonard *et coll.,* 2006) où les trois ponts disulfure impliquent l'appariement des résidus cyctéine 1-5 ; 2-4 et 3-5. Le groupe des défensines-β est plus large que celui des défensines-α. Les trois premières défensines-β identifiées chez l'homme, HBD (*human beta defensin*) 1, 2 et 3, sont largement produites par les cellules épithéliales et par les leucocytes (De Smet et Contreras, 2005). La défensine-β1 a été initialement isolée de l'hémofiltrat des patients subissant une dialyse. Par des approches de recherche bioinformatique (analyse in silico), environ 30 nouvelles molécules de défensines-β ont été identifiées récemment chez l'Homme.

c) *Défensines-θ*

Les défensines-θ diffèrent des deux groupes précédents par leur taille et leur structure. Ces peptides sont constitués de seulement 18 acides aminés, avec une structure cyclique sans extrémité libre (**Figure 12**). Les précurseurs des défensines-θ sont considérés comme des paralogues des défensines-α tronquées par un codon stop (Selsted et Ouellette, 2005). En effet, le peptide mature est dérivé de deux segments de défensines-α générant un peptide cyclique par un processus encore non caractérisé. Les défensines-θ ont été isolées des neutrophiles et monocytes des macaques Rhésus (Tang *et coll.,* 1999).

Figure 12 : ***Structure cyclique de la défensine-θ-1 des macaques Rhésus (Tang et coll., 1999).***



Les gènes codant pour ce groupe de peptides sont présents uniquement chez les primates de l'ancien monde. Chez l'Homme, ces gènes sont présents à l'état de pseudogènes transcrits mais n'aboutissent pas à la synthèse d'une protéine active à cause d'une mutation introduisant un codon stop prématuré (Cole *et coll.,* 2002).

I.3.1.2. Synthèse et maturation

Comme la plupart des peptides antimicrobiens humains, les défensines sont produites sous forme de précurseurs 'prépropeptides' (**Figure 13**) et leur maturation se fait à différents degrés en fonction du site d'expression (Selsted et Ouellette, 2005). La biosynthèse de ces peptides implique un clivage rapide du peptide signal produisant une pro-défensine qui a peu ou pas d'activité antimicrobienne *in vitro* (Valore *et coll.,* 1992 ; Wu *et coll.,* 2003).

La libération du peptide actif requiert un clivage protéolytique du pro-domaine anionique. On pense que ce dernier confère un équilibre de charge pour le précurseur, permettant ainsi probablement de minimiser l'auto-toxicité dans les cellules productrices en évitant l'interaction intracellulaire avec les membranes des cellules. Etant à l'état oxydé dans le pro-peptide, le segment C-terminal mature des défensines-α est protégé de l'action des enzymes de dégradation. Les séquences d'acides aminés des défensines matures sont très variables à l'exception du motif consensus des résidus cystéine, conservés dans chaque groupe de défensines.

I.3.1.3. Structure et organisation des gènes des défensines

Les défensines-α humaines (HNP1-4 et HD5-6) sont codées par des gènes qui sont co-localisés dans une même région du chromosome 8 (8p23) formant un cluster (Sparkes *et coll.,* 1989). Les gènes codant les défensines-α HNP1-4 sont appelés DEFA1-4 et organisés en trois exons et deux introns (**Figure 13**).

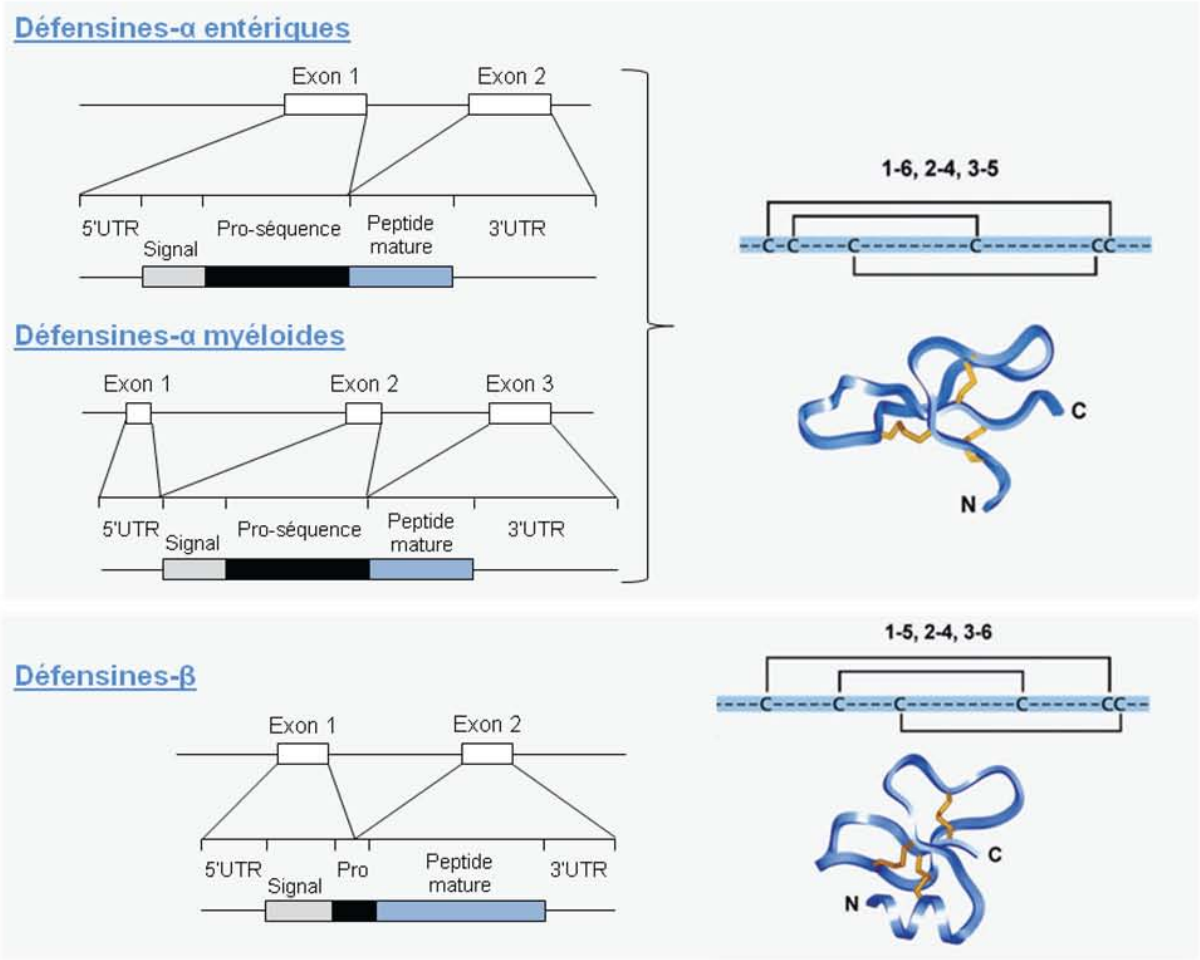


Figure 13 : ***Organisation schématique des gènes et peptides des défensines. A gauche, alignement des gènes des défensines-α et défensines-β. Peptide signal (Signal, en gris), pro-domaine (pro-séquence ; pro, en noir), résidus présents dans les défensines matures (en bleu). A droite, schémas des trois ponts disulfure dans chacune des deux classes de défensines. Les numéros au-dessus de chaque diagramme indiquent les positions des résidus cystéines impliqués dans chacun des ponts disulfure. Les schémas de structures tridimensionnelles correspondent à la défensines-α de lapin (haut) et de défensine-β1 humaine (bas) (Selsted et Ouellette, 2005).***

Le premier exon de chaque gène code la région 5'-UTR (*untranslated region*). L'exon 2 contient la séquence consensus d'initiation de la traduction, le peptide signal et une partie du pro-domaine. Enfin, l'exon 3 code pour le peptide mature (Linzmeier *et coll.,* 1993). Les gènes DEFA1 et DEFA3 codent respectivement HNP-1 et HNP-3, mais l'un et/ou l'autre code également HNP-2 pour lequel aucun gène distinct n'a été identifié (Linzmeier *et coll.,* 2005). Il faut noter que les séquences de HNP-1, HNP-2 et de HNP-3 sont quasiment identiques. HNP-1 et HNP-3 sont composés de 30 acides aminés chacun et diffèrent au niveau du seul premier résidu, qui consiste en un résidu alanine dans HNP-1 et un résidu aspartate dans HNP-3. Cela est dû à une différence d'un nucléotide, C3400A, entre les allèles DEFA1 et DEFA3 (Linzmeier *et coll.,* 2005). HNP-2 est composé de 29 acides aminés. Il peut être simplement le produit de protéolyse de l'un ou des deux autres peptides puisque sa séquence commence par le deuxième résidu de HNP-1 et HNP-3 (Mars *et coll.,* 1995).

Grâce à la forte homologie des séquences de gènes et de peptides de ces trois défensines-α et leur expression constitutive dans les leucocytes, les HNP-1, -2 et -3 sont souvent étudiées ensemble aussi bien au niveau protéique que génique.

I.3.1.4. Régulation de l'expression des défensines

Puisque les défensines sont exprimées sous forme de précurseurs puis, par un clivage protéolytique, libérées sous forme de peptides biologiquement actifs, la régulation de leurs fonctions est dépendante à la fois de l'expression des protéases appropriées pour la maturation et de l'expression des produits des gènes eux-mêmes (Lai et Gallo, 2009). En effet, la biosynthèse des défensines et leur libération dans le milieu extracellulaire sont régulées par de nombreux signaux, notamment par les micro-organismes et les cytokines inflammatoires, ainsi que dans certains cas par des signaux neuroendocriniens en fonction du tissu étudié (Ganz, 2003).

L'expression des défensines-α semble être constitutive. Par contre, l'augmentation de leur activité est due essentiellement à la mobilisation de ces peptides dans les cellules (phagocytes) ou à l'induction de leur sécrétion dans le milieu extracellulaire (Selsted et Ouellette, 2005). La sécrétion extracellulaire des HNP1-3 peut être particulièrement stimulée dans les cellules NK par des antigènes microbiens (Chalifour *et coll.,* 2004), tandis que la sécrétion des défensines-α entériques est stimulée par des agonistes cholinergiques et des antigènes microbiens (Ayabe *et coll.,* 2000 ; Selsted et Ouellette, 2005). La dégranulation des

cellules de Paneth semble aussi être modulée par la concentration ionique (calcium,…) dans l'environnement physiologique (Ayabe *et coll.,* 2002). De plus, il a été récemment montré que l'IL-18 induit l'expression des défensines-α dans les cellules de l'épithélium intestinal infecté (McDonald *et coll.,* 2006).

Contrairement aux défensines-α, l'expression des défensines-β peut être inductible dans de nombreux tissus, souvent en réponse à une production de cytokines pro-inflammatoires impliquant la voie des récepteurs TLRs. L'expression de HBD1-2 est activée dans des monocytes exposés à des bactéries, aux endotoxines LPS ou à l'interféron-γ (Druits *et coll.,* 2002 ; Fang *et coll.,* 2003). La synthèse de HBD-4 est inductible par la stimulation par le TNF-α, l'IL-1β, l'interféron-γ, le phorbol myristate acétate et par des antigènes bactériens (Harder *et coll.,* 2001 ; Harder *et coll.,* 2004). Liu et coll. (2003) ont montré que les LPS stimulent l'expression de HBD-2 dans les monocytes à travers le facteur de transcription NF-κB.

I.3.2. La famille des cathélicidines

I.3.2.1. Source et classification

La seconde famille majeure de peptides antimicrobiens chez l'homme est représentée par les **cathélicidines**. Ce sont des peptides cationiques à hélice-α amphipatique. Ils ont également été caractérisés chez d'autres mammifères comme les bovins, porcs, souris et lapins (Bowdish *et coll.,* 2005). Les cathélicidines sont exprimées dans les leucocytes comme les neutrophiles, monocytes/macrophages, cellules NK, lymphocytes T et B et dans les cellules épithéliales de la peau, et du tractus gastro-intestinal et respiratoire (Cowland *et coll,* 1995 ; Gudmundsson *et coll.,* 1996 ; Frohm *et coll.,* 1997 ; Bals *et coll.,* 1998 ; Agerberth *et coll.,* 2000). La cathélicidine humaine est le constituant majeur des granules spécifiques des neutrophiles (Sorensen *et coll.,* 1997a).

Comme les défensines, les cathélicidines sont dérivées d'un précurseur caractérisé par une séquence signal, un pro-domaine conservé qui ressemble à la cathéline, un inhibiteur de la cathepsine L [*cathelin (cathepsin L inhibitor)-like*] et communément appelé domaine cathéline. Le peptide carboxy-terminal des cathélicidines présente une forte hétérogénéité

entre les éspèces (Hancock *et coll.,* 2000 ; Sorensen *et coll.,* 2005). Cette hétérogénéité semble être à l'origine de leur diversité structurale (Zaiou et Gallo, 2002).

La famille des cathélicidines est représentée chez l'Homme et la souris par un seul gène, appelé respectivement *CAMP (cathelicidin antimicrobial peptide*) et CRAMP (*cathelin-related antimicrobial peptide*) (Gallo *et coll.,* 1997).

I.3.2.2. Synthèse et maturation

Le gène de la cathélicidine humaine, *CAMP,* code pour un précurseur inactif d'une masse moléculaire d'environ 18 kDa, appelé hCAP18 (*human cathelicidin antimicrobial peptide 18 kDa*) (Gudmundsson *et coll.,* 1996). Le peptide actif correspond à la région carboxy-terminale du précurseur, constitué d'une séquence de 37 acides aminés qui commence par deux résidus Leucine, d'où le nom **LL-37** (**Figure 14**).

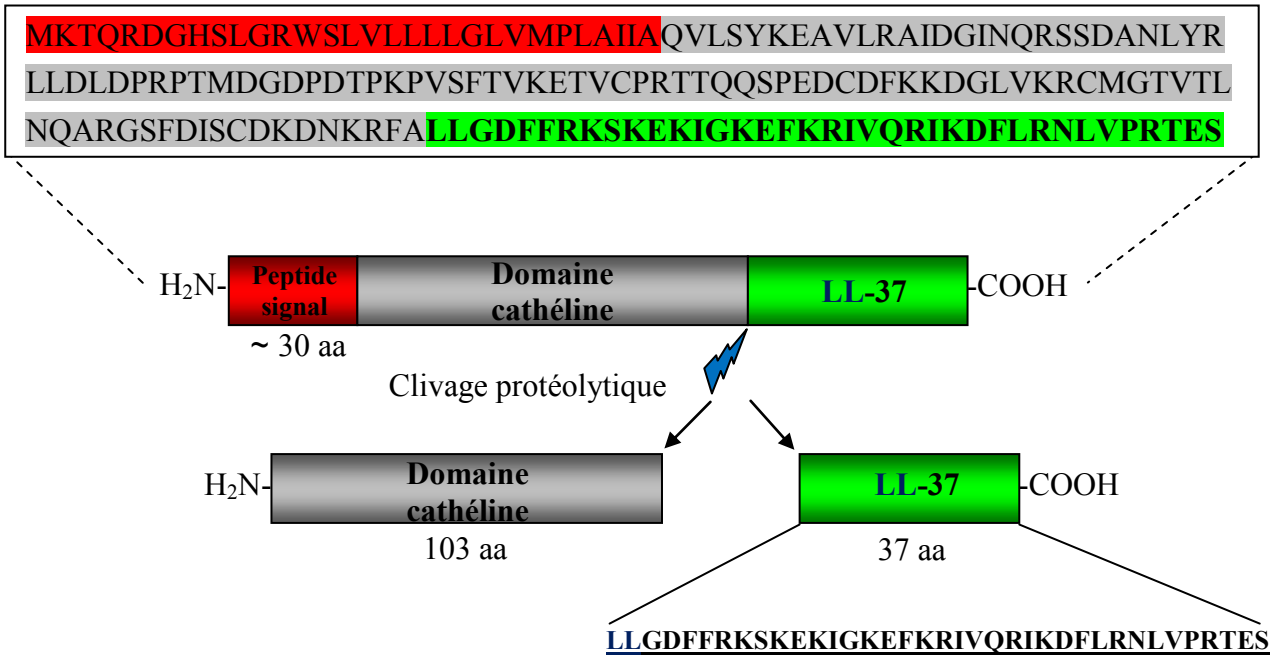


Figure 14 : ***Schéma représentant le précurseur de la cathélicidine humaine et la libération protéolytique du peptide actif, LL-37. D'après (Kai-Larsen et Agerberth, 2008).***

Le peptide LL-37 devient biologiquement actif une fois libéré de l'extrémité C-terminale du précurseur hCAP18 (Zanetti, 2004 ; De Smet et Contreras, 2005). Son clivage est alors catalysé par des protéases à sérine des kératinocytes comme les kallikreines (Yamasaki *et coll.,* 2006) et les protéases des neutrophiles comme la protéinase 3 (Sorensen *et*

coll., 1997b). Dans les kératinocytes de la peau, LL-37 peut subir d'autres clivages par des protéases produites par la flore microbienne de la peau générant différents fragments peptidiques (ex. RK-31, KS-30 et K20) avec des activités variables (Murakami *et coll.,* 2004).

I.3.2.3. Structure et organisation du gène de la cathélicidine

Comme les défensines, les cathélicidines sont codées par des gènes qui partagent la même organisation. Ces gènes sont composés de quatre exons et trois introns (**Figure 15**). Les trois premiers exons présentent de fortes homologies entre les espèces et codent le domaine cathéline conservé, alors que l'exon 4 est très variable et code le peptide variable du domaine C-terminal des cathélicidines (Zaiou et Gallo, 2002 ; Boman, 2003). Le gène de la cathélicidine humaine, *CAMP,* est localisé sur le chromosome 3p21.3 (Yang *et coll.,* 2004,).

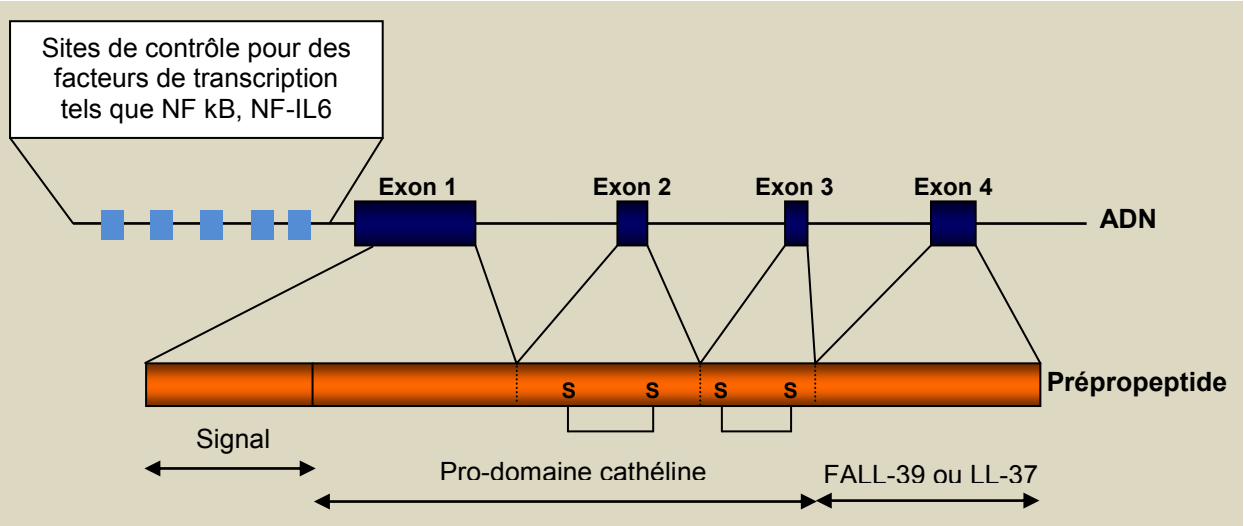


Figure 15 : ***Représentation schématique de l'organisation génomique et peptidique de la cathélicidine humaine hCAP18/LL-37. Les exons 1-3 sont conservés dans tous les gènes des cathélicidines. La partie variable correspond à l'exon 4. D'après (Boman, 2003).***

L'organisation génomique de la cathélicidine de souris CRAMP est similaire à celle du gène *CAMP* humain, notamment au niveau des régions promotrices qui affichent de fortes homologies, suggérant des mécanismes de régulation semblables. Comme LL-37, CRAMP forme une structure en hélice-α amphipatique (Gallo *et coll.,* 1997). De plus, CRAMP et LL-37 ont 61-66% d'identité dans les séquences d'acides aminés codées par les exons 1-3. L'ensemble de ces similarités suggère que CRAMP peut être un modèle d'intérêt pour l'étude de LL-37 (Zaiou et Gallo, 2002 ; Gudmundsson *et coll.,* 1999).

I.3.2.4. Régulation des cathélicidines

La biosynthèse des cathélicidines et leur libération dans le milieu extracellulaire sont régulées par de nombreux signaux exogènes (microbiens, nutritionnels,..) et endogènes (cytokines inflammatoires,…).

- ***Effet des cytokines***

L'analyse de séquences du gène de la cathélicidine humaine (*CAMP)* montre que la région 5' de *CAMP* contient des sites de fixation de plusieurs facteurs de transcription, notamment NF-κB, NF-IL-6, le facteur de réponse de la phase aigüe ; APRF (*acute phase response factor*), et le facteur de transcription C/EBP (*CCAAT/enhancer-binding protein*). L'expression de LL-37 peut donc être régulée par différents signaux influençant ces éléments de réponse tels que les produits microbiens et les cytokines inflammatoires libérées dans les tissus. En ce sens, il a été récemment montré que l'IL-18 induit l'expression de LL-37 dans les cellules de l'épithélium intestinal infecté (McDonald *et coll.,* 2006). L'expression de LL-37/hCAP18 est aussi induite par IGF-I (*insulin-like growth factor I*) au niveau des ARNm et des protéines (Elloumi et Holland, 2008), et par l'IL-1α et IL-6 au niveau des ARNm (Erdag *et coll.,* 2002). Les cytokines IL-4 et IL-13, dérivées des cellules T_H2, sont abondamment exprimées au niveau de la peau d'individus atteints de dermatite atopique (forme d'eczéma) et seraient responsables de la répression de l'expression de LL-37 (Kolls *et coll,* 2008). L'activation des cellules T circulant et infiltrant les tissus périphériques pourrait donc moduler l'expression et les fonctions de LL-37 dans ces tissus.

- ***Effet de la vitamine D_3 et des acides gras***

La vitamine D_3 est naturellement produite au niveau de la peau. Son activation se fait par les hydroxylases cytochrome P450, CYP27A1 et CYP27B1, qui génèrent la forme biologiquement active, 1,25-dihydroxyvitamine D_3 (1,25-VitD3). Cette dernière se fixe sur le récepteur VDR (*vitamin D receptor*) intracellulaire et régule l'expression des gènes (Segaert, 2008 ; Schauber et Gallo, 2008). Sachant que le promoteur du gène *CAMP* contient des éléments de réponse pour VDR, VDR-RE (*VDR-response element*), la stimulation avec 1,25-VitD3 augmente l'expression de hCAP18 dans les kératinocytes, monocytes et neutrophiles primaires (Wang *et coll.,* 2004). 1,25-VitD3 induit aussi l'expression de hCAP18 et LL-37

dans les kératinocytes pendant le processus de cicatrisation (Schauber *et coll.,* 2007), suggérant que LL-37 joue un rôle dans la cicatrisation.

Schauber *et coll.* (2003) ont également montré que l'expression de LL-37 peut être induite par des acides gras à courtes chaînes dans les cellules gastro-intestinales.

En résumé, la régulation de l'expression des défensines et des cathélicidines par divers signaux exogènes (agents microbiens ou nutritionnels) et/ou endogènes (cytokines), ainsi que leur large distribution dans l'organisme suggèrent que ces peptides sont multifonctionnels et peuvent être impliqués dans d'autres processus biologiques autre que la défense immunitaire, comme la prolifération cellulaire et l'inflammation.

Nous allons présenter ci-après les fonctions multiples de ces peptides et leur rôle complexe dans l'inflammation.

I.4. Rôle multifonctionnel des défensines et des cathélicidines

Bien qu'initialement les défensines et les cathélicidines soient connues pour leurs activités antimicrobiennes (De Smet et Contreras, 2005), il est maintenant admis que ces peptides ont d'autres fonctions et sont considérés comme étant des molécules multifonctionnelles (De Smet et Contreras, 2005 ; Lai et Gallo, 2009). La **figure 16** résume les principales fonctions attribuées récemment à ces peptides. Parmi ces fonctions, outre l'activité antimicrobienne directe, il faut citer la neutralisation des endotoxines bactériennes (LPS : LipoPolySaccharides), la modulation de l'inflammation par la régulation de la production des cytokines et des molécules d'adhésion, mais aussi par l'activité chimiotactique. Ces peptides influencent également la prolifération cellulaire, la cicatrisation, la ré-epithélialisation et la néovascularisation.

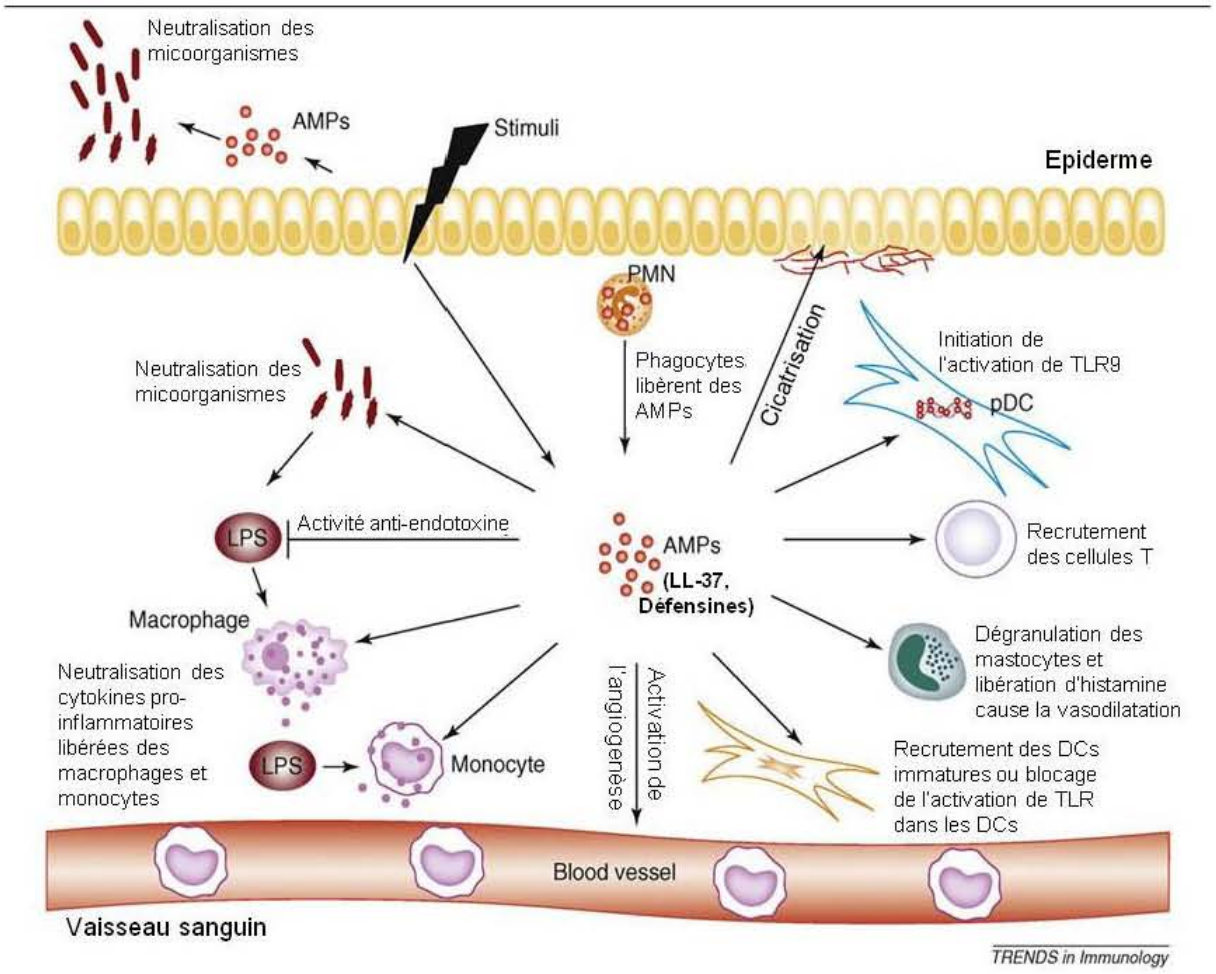


Figure 16 : ***Fonctions multiples des peptides antimicrobiens (AMPs) dans la défense de l'organisme et dans les processus biologiques associés. AMP, peptide antimicrobiens ; DC, cellules dendritiques ; LPS, lipopolysaccharide ; pDC, cellules dendritiques plasmacytoides ; PMN, polymorphonucléocytes ; TLR, Toll-like receptors. Adapté de Lai et Gallo, 2009.***

I.4.1. Neutralisation des endotoxines LPS

Par le biais des interactions électrostatiques, la cathélicidine humaine LL-37 est capable de neutraliser l'activité biologique des endotoxines LPS (Yang *et coll.,* 2001a). En effet, LL-37 se fixe avec une forte affinité sur les LPS et empêche la fixation de ces derniers sur le récepteur CD14. La production des cytokines pro-inflammatoires LPS-dépendantes par la voie CD14/TLR est alors réprimée, et l'activation des monocytes/macrophages est inhibée (Rosenfeld *et coll.,* 2006 ; Mookherjee *et coll.,* 2006). Ce phénomène a été confirmé *in vivo* par des études qui ont montré que le peptide LL-37 confère un effet protecteur contre le choc endotoxique (Gough *et coll.,* 1996 ; De Smet et Contreras, 2005). Ainsi, LL-37 module la réponse immuno-inflammatoire par la voie de neutralisation des LPS.

I.4.2. Défensines et cathélicidines en tant qu'effecteurs inflammatoires

Une inflammation locale (ou aiguë) se caractérise par le recrutement précoce des polynucléaires neutrophiles suivi de celui des monocytes (Soehnlein *et coll.,* 2008) qui se différencient en macrophages. Une fois ces cellules inflammatoires activées, elles sécrètent de nombreux médiateurs inflammatoires. Des études récentes ont montré qu'une déficience en granules spécifiques des neutrophiles, sources des défensines et cathélicidines, est associée à des altérations des fonctions cellulaires, notamment dans la maturation des macrophages, la capacité migratoire des cellules immunes, l'expression des gènes des cytokines, ainsi que la phagocytose chez l'Homme (Shiohara *et coll.,* 2004) et la souris (Tavor *et coll.,* 2002), suggérant le rôle important des défensines et cathélicidines dans le processus d'inflammation.

I.4.2.1. Activité chimiotactique

Les défensines-α et les défensines-β ont une activité chimiotactique qui favorise le recrutement des monocytes, macrophages, mastocytes, cellules T et des cellules dendritiques immatures dans les sites d'inflammation (Yang *et coll.,* 2001b ; Territo *et coll.,* 1989 ; Grigat *et coll.,* 2007 ; Niyonsaba *et coll.,* 2002). En réponse aux différents stimuli, les défensines s'accumulent dans les sites d'infection ou d'inflammation pour former un gradient chimiotactique et contribuer à l'activation de l'immunité adaptative (Yang *et coll.,* 2001a). L'activité chimiotactique des défensines-β (HBD-1 et HBD-2) est médiée par leur interaction avec un récepteur couplé aux protéines G, CCR6 (*récepteur des chimiokines*) (Yang *et coll.,*

1999), comme cela a été montré par l'inhibition de l'activité chimiotactique des défensines-β par des anticorps anti-CCR6. Cependant les récepteurs spécifiques des défensines-α ne sont pas encore identifiés.

Les défensines favorisent aussi le recrutement des cellules effectrices (neutrophiles, monocytes, macrophages, les cellules dendritiques immatures et les cellules T) de manière indirecte (Van Wetering *et coll.,* 1997a ; Van Wetering, 1997b ; Lai et Gallo, 2009). En effet, les défensines induisent l'expression de cytokines et chimiokines comme IL-8, MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) et INT-α (*interféron-α*)) qui à leur tour activent la chimio-attraction des cellules inflammatoires.

Comme les défensines, les cathélicidines LL-37 et CRAMP ont des propriétées chimiotactiques pour les neutrophiles, monocytes et les cellules T (De Yang *et coll.,* 2000 ; Agerberth *et coll.,* 2000 ; Kurosaka *et coll.,* 2005). L'activité chimiotactique de ces peptides semble être médiée par un récepteur couplé aux protéines G, FPRL1 (*formyl peptide receptor like-1*) (De Yang *et coll.,* 2000). Le rôle de LL-37 dans l'activation de l'immunité adaptative se définit aussi par son pouvoir d'induire la dégranulation des mastocytes (Niyonsaba *et coll.,* 2001) et d'activer l'expression de HLA-DR (*human leukocyte antigen-DR*) dans les cellules dendritiques (Bandholtz *et coll.,* 2006).

I.4.2.2. Modulation de l'expression des cytokines, chimiokines et molécules d'adhésion cellulaire

Les défensines et les cathélicidines sont impliquées dans la modulation de l'inflammation par la régulation de l'expression des médiateurs inflammatoires (Elssner *et coll.,* 2004).

Les défensines-α (HNP1-3) peuvent augmenter la production des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α et l'IL-1β, alors qu'elles diminuent la production d'IL-10 dans les monocytes activés (Chaly *et coll.,* 2000). Les HNP1-3 régulent aussi l'adhésion cellulaire en inhibant l'expression de la molécule d'adhésion VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule – 1*) dans les cellules endothéliales *in vitro* (Chaly *et coll.,* 2000), montrant ainsi le potentiel des défensines-α à moduler les réponses inflammatoires locales. Soehnlein *et coll.* (2008) ont récemment montré que les HNP1-3 non seulement activent la phagocytose

bactérienne par les macrophages, mais elles stimulent également la libération des facteurs TNF-α et IFN-γ qui agissent dans une boucle autocrine pour amplifier la phagocytose.

La cathélicidine LL-37 stimule la sécrétion d'IL-1β des monocytes par activation d'un récepteur de nucléotide, $P2X_7$ (Elssner *et coll.,* 2004). En synergie avec IL-1β, LL-37 augmente la production de cytokines (IL-6, IL-10) et chimiokines telles que MCP-1 et MCP-3 (Yu *et coll.,* 2007) dans les monocytes. Dans les kératinocytes humains, HBD2-4 et LL-37 utilisent des récepteurs couplés aux protéines G pour augmenter l'expression des gènes et la production des protéines IL-6, IL-10, IP-10 (*IFN-γ-inducible protein 10*), MCP-1, MIP-3α (*macrophage inflammatory protein-3α*), et RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*) (Niyonsaba *et coll.,* 2007).

Enfin, les défensines et les cathélicidines régulent la production des médiateurs inflammatoires entre autres par l'activation des voies des MAPK (*mitogen activated protein kinase*), ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases*) et p38 (Bowdish *et coll.,* 2004 ; Niyonsaba *et coll.,* 2005 ; Niyonsaba *et coll.,* 2007), et de la voie impliquant NF-κB (Pistolic *et coll.,* 2009).

I.4.3. Rôle dans la cicatrisation

Le phénomène de cicatrisation est un processus biologique dynamique et complexe qui requiert des interactions cellulaires entre une grande variété de cellules comme les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, les kératinocytes et les cellules immunitaires. Ces interactions sont initiées par une série d'activités cellulaires comme la migration, prolifération et différenciation, qui impliquent de nombreux médiateurs dont les facteurs de croissance, les cytokines et les peptides antimicrobiens. LL-37 induit la prolifération des cellules épithéliales (Shaykhiev *et coll.,* 2005) et stimule la ré-épithélialisation et la cicatrisation des tissus cutanés (Heilborn *et coll.,* 2003 ; Shaykhiev *et coll.,* 2005). L'activité régénératrice de LL-37 semble être médiée par les récepteurs EGFR (*epidermal growth factor receptor*) et FPRL1 (Carretero *et coll.,* 2008). Les défensines-β participent à la cicatrisation de part leur rôle dans la stimulation de la migration et la prolifération des kératinocytes en partie au travers les voies EGFR et STAT (*signal transducer and activator of transcription*) (Niyonsaba *et coll.,* 2007). Cela montre le rôle clé

des défensines et cathélicidines dans les processus de prolifération, de migration cellulaire et de régénération des tissus.

I.4.4. Rôle dans l'angiogenèse

La cathélicidine LL-37 a une activité de stimulation de l'angiogenèse au travers du récepteur FPRL1 exprimé par les cellules endothéliales (Koczulla *et coll.,* 2003). La voie de signalisation de LL-37 induit l'expression de certains gènes associés à l'angiogenèse tels que VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et c-IAP-2 (*inhibitor apoptosis protein-2*) (Rodriguez-Martinez *et coll.,* 2008). Le peptide active les cellules endothéliales conduisant à leur prolifération et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.

Une étude récente a montré que HBD-2 stimule la migration, la prolifération et la formation de capillaires de cellules endothéliales humaines *in vitro* (Baroni *et coll.,* 2009), suggérant un rôle pro-angiogénique. Contrairement à HBD-2, les défensines-α semblent avoir une activité anti-angiogénique. Chavakis *et coll.* (2004) ont montré que les HNP1-3 inhibent de manière spécifique l'adhésion, la migration et la prolifération des cellules endothéliales et inhibent l'angiogenèse *in vivo*.

L'ensemble de ces données suggère un rôle des défensines et cathélicidines dans la régulation du système vasculaire.

I.4.5. Rôle dans l'apoptose

L'effet des peptides antimicrobiens sur l'apoptose cellulaire a été récemment rapporté. La cathélicidine LL-37 et la défensine-β3 inhibent l'apoptose des neutrophiles, respectivement par la voie d'activation des récepteurs FPRL1/$P2X_2$ et CCR6 (Nagaoka *et coll.,* 2006 ; Nagaoka *et coll.,* 2008). Cette activité inhibitrice a été associée à la phosphorylation de ERK1/2, l'induction de facteurs anti-apoptotiques (ex. Bcl-X_L) et l'inhibition de l'activité de la caspase-3. Contrairement à l'effet de LL-37 sur les neutrophiles, LL-37 et HNPs induisent l'apoptose des cellules épithéliales primaires des voies respiratoires (Barlow *et coll.,* 2006), des cellules musculaires lisses vasculaires (Ciornei *et coll.,* 2006) et

des cellules T (Aarbiou *et coll.,* 2006), suggérant que l'activité apoptotique de ces peptides est fonction des tissus.

En résumé, les défensines et les cathélicidines jouent un rôle d'effecteurs des réponses immunes et inflammatoires par plusieurs mécanismes, notamment l'activité antimicrobienne directe, l'activité chimiotactique, la régulation de la production et la sécrétion de cytokines, de chimiokines et de molécules d'adhésion, la régulation de la prolifération cellulaire et de la néovascularisation. L'ensemble de ces caractéristiques fonctionnelles fait de ces peptides des effecteurs multifonctionnels qui pourraient jouer des rôles clés dans les pathologies immuno-inflammatoires que nous évoquerons ci-après.

I.5. Implication physiopathologique des défensines et des cathélicidines

I.5.1. Affections cutanées : psoriasis, dermatite atopique

Le rôle des peptides antimicrobiens dans les maladies infectieuses et inflammatoires humaines a été initialement mis en évidence dans les affections cutanées. Une induction de l'expression de la défensine-β2 et de la cathélicidine LL-37 a été démontrée dans l'épithélium cutané des patients atteints de psoriasis, une affection inflammatoire chronique et auto-immune de la peau (Frohm *et coll.,* 1997). Cela explique au moins en partie l'immunisation des lésions cutanées observée chez les patients atteints de psoriasis (Harder *et coll.,* 1997). D'autre part, LL-37 et HBD-2 sont faiblement exprimées dans les lésions de dermatite atopique en comparaison avec les lésions psoriasiques (Ong *et coll.,* 2002). Cela pourrait s'expliquer par le fait que les cytokines IL-4, IL-10 et IL-13 inhibent l'expression des peptides antimicrobiens dans les dermatites atopiques avec une augmentation du risque récurrent d'infections cutanées (Nomura *et coll.,* 2003 ; Howell *et coll.,* 2005).

I.5.2. Maladies gastro-intestinales inflammatoires (maladie de Crohn)

La maladie de Crohn est une pathologie inflammatoire chronique du tractus intestinal, caractérisée par une déficience des réponses antibactériennes. Elle semble être associée à des marqueurs d'inflammation comme la CRP et le TNF-α (Yamaguchi *et coll.,* 2009). Des études menées sur des patients atteints de cette maladie ont mis en évidence une association entre une mutation au niveau du récepteur NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*) et une diminution de l'expression des défensines entériques HD-5 et HD-6, ainsi qu'un faible nombre de copies de gène de HBD-2 chez ces patients (Wehkamp *et coll.,* 2004 ; Fellermann *et coll.,* 2006). Cette relation a été ensuite confirmée chez des souris déficientes en NOD2 (Kobayashi *et coll.,* 2005). Récemment, une étude épidémiologique a montré que le taux circulant des défensines HNP1-3 est significativement élevé chez des patients atteints de la maladie de Crohn comparé aux contrôles (Yamaguchi *et coll.,* 2009). Ces observations suggèrent un lien entre les défensines et la maladie de Crohn.

I.5.3. Les cancers

Il a été rapporté que des altérations de l'équilibre entre les processus de l'immuno-activation et l'immuno-suppression au cours de la croissance tumorale constitue un mécanisme de résistance des tumeurs à la destruction immunitaire (Tien *et coll.,* 2005). En ce sens, il a été montré que l'expression de la défensine HBD-1 est inhibée dans des biopsies de prostates cancéreuses ou de carcinomes rénaux (Donald *et coll.,* 2003), suggérant que HBD-1 pourrait avoir des activités anti-tumorales et qu'un défaut de son expression favoriserait la tumorigénèse. Cette hypothèse a été confortée par une étude récente qui a montré que la surexpression de HBD-1 induit la mort de lignées de cellules cancéreuses de prostate, alors que les cellules de prostates saines ne sont pas affectées (Bullard *et coll.,* 2008). Bien que les mécanismes d'implication des défensines dans l'oncogenèse ne soient pas encore clairs, HBD-1 semble s'accumuler de manière spécifique dans le noyau des cellules des tumeurs malignes, suggérant un rôle de HBD-1 dans la régulation des gènes oncogènes (Wenghoefer *et coll.,* 2008). Par ailleurs, les HNP1-3 sont exprimées dans le carcinome rénal et stimulent la croissance des cellules cancéreuses rénales (Muller *et coll.,* 2002). En plus des taux d'expression élevés de HNP1-3 chez les patients atteints de maladies inflammatoires gastro-intestinales (Yamaguchi *et coll.,* 2009), une étude récente suggère que les peptides HNP1-3 peuvent être des biomarqueurs des cancers gastriques (Mohri *et coll.,* 2009). La cathélicidine LL-37 joue un rôle dans la cicatrisation et l'angiogenèse, deux processus qui partagent les caractéristiques biologiques et fondamentales de la croissance et la progression tumorale (Hussain *et coll.,* 2007). Il a été montré que le peptide LL-37 est surexprimé dans les cellules mammaires cancéreuses et son taux d'expression est corrélé avec la progression tumorale (Heilborn *et coll.,* 2005). Les mêmes auteurs ont récemment montré que le peptide LL-37 active le phénotype métastasique du cancer de seins (Weber *et coll.,* 2009). D'autres études ont également rapporté une surexpression de LL-37 dans d'autres formes de cancers (ovaires, poumons) où il pourrait favoriser la croissance tumorale (Von Haussen *et coll.,* 2008 ; Coffelt *et coll.,* 2008 ; 2009a ; 2009b). Il semble que LL-37 joue un rôle de facteur de croissance *via* l'activation du récepteur FPRL1, EGFR et la voie des MAP kinases. Les défensines et les cathélicidines pourraient donc jouer un rôle potentiel dans les mécanismes physiopathologiques des cancers.

En résumé, les défensines et les cathélicidines semblent être associées à des pathologies inflammatoires comme les affections cutanées, gastro-intestinales et les cancers.

II.Peptides antimicrobiens et processus immuno-inflammatoire des maladies cardiovasculaires

II.1. Définition et épidémiologie des maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires constituent un ensemble de troubles affectant le système circulatoire (cœur et vaisseaux) qui sont souvent liés à l'athérosclérose infraclinique et se développent progressivement sous l'influence de facteurs génétiques et environnementaux (ANAES, 2004). Il peut s'agir de maladies coronariennes, accidents vasculaires cérébraux, pathologies vasculaires périphériques ou de l'insuffisance cardiaque. Les affections cardiovasculaires sont étiologiquement complexes, multifactorielles et d'importance majeure en santé publique (Poulter, 1999) car elles constituent, avec les cancers, l'une des premières causes de mortalité dans les pays industrialisés, et leur prévalence ne cesse de progresser dans les pays en voie de développement (Mehta *et coll.,* 1998).

II.2. Facteurs de risque cardiovasculaire

De nombreux facteurs de risque environnementaux et de prédispositions génétiques contribuent au développement des maladies cardiovasculaires athérosclérotiques (Poulter, 1999). Nous pouvons distinguer d'une part des facteurs **constitutionnels** (non modifiables) comme l'âge, le sexe ou la génétique et d'autre part, des facteurs **modifiables**, c'est-à-dire sur lesquels il est possible d'agir, comme les dyslipidémies (élévation des taux circulants de cholestérol total ; de LDL-cholestérol ; de triglycérides et diminution des taux de HDL-cholestérol), l'hypertension artérielle, le diabète et l'obésité. Les facteurs environnementaux tels que le tabac, l'alcool, la sédentarité et le stress en font également partie. Bien que ces facteurs soient associés à un risque cardiovasculaire bien établi, il est important de noter que de nombreuses études cliniques et épidémiologiques montrent que ces facteurs de risque ne permettent de prédire qu'une partie des accidents cardiovasculaire et n'expliquent pas à eux

seuls la variabilité inter-individuelle de risque de ces maladies. D'autres facteurs de risque ont été suggérés et discutés comme les marqueurs d'inflammation et les agents infectieux (Mehta *et coll.,* 1998).

Du fait du caractère complexe et multifactoriel de ces maladies, la prise en compte des interactions entre les différents facteurs de risque et les interactions de type gènes-environnement peut permettre de mieux comprendre la physiopathologie cardiovasculaire. La complexité de ces maladies et leur progression dans la population générale justifie l'importance d'identifier de nouveaux biomarqueurs cliniques permettant d'évaluer le risque en fonction des facteurs de prédisposition.

II.3. Physiopathologie cardiovasculaire

De nombreuses voies biologiques sont susceptibles de contribuer au développement et à la progression des maladies cardiovasculaires, notamment au processus athérosclérotique de ces maladies, comme le métabolisme des lipides et des lipoprotéines, le métabolisme du glucose, la croissance cellulaire, l'inflammation, le système immunitaire, l'adhésion cellulaire, la coagulation et le stress oxydant. Le système immuno-inflammatoire est particulièrement intéressant car le rôle des médiateurs inflammatoires et des cellules immunitaires a été mis en évidence dans les étapes d'initiation, de progression et de complications de la plaque d'athérome (Greaves et Channon, 2002 ; Hansson et Libby, 2006a). D'ailleurs, après le contrôle de l'homéostasie lipidique, la régulation de l'immuno-inflammation vasculaire est de plus en plus la cible majeure dans la thérapie de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires (Greaves et Channon, 2002).

II.3.1. Athérosclérose et inflammation

La première étape du processus athéromateux est l'accumulation et l'oxydation des particules LDL dans l'espace sous-endothélial (Napoli *et coll.,* 1997) suite à un dysfonctionnement de la paroi des cellules endothéliales (Sattar, 2004). L'accumulation et l'oxydation des LDL dans l'intima est suivie par l'activation de l'adhésion et la pénétration des leucocytes du sang périphérique à travers la paroi endothéliale. Une fois dans l'espace sous-endothélial, les monocytes se différencient en macrophages qui vont capter et

internaliser de grandes quantités de LDL oxydées pour donner naissance à des cellules spumeuses, précurseurs des stries lipidiques. De plus, les cellules inflammatoires, notamment les macrophages en contact avec les LDL oxydées dans l'espace sous-endothélial, sont à l'état actives et sécrètent une grande variété de médiateurs inflammatoires comme les cytokines pro-inflammatoires dont les principales sont l'IL-1, TNF-α et IL-6. Ces cytokines pro-inflammatoires favorisent le recrutement de nouveaux leucocytes en stimulant la production de chimiokines, telle MCP-1, par les cellules de la plaque en formation, ainsi que leur adhésion en induisant la production de molécules d'adhésion cellulaire (ICAM-1, VCAM-1 et les sélectines). L'ensemble de ces phénomènes assure ainsi l'entretien d'une réaction inflammatoire chronique au niveau vasculaire (Sattar, 2004 ; Ross, 1999).

Le processus inflammatoire est impliqué dans toutes les étapes de l'athérogenèse (initiation et progression) (Hansson, 1989 ; Ross 1999 ; Libby, 2002) (**Figure 17**). Outre les liporotéines modifiées, il a été suggéré que les infections stimulent l'inflammation et semblent être impliquées dans le développement de l'athérosclérose (Albert, 2000). Parmi les agents infectieux, *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, C*ytomegalovirus*, et le virus de *l'herpès* ont été associés à une augmentation du risque d'athérosclérose et des maladies de l'artère coronaire (Armitage, 2000 ; Pesonen *et coll.,* 2009).

Du fait que l'accumulation des lipides athérogènes et l'inflammation chronique sont deux phénomènes qui co-existent dans le processus athérosclérotique, le processus inflammatoire est maintenant qualifié de lien entre les dislipidémies et les complications cardiovasculaires de l'athérosclérose. En plus de son implication directe dans l'athérosclérose, l'inflammation est associée à l'hypertension artérielle, le diabète et l'obésité, facteurs de risque de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires.

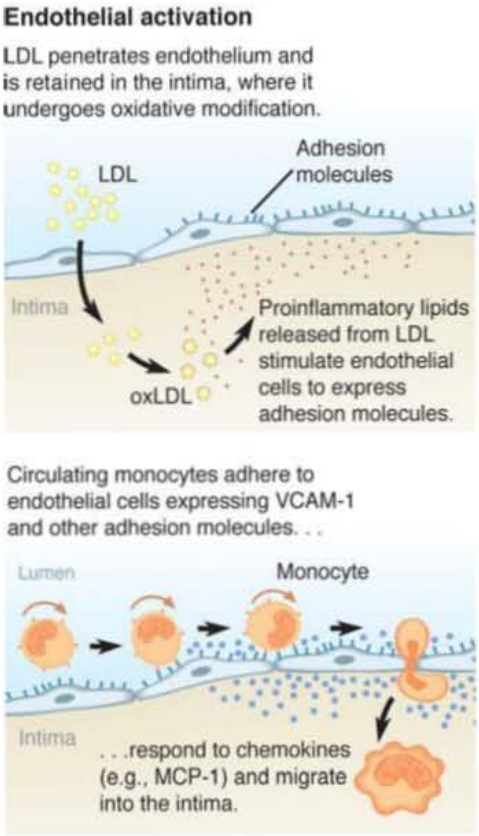


Figure 1

Les macrophages, qui sont en quantité abondante dans l'athérome, sont recrutés à partir des monocytes sanguins qui pénètrent à travers la surface endothéliale. Dans des lésions plus avancées, les micro-vaisseaux de la plaque pourraient aussi véhiculer des monocytes permettant l'entrée de ces derniers. De nombreuses chimiokines et molécules d'adhésion leucocytaires contrôlent le processus de recrutement, qui est suivi par la différenciation des monocytes en macrophages. Durant ce processus, des récepteurs de reconnaissance tels que les récepteurs *scavenger* (ScRs), sont activés. ScRs médient l'internalisation des LDLox (*oxidized Low-density Lipoproteins*) et conduit à l'internalisation du cholestérol dérivé des LDL et la formation des cellules spumeuses. D'autres macrophages sont stimulés pour activation par l'interféron-γ (IFN-γ), une cytokine des cellules T. Ces macrophages sont activés par des molécules agonistes des récepteurs TLRs (*Toll-Like Receptors*) et par des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 et TNF. Par conséquent, les macrophages activés libèrent des médiateurs pro-inflammatoires endogènes, incluant des espèces réactives d'oxygène et de nitrogène, des cytokines pro-inflammatoires, des molécules vaso-actives, et de nombreuses protéases.

***Abréviations** : Th1, Thelper-1 ; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1 ;M-CSF, macrophage-colony-stimulating factor ; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1; HSP60, heat shock protein 60.*

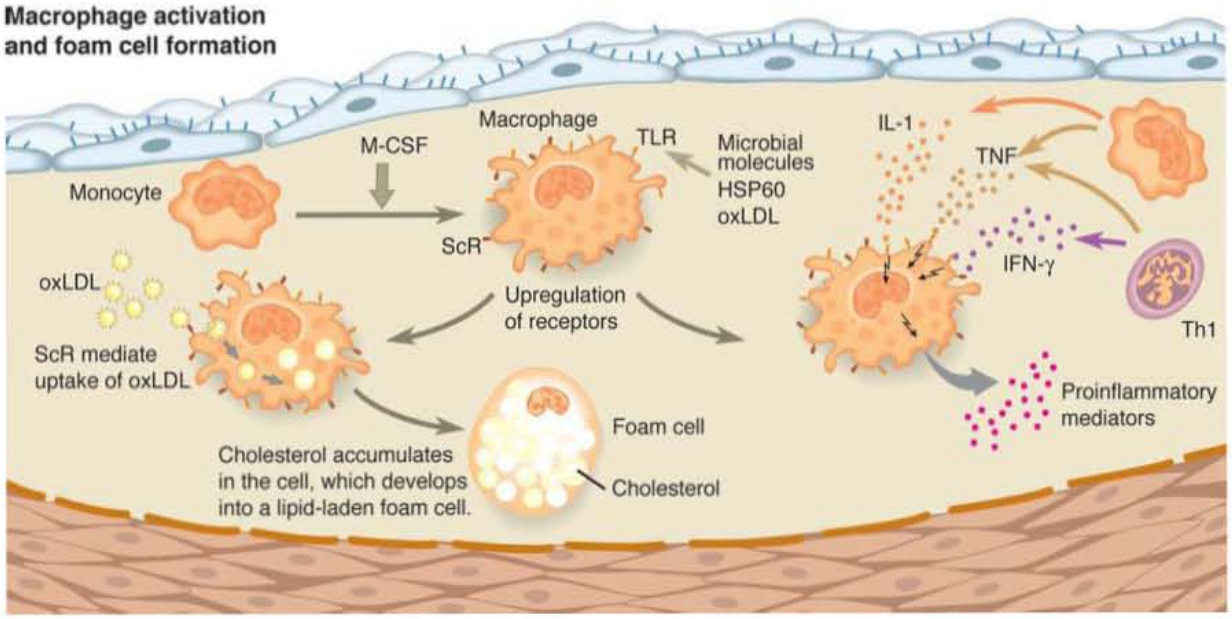


Figure 17 : ***Recrutement et activation des macrophages et formation des lésions d'athérosclérose (Hansson et coll., 2006b).***

II.3.2. Obésité, dyslipidémies, diabètes, hypertension artérielle, et inflammation

L'obésité est un facteur de risque cardiovasculaire majeur étroitement lié à des anomalies métaboliques et vasculaires telles que les dyslipidémies, l'hypertension artérielle, l'insulinorésistance et le diabète qui sont autant de facteurs jouant un rôle important dans le développement et l'accélération des maladies cardiovasculaires athérosclérotiques (Arsenault *et coll.,* 2007). Des arguments épidémiologiques et physiopathologiques démontrent clairement que les individus obèses ont un risque significativement élevé de développer le diabète, l'hypertension ou des complications cardiovasculaires (Rahmouni *et coll.,* 2005 ; Hall, 2003 ; Sironi *et coll.,* 2004). Cette association entre l'obésité et le risque cardiovasculaire semble être attribuée à des activités lipolytiques exacerbées dans les cellules adipeuses viscérales, avec une augmentation de l'afflux des acides gras libres dans la circulation (Cederberg et Enerback, 2003) et la libération des adipocytokines liées à l'athérogenèse (Wang *et coll.,* 2007).

Une inflammation de bas-niveau, dite aussi de « bas-grade » avec une élévation des taux circulant de nombreuses cytokines et protéines de la phase aigue est caractéristique de l'obésité, de l'insulinorésistance et du diabète de type 2. Ces conditions pro-inflammatoires sont liées de manière causale au développement des maladies cardiovasculaires prématurées (Van Gaal *et coll.,* 2006 ; Hotamisligil, 2006) (**Figure 18**). En effet, l'obésité abdominale est caractérisée par une élévation modérée, mais chronique, des taux circulants de médiateurs inflammatoires comme la protéine CRP, la protéine antifibrinolytique PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*), des cytokines (ex. TNF-α), des interleukines (ex. IL-6) et des métalloprotéinases (Ghanim *et coll.,* 2004 ; Yudkin, 2003). Une étude récente a montré qu'une forte réduction de poids corporel chez des patients fortement obèses était associée à une diminution des taux circulant des cytokines IL-6 et CRP, mais aussi de **défensines-α** (Manco *et coll.,* 2007), suggérant un lien entre les éléments du système immunitaire inné et l'obésité.

Le tissu adipeux a acquis le statut de glande endocrine qui sécrète de nombreux médiateurs inflammatoires comme les cytokines, appelées adipokines, dotées de multiples activités biologiques de type auto-, para-, et endocrine. Outre les adipocytes, le tissu adipeux est constitué d'une fraction stromale vasculaire composée en grande partie de cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes,…) (**Figure 18**). Des études comparatives ont

clairement démontré que les cellules immunes, notamment les macrophages et lymphocytes qui infiltrent le tissu adipeux constituent une source majeure des cytokines dans ce tissu (**Figure 18**), à l'exception de l'adiponectine et de la leptine. Cela suggère que le système immunitaire inné jouerait un rôle central dans la perpétuation de l'inflammation associée à l'obésité et à ses complications.

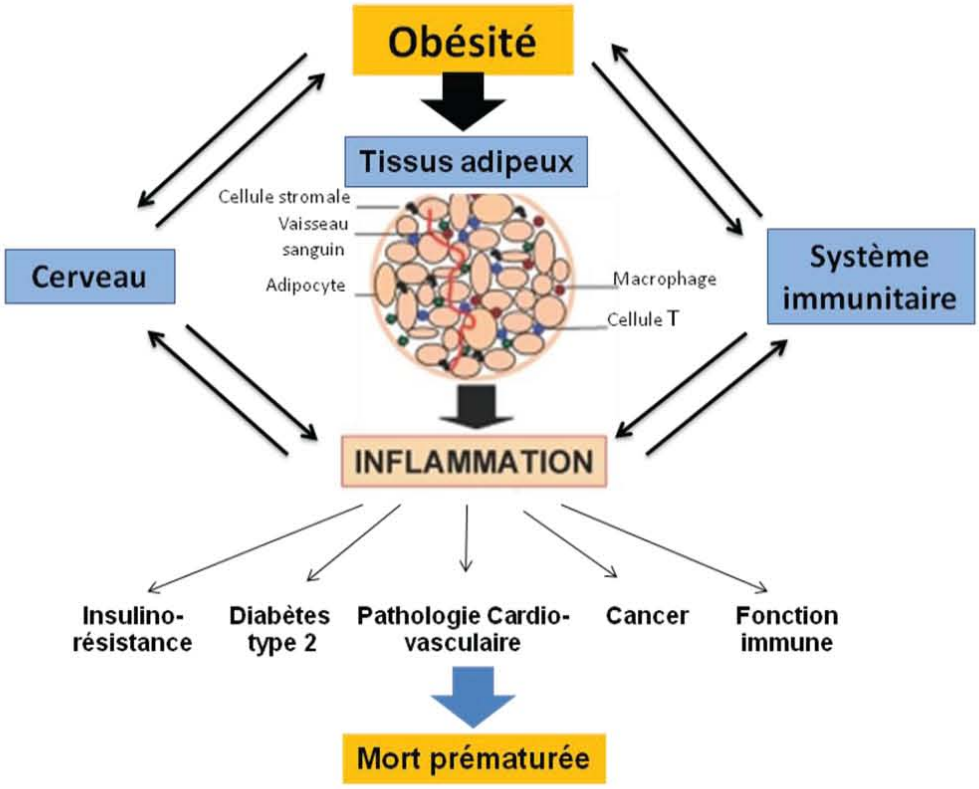


Figure 18 : ***Schéma résumant les interactions entre le tissu adipeux et le système immuno-inflammatoire durant l'obésité et ses complications. Adapté de Dixit, 2008.***

II.3.3. Le syndrome métabolique et l'immuno-inflammation

L'augmentation des taux circulants des acides gras libres chez les obèses peut induire des altérations des voies de signalisation de l'insuline conduisant à l'insulinorésistance dans les tissus périphériques (Shah, 2007). De plus, l'obésité abdominale et l'insulinorésistance sont considérées comme étant les facteurs centraux du syndrome métabolique, un état pré-pathologique qui augmente fortement le risque de diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires (Haffner et Taegtmeyer, 2003 ; Eckel *et coll.,* 2005).

Le syndrome métabolique est défini comme étant la résultante d'un ensemble de facteurs incluant l'insulinorésistance, la dyslipidémie, l'hypertension, et l'obésité abdominale

(Grundy *et coll.,* 2004). De plus, l'inflammation constitue aussi une composante majeure du risque de syndrome métabolique. De nombreuses études ont montré qu'une activation de l'immunité innée et une inflammation chronique sont associées au syndrome métabolique et pourraient constituer un lien entre les altérations associées au syndrome métabolique et l'athérosclérose (Pickup, 2004). En effet, les taux circulants de la CRP et des cytokines comme IL-6, IL-18 et TNF-α ont été associés aux facteurs du syndrome métabolique (Hak *et coll.,* 2001 ; Hung *et coll.,* 2005). Des études récentes menées sur un modèle animal obèse ont montré que les acides gras libres peuvent activer le récepteur de l'immunité innée TLR-4, conduisant à l'inflammation et à l'insulinorésistance vasculaire (Kim *et coll.,* 2007).

En résumé, le système immuno-inflammatoire constitue un facteur central et commun aux différents processus biologiques participant au développement des maladies cardiovasculaires. Sous l'influence de différents facteurs, des altérations immuno-inflammatoires peuvent conduire au développement du risque du syndrome métabolique et des maladies cardiovasculaires. Ce lien semble impliquer des interactions entre le système immunitaire et de nombreuses voies métaboliques. Dans ce contexte, des données récentes suggèrent que les peptides antimicrobiens, effecteurs multifonctionnels du système immunitaire inné, pourraient être associés à la physiopathologie de l'athérosclérose.

II.4. Défensines, cathélicidines et risque d'athérosclérose

Il est bien établi que la dysfonction endothéliale et l'interaction des cellules immunes avec la paroi vasculaire est le mécanisme causal de l'initiation et du développement de l'athérosclérose. Ce mécanisme est caractérisé par l'activation cellulaire et la libération d'effecteurs immuno-inflammatoires par les leucocytes qui sont recrutés en quantité abondante au niveau des lésions athérosclérotiques. Les médiateurs pro-inflammatoires libérés modulent la fonction endothéliale et entretiennent une inflammation chronique au niveau vasculaire, favorisant ainsi le développement de l'athérosclérose et les complications cardiovasculaires.

Parmi les cellules impliquées, on note les macrophages qui régulent les fonctions et le dysfonctionnement des cellules endothéliales par la libération de médiateurs pro-inflammatoires (Sattar, 2004 ; Hingorani, 2000). En plus des macrophages, d'autres études ont montré que le taux des neutrophiles circulants est significativement corrélé avec l'athérosclérose (Weijenberg *et coll.,* 1996 ; Zalokar, 1981). De plus, la concentration en neutrophiles est très élevée dans les plaques d'athérosclérose (Mohacsi et *coll.,* 1996). L'activation de ces neutrophiles conduit à la génération de nombreuses substances telles que les espèces réactives de l'oxygène et les peptides antimicobiens. Parmi ces peptides, nous trouvons : les **défensines** et les **cathélicidines**. Des études expérimentales et anatomopathologiques sur des lésions d'athérosclérose ont montré une surexpression et une accumulation des défensines-α (**Figure 19**) et de la cathélicidine LL-37 (**Figure 20**) dans les lésions d'athérosclérose au niveau des vaisseaux cérébraux et coronariens humains (Higazi *et coll.,* 1997 ; Barnathan *et coll.,* 1997 ; Edfeldt *et coll.,* 2006).

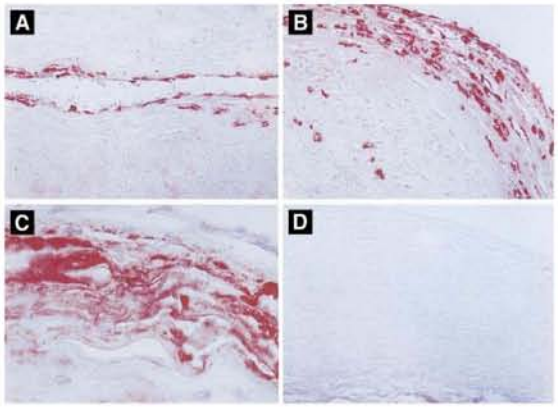


Figure 19 : ***Accumulation des défensines-α au niveau des lésions artérielles d'athérosclérose. L'expression des défensines-α (en pourpre), déterminée par immunohistochimie, est proportionnelle à l'épaississement intimal des artères, respectivement en A, B et C, par comparaison au contrôle (D). (Higazi et coll., 1997).***

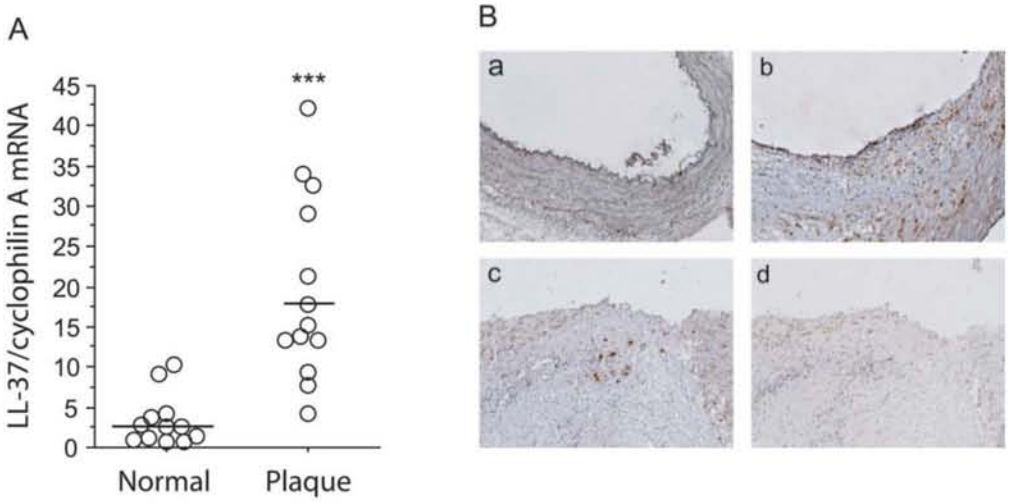


Figure 20 : ***Surexpression de LL-37 dans des lésions athérosclérotiques. A) Transcrits de hCAP18/LL-37 dans des vaisseaux sains (contrôle) ou des lésions d'athérosclérose, déterminés par RT-PCR en temps réel. B) expression du peptide LL-37 (en marron) dans des vaisseaux sains (Ba) ou des lésions athérosclérotiques (Bb and Bc), déterminée par la technique d'immunohistochimie, par rapport au contrôle (Bc). (Edfeldt et coll., 2006).***

L'ensemble de ces observations suggère un lien entre les défensines et cathélicidines et le processus athérosclérotique. D'autres études expérimentales ont suggéré l'implication des défensines (**Figure 21**) et de la cathélicidine (**Figure 22**) dans la physiopathologie de l'athérosclérose par le biais de différents mécanismes (Kougias *et coll.,* 2005), que nous évoquons ci-après.

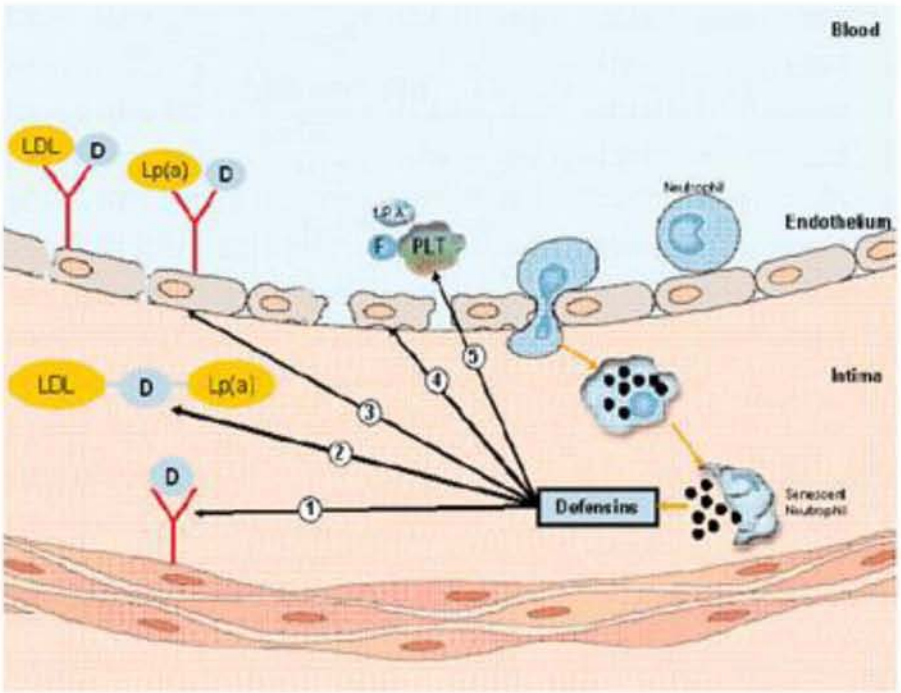


Figure 21 : ***Propositions de différents mécanismes à travers lesquels les défensines affecteraient l'homéostasie vasculaire : 1) La fixation des défensines modifie l'activité des cellules musculaires lisses. 2) La fixation des défensines aux particules LDL et Lp(a) forme des complexes favorisant l'accumulation des lipoprotéines dans l'intima. 3) Augmentation de l'internalisation des LDL et de Lp (a), et 4-5) l'altération de l'endothélium via l'inhibition du NO. (Kougias et coll., 2005).***
F : Fibrinogène, D : Défensines, PLT : plaquettes sanguines, NO : oxyde nitrique.

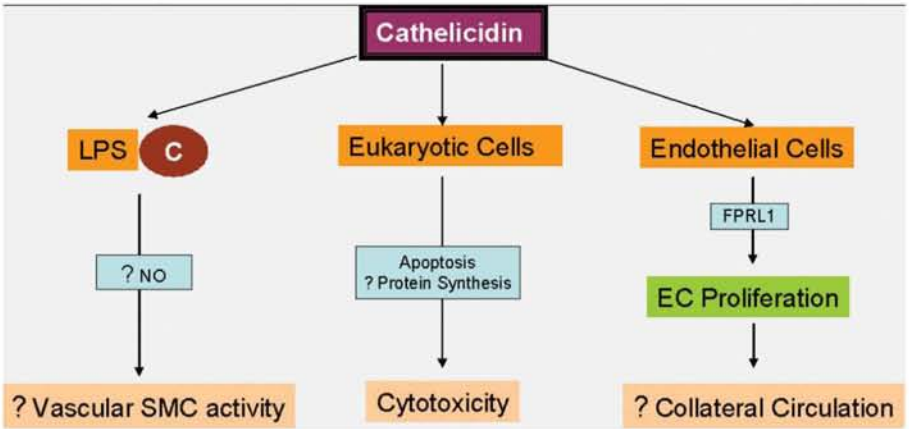


Figure 22 : ***La cathélicidine LL-37/hCAP-18 pourrait affecter les fonctions vasculaires par de nombreux mécanismes : 1) altération de production de NO et donc altération des cellules musculaires lisses en réponse aux LPS, 2) inhibition de la synthèse protéique et promotion de l'apoptose, 3) induction de la néovascularisation et de la circulation collatérale (Kougias et coll., 2005). C : cathélicidine, NO : oxyde nitrique, SMC : cellules musculaires lisses, EC : cellules endothéliales.***

II.4.1. Rôle des peptides antimicrobiens dans le métabolisme des lipides et des lipoprotéines

Les études menées par Higazi et coll. (1997) ont indiqué que les interactions défensines-lipoprotéines pourraient constituer un nouveau lien entre deux phénomènes qui co-existent dans le processus d'athérosclérose, à savoir une inflammation chronique et une accumulation des lipides dans la paroi vasculaire. Ce groupe de chercheurs a été le premier à mettre en évidence le rôle des défensines dans le métabolisme et l'interaction des lipoprotéines avec les cellules vasculaires *in vitro*. Ils ont montré que les défensines stimulent la fixation des lipoprotéines (a) [Lp (a)] sur les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (**Figure 23**), ainsi que leur internalisation par ces cellules. Cependant, les particules Lp (a) internalisées ne sont pas dégradées, provoquant alors une accumulation des lipoprotéines dans les cellules. Immédiatement après cette découverte, Bdeir *et coll.* (1999) ont montré que les défensines forment des complexes stables avec les particules Lp(a) et LDL (**Figure 24**). Les complexes ainsi formés restent dans la matrice extracellulaire conduisant à l'accumulation des lipides à cet endroit. D'autres études portant sur les mécanismes d'interaction défensines-lipoprotéines ont montré que les défensines stimulent la fixation et la dégradation des LDL par les cellules endothéliales *via* les peptidoglycanes (Higazi *et coll.,* 2000). En présence des défensines, les LDL semblent être préférentiellement métabolisées par la voie dépendante des peptidoglycanes qui est beaucoup moins efficace que la voie des récepteurs LDL (LDL-R). L'ensemble de ces études a clairement montré que les défensines participent au métabolisme des LDL et Lp(a), un processus qui pourrait favoriser l'accumulation de lipoprotéines athérogènes au niveau vasculaire.

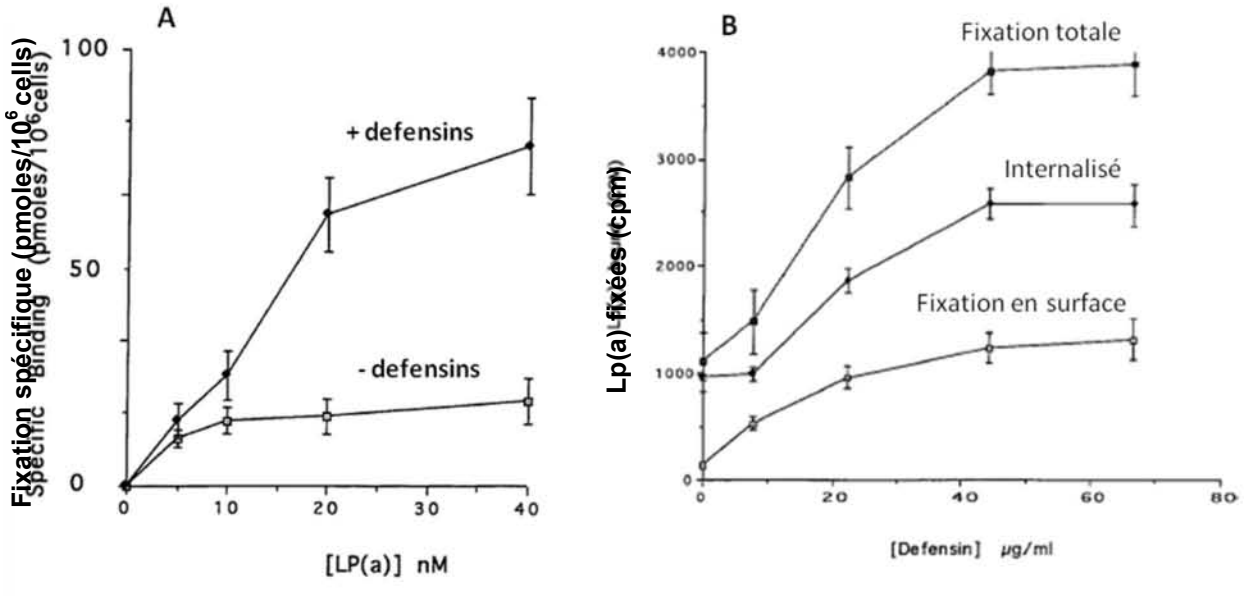


Figure 23 : ***Les défensines stimulent la fixation (A) et l'internalisation (B) des lipoprotéines (a) [Lp (a)] par les cellules vasculaires endothéliales et musculaires lisses (Higazi et coll., 1997).***

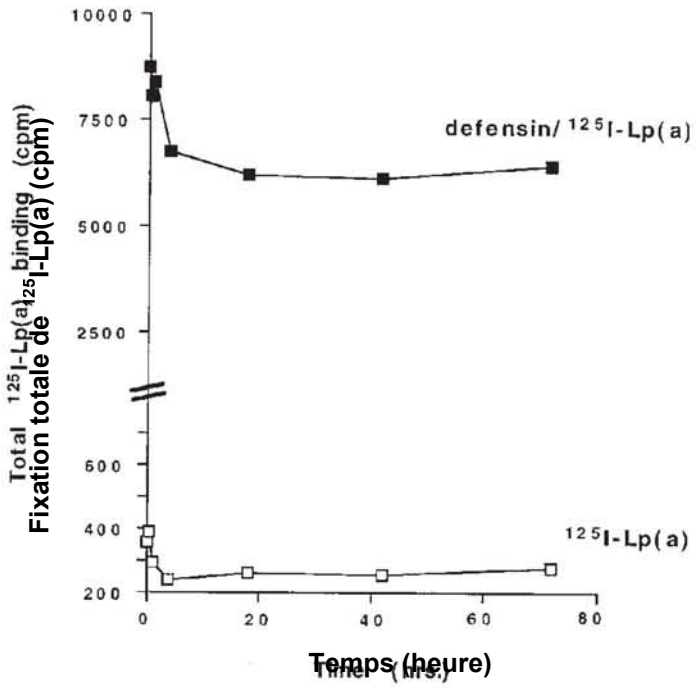


Figure 24 : ***Fixation des défensines et des complexes défensine-Lp(a) sur la matrice des cellules vasculaires endothéliales (HUVEC) (Bdeir et coll., 1999).***

II.4.2. Dysfonctionnement vasculaire

L'implication des défensines dans les fonctions vasomotrices a été initialement montrée par une série d'études expérimentales réalisées par Nassar *et coll.* (2002). Il a été démontré que les défensines-α se fixent sur les cellules musculaires lisses vasculaires *via* le récepteur des LDL, LRP (*LDL receptor-related protein/a2 macroglobulin receptor*). Après leur internalisation, les défensines interagissent avec la protéine kinase C inhibant la mobilisation intracellulaire du calcium et interfèrent avec la contraction des cellules musculaires vasculaires. De plus, les auteurs ont observé que les défensines-α inhibent la contraction des sections d'aorte dénudées de rat (*ex-vivo*) (Nassar *et coll.,* 2002), alors qu'elles induisent un effet inverse sur des vaisseaux sanguins intacts (Nassar *et coll.,* 2007), suggérant un effet de ces peptides sur le tonus vasculaire de manière endothélium-dépendante. Dans le même contexte, Kougias et coll. (2006) ont montré que les défensines-α provoquent le dysfonctionnement endothéliale des artères coronaires chez le porc de manière endothélium-dépendante, un effet qui est associé à des altérations dans la production des radicaux superoxydes et celle de la protéine oxyde nitrique synthétase dans les artères coronaires.

Comme les défensines, la cathélicidine LL-37 est surexprimée au niveau des lésions athérosclérotiques. De plus, LL-37 induit l'expression des molécules d'adhésion et des chimiokines dans les cellules endothéliales (Edfeldt *et coll.,* 2006) et induit la mort des cellules musculaires lisses vasculaires (Ciornei *et coll.,* 2006), suggérant un effet sur la régulation de l'inflammation vasculaire. Récemment, Berkestedt et coll. (2008) ont rapporté pour la première fois que le peptide LL-37 peut induire l'altération du tonus vasculaire, probablement par une altération de la production de l'oxyde nitrique. L'effet de LL-37 semble être médié par un mécanisme impliquant le récepteur FPRL1.

II.4.3. Fibrinolyse

Les défensines ont une activité antifibrinolytique et pourraient jouer un rôle dans les mécanismes de thrombose vasculaire. Les défensines-α se fixent sur la fibrine et le plasminogène et contribuent à l'inhibition de la fibrinolyse en inhibant le facteur tissulaire activateur de plasminogène de manière dose-dépendante (Higazi *et coll.,* 1996), un processus

qui favorise le développement de lésions d'athérosclérose (Nassar *et coll.,* 2007). En effet, la relation entre les défensines et la voie de fibrinolyse semble être particulièrement intéressante du fait de son rôle possible dans la régulation des fonctions des cellules vasculaires. Il a été montré que le facteur tissulaire activateur de plasminogène régule le tonus des vaisseaux sanguins (Nassar *et coll.,* 2004).

II.4.4. Angiogenèse

La néovascularisation est le pocessus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins. L'angiogenèse est la forme prédominante de la néovascularisation dans l'athérosclérose (Carmeliet, 2003), contribuant au développement et à la progression des plaques d'athérome (Moreno *et coll.,* 2006). Dans ce contexte, il est intéressant de noter que les défensines-α et la cathélicidine LL-37 s'accumulent au niveau des lésions d'athérosclérose et elles jouent un rôle dans la régulation de l'angiogenèse. La cathélicidine LL-37 a une activité angiogénique favorisant la néovascularisation, en partie *via* le récepteur FPRL1 (Koczulla *et coll.,* 2003).

II.4.5. Diabètes

Chez les patients diabétiques, la présence d'une néphropathie a été associée à l'insulino-résistance et l'inflammation (Orchard *et coll.,* 2002 ; Saraheimo *et coll.,* 2003). Dans ce contexte, les défensines HNP1-3, effecteurs immuno-inflammatoires, ont été récemment associées à la néphropathie diabétique chez des patients diabétiques de type 1 (Saraheimo *et coll.,* 2008). Les auteurs ont aussi montré que le taux circulant de HNP1-3 est positivement associé au taux de cholestérol total et à la pression artérielle systolique et négativement avec le taux de HDL-C. De plus, Joseph *et coll.* (2008) ont non seulement confirmé l'association des HNP1-3 circulant avec la néphropathie diabétique, mais ils ont également montré par une analyse prospective que le taux circulant des HNP1-3 pourrait être un marqueur de risque clinique de la morbidité et mortalité cardiovasculaire des patients diabétiques.

De nombreuses études ont démontré que les sujets diabétiques sont fortement sensibles aux infections (Sheetz et King, 2002 ; Hill *et coll.,* 1989). Cette observation a été associée à des altérations fonctionnelles des cellules immunes, et plus particulièrement à une

inhibition de l'expression des défensines. L'expression de la défensine-β1 est significativement réprimée dans les reins des modèles animaux diabétiques (Hiratsuka *et coll.,* 2001). De plus, Jurevic *et coll.* (2003) ont montré qu'un polymorphisme génétique dans le promoteur du gène de la défensine-β1 humaine est significativement associé à l'infection orale et à la charge microbienne chez les patients diabétiques. L'ensemble de ces observations suggère un lien potentiel entre les gènes des défensines et le diabète.

Il a été observé également que ces peptides s'accumulent dans des tissus périphériques comme la peau où le taux est significativement corrélé avec la sévérité des maladies de l'artère coronaire (Nassar *et coll.,* 2007). Ces auteurs ont montré que l'accumulation des défensines-α au niveau cutané constitue un indicateur indépendant de risque des maladies de l'artère coronaire. Récemment, il a été montré que l'incidence des facteurs de risque cardiovasculaire ainsi que le risque de survenue des maladies vasculaires est significativement élévé chez des patients avec le psoriasis, qui est une affection inflammatoire cutanée caractérisée par une induction de l'expression des défensines et de la cathélicidine LL-37 au niveau des lésions (Prodanovich *et coll.,* 2009 ; Girolomoni et Gisondi, 2009).

L'ensemble de ces observations suggère qu'en plus de leur surexpression dans les lésions d'athérosclérose, les défensines, notamment les défensines-α, et les cathélicidines semblent être associées à des processus biologiques comme le métabolisme des lipoprotéines, l'inflammation vasculaire, la prolifération des cellules vasculaires dont les altérations contribuent au développement des maladies cardiovasculaires et du diabète. Toutefois, il existe très peu d'informations sur les relations qui pourraient exister entre l'expression de ces peptides et les facteurs de risque cardiovasculaire et du syndrome métabolique, à savoir l'adiposité, les altérations de l'homéostasie des lipides et du glucose circulant et l'hypertension artérielle. De plus, étant donné que les défensines et les cathélicidines présentent des niveaux d'expression significativement élevés, aussi bien dans des tissus périphériques que dans la circulation des patients à risque cardiovasculaire, ils pourraient constituer de nouveaux biomarqueurs cliniques de risque cardiovasculaire.

III.Récepteurs de molécules chimio-attractantes : *« Formyl Peptide Receptors (FPRs) »*

Il est reconnu que les défensines et les cathélicidines modulent de nombreuses fonctions cellulaires par des mécanismes multiples impliquant des interactions avec des récepteurs comme les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). En effet, l'activité chimiotactique de la cathélicidine LL-37 ou encore son effet sur l'apoptose cellulaire sont médiés par l'activation d'un récepteur de la famille FPRs (*N-Formyl Peptide Receptors*), appartenant à la grande famille des récepteurs RCPG (De Yang *et coll.,* 2000).

III.1. Description des récepteurs FPRs

Le récepteur humain FPR est le premier récepteur de molécules chimio-attractantes, présent à la surface des neutrophiles, à avoir été caractérisé biochimiquement (Showell *et coll.,* 1976). Il doit son nom au fait qu'il se lie avec une haute affinité à des peptides N-formylés comme le f-MLF (*N-formyl-methionyl-leucyl-phénylalanine*). Sa structure primaire a été élucidée au début des années 1990 grâce au clonage de deux formes allèliques à partir d'une banque d'ADNc issue de cellules HL-60 (Boulay *et coll.,* 1990a ; Boulay *et coll.,* 1990b). Ces deux ADNc représentent les deux formes de FPR humain codant pour un récepteur à sept domaines transmembranaires avec une séquence de 350 acides aminés (**Figure 25**).

Le clonage de l'ADNc de FPR a permis l'identification de deux récepteurs homologues, FPRL1 et 2 (FPR-Like 1 et 2) (Bao *et coll.,* 1992 ; Murphy *et coll.,* 1992). Etant donné que la nomenclature des récepteurs est basée sur leurs ligands et que les peptides N-formylés sont les seuls agonistes communs pour les récepteurs FPR, la nomenclature récemment recommandée par l'*International Union of Basic and Clinical Pharmacology* (NC-IUPHAR) désigne par FPR1, FPR2 et FPR3, respectivement les récepteurs FPR, FPRL1 et FPRL2 (Ye *et coll.,* 2009).

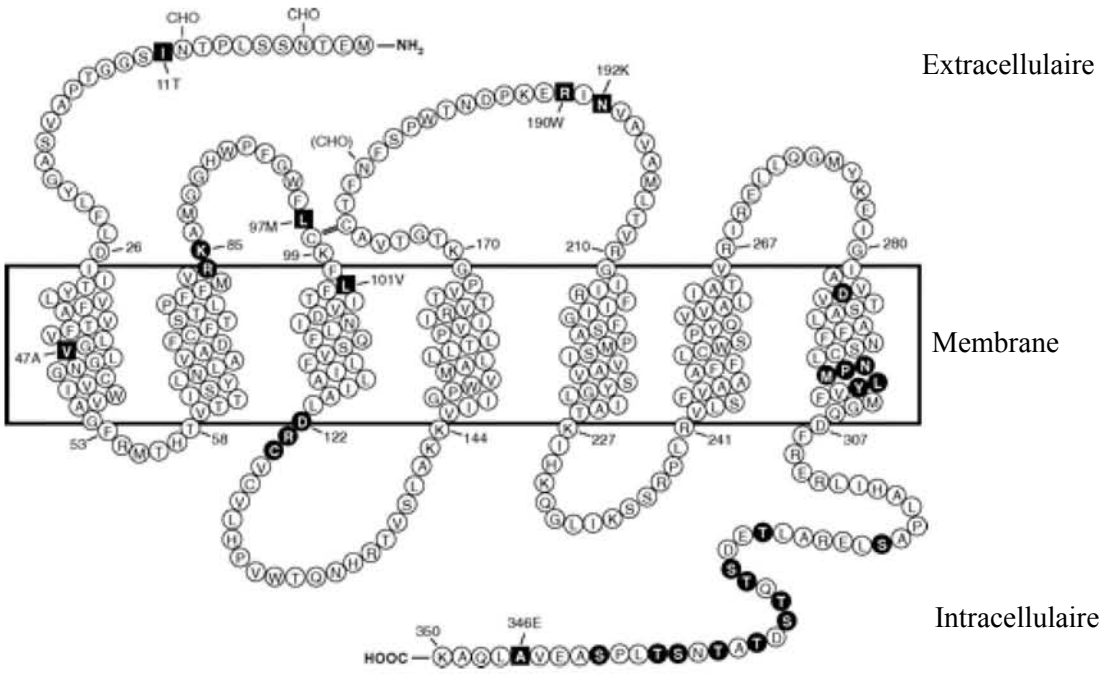


Figure 25 : ***Schéma de l'organisation transmembranaire du récepteur FPR humain. La séquence en acides aminés est représentée par le code à une lettre. La localisation des polymorphismes SNP est représentée par les carrés noirs (Ye et coll., 2009).***

Les trois gènes correspondant à la famille des récepteurs FPR (*FPR1, FPRL1, FPRL2*) forment un cluster sur le chromosome 19q13.3-19q13.4 (**Figure 26**). Malgré un fort degré d'homologie avec FPR (ou FPR1) (69%), FPRL1 (ou FPR2) ne se lie au peptide f-MLF qu'avec une faible affinité (Murphy, 1994). FPRL1 est également appelé récepteur de la lipoxine A4 (LXA4) car ce médiateur lipidique a été le premier ligand endogène de haute affinité découvert pour FPRL1 (Fiore *et coll.,* 1994). Le troisième membre de la famille FPR, FPRL2, présente 56% d'identité avec FPR mais il ne se lie pas, ni ne répond pas au peptide f-MLF.

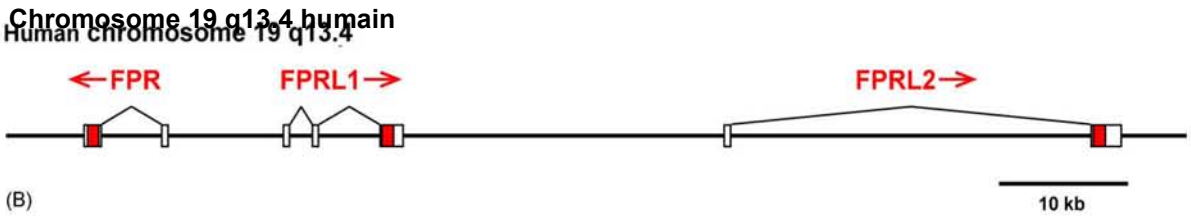


Figure 26 : ***Organisation schématique des gènes des récepteurs FPRs humains sur le chromosome 19q13.4. Les séquences codantes sont indiquées en rouge (Migeotte et coll., 2006).***

III.2. Localisation cellulaire et tissulaire des récepteurs FPRs

Parallèlement au nombre grandissant de ligands de la famille FPRs, la distribution cellulaire et tissulaire de ces récepteurs s'est élargie. FPR et FPRL1 sont exprimés dans les monocytes, les macrophages et les neutrophiles alors que FPRL2 est présent uniquement dans les monocytes et les macrophages. L'expression des récepteurs FPRs dans des cellules autres que les cellules myéloïdes (Migeotte *et coll.,* 2006 ; Ye *et coll.,* 2009) suggère que ces récepteurs peuvent avoir des rôles fonctionnels autres que la défense de l'hôte.

En dehors des leucocytes, l'expression de FPR et FPRL1 est détectée dans plusieurs tissus comme les cellules endocrines, les hépatocytes, les cellules musculaires lisses vasculaires et endothéliales et dans les cellules microgliales. Un rôle du récepteur FPRL1, exprimé dans les cellules microgliales a d'ailleurs été évoqué récemment dans les maladies neurodégénératives (Iribarren *et coll.,* 2005). FPRL1 peut en effet être activé par un fragment de 42 acides aminés de la protéine β-amyloïde A (Aβ42), dont la surproduction et la précipitation sous forme de plaques ou de fibrilles est impliquée dans la maladie d'Alzheimer. Le rôle du complexe FPRL1/Aβ42 serait double puisqu'il participerait à l'entretien d'une activité pro-inflammatoire par activation et recrutement des phagocytes, et son internalisation entraînerait la formation de fibrilles d'Aβ42 dans ces phagocytes (Cui *et coll.,* 2002 ; Le *et coll.,* 2001). De plus, on sait que l'activation de FPRL1 par le peptide LL-37 module l'apoptose cellulaire (Nagaoka *et coll.,* 2006), stimule la production des espèces réactives de l'oxygène (Iaccio *et coll.,* 2009), et favorise l'angiogenèse (Koczulla *et coll.,* 2003).

III.3. Ligands des récepteurs FPR s

Les récepteurs FPR et FPRL1 peuvent être activés par un spectre assez large d'agonistes peptidiques ne présentant pas de caractéristiques structurales communes. Ces agonistes peuvent être synthétiques, dérivés de l'hôte ou dérivés de pathogènes (**Tableau 3**). Bien qu'il soit depuis longtemps considéré comme un récepteur orphelin, FPRL2 peut être activé de manière modérée par certains peptides non-formylés qui sont également des agonistes de FPRL1 (Betten *et coll.,* 2001 ; Christophe *et coll.,* 2001).

Tableau 3 : ***Liste des principaux agonistes des récepteurs FPRs (Le Y et coll., 2002)***

Ligands	Origin	Sequence	Specific receptor
Agonists			
fMLF	Bacteria	Formyl-MLF	FPR (high affinity); FPRL1 (low affinity)
T20/DP178	HIV-1_{LAV} gp41 (aa643–678)	YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF	FPR
T21/DP107	HIV-1_{LAV} gp41 (aa558–595)	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ	FPR, FPRL1
N36	HIV-1_{LAV} gp41 (aa546–581)	SGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL	FPRL1
F peptide	HIV-1_{Bru} gp120 (aa414–434)	EGSDTITLPCRIKQFINMWQE	FPRL1
V3 peptide	HIV-1_{MN} gp120 (V3 loop)	TRPNYNKRKRIHIGPGRAFYTTKNIIGTIRQAH	FPRL1
LL-37	hCAP18 (aa1–37)	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	FPRL1
SAA	Acute phase protein	MRSFFSFLGEAFDGARDMWRAYSDMREANYIGSDKYFHARG NYDAAKRGPGGVWAAEAISNARENIQRFFGRGAEDSLADQA ANEWGRSGKDPNHFRPAGLPEKY	FPRL1
Aβ_{42}	APP (aa1–42)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	FPRL1
PrP106–126	Prion (aa106–126)	KTNMKHMAGAAAAGAVVGGLG	FPRL1
Ac1–26	Annexin I (aa1–26)	Ac-AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSC	FPR
Ac9–25	Annexin I (aa9–25)	Ac-QAWFIENEEQEYVQTVK	FPR
Mitochondrial peptide	NADH dehydrogenase	MYFINILTL	FPRL1
LXA4	Lipid metabolite	(See Fig. 2 for structure)	FPRL1
W peptide	Random peptide library	WKYMVm	FPR, FPRL1
MMK-1	Random peptide library	LESIFRSLLFRVM	FPRL1

De nombreux agonistes naturels des récepteurs FPRs dérivent des virus et des bactéries. En plus du tri-peptide f-MLF dérivé d'*Escherichia coli* (le premier ligand à avoir été caractérisé comme agoniste de FPR et FPRL1) des peptides dérivés de protéines de l'enveloppe du virus *HIV-1* ont été décrits comme agonistes des récepteurs FPR et FPRL1 (Su SB *et coll.,* 1999a). De plus, le peptide Hp(2-20) de la bactérie *Helicobacter pylori* est capable d'activer la mobilisation des ions calcium et de la NADPH oxydase dans les neutrophiles par l'intermédiaire du récepteur FPRL1 (Bylund *et coll.,* 2001).

Les récepteurs FPR sont également particulièrement sensibles à plusieurs agonistes provenant de l'hôte même, attestant ainsi des implications biologiques potentielles des récepteurs FPR. Le premier à avoir été découvert a été la lipoxine A4 qui est un médiateur lipidique agoniste de haute affinité pour FPRL1 (Fiore *et coll.,* 1994). Des protéines de type amyloïde, ou des fragments dérivés de telles protéines, peuvent activer les cellules myéloïdes *via* FPRL1 (Le *et coll.,* 2001 ; Su SB *et coll.,* 1999b). L'humanine, un peptide neuroprotecteur de 24 acides aminés retrouvé dans la région occipitale du cerveau, utilise également le récepteur FPRL1 de manière fonctionnelle. De nombreux agonistes peptidiques sont dérivés des leucocytes et jouent un rôle d'effecteurs inflammatoires *via* l'activation des récepteurs FPR. De plus, le peptide LL-37, qui est libérée par de nombreux types cellulaires, présente des propriétés chimiotactiques par l'intermédiaire du FPRL1 (De Yang *et coll.,* 2000).

III.4. Polymorphismes génétiques des récepteurs FPRs

Depuis les premières études de clonage qui ont conduit à l'identification de deux formes alléliques du récepteur FPR (FPR-26 et FPR-98), de nombreux polymorphismes de type SNP ont été identifiés dans le gène *FPR1* (Sahagun-Ruiz *et coll.,* 2001) (**Figure 27**).

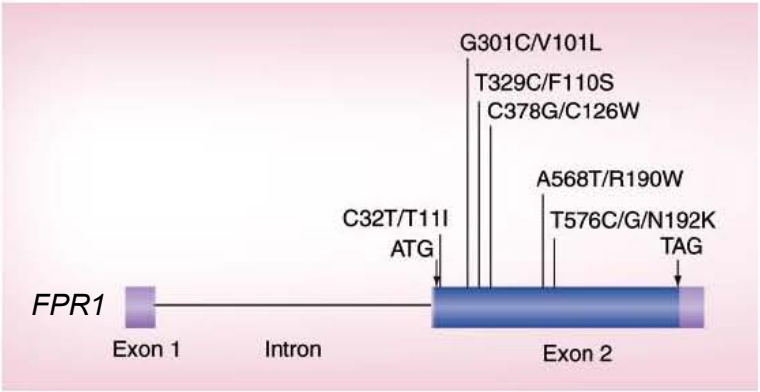


Figure 27 : ***Principaux polymorphismes identifiés dans le gène FPR1. La séquence codante est indiquée en bleu.***

Au moins 30 variations génétiques ont été identifiées au niveau de la séquence nucléotidique de *FPR1*, tandis qu'aucun polymorphisme n'a été identifié dans le gène *FPRL1* (Ye *et coll.,* 2009). Certains de ces variants génétiques sont associés à des phénotypes plus ou moins marqués. Les variants F110S et C126W du récepteur FPR ont été associés à des altérations des fonctions cellulaires caractéristiques de la parodontite agressive (inflammation des gencives), comme des altérations dans le chimiotactisme des cellules inflammatoires (Jones *et coll.,* 2003), ou un défaut de couplage du récepteur à la protéine G (Seifert et Wenzel-Seifert, 2001). Les formes R190W et N192K sont aussi associées à la parodontite agressive (Zhang *et coll.,* 2003). Une étude récente a montré que le polymorphisme *FPR1 c.32C>T,* situé à l'extrémité N-terminale du récepteur FPR, est associé à la réponse inflammatoire, notamment à une augmentation du taux circulant de la protéine CRP et à la vitesse de sédimentation érythrocytaire dans une population canadienne (Bhattacharya *et coll.,* 2007).

Compte tenu de ces observations, ***1)*** *les récepteurs FPRs constituent des médiateurs clés de nombreux effecteurs immuno-inflammatoires comme le peptide LL-37 et* ***2)*** *les variations génétiques du récepteur FPR pourraient influencer les réponses immuno-inflammatoires voire être associées à des pathologies inflammatoires.*

IV. Objectifs

Les maladies cardiovasculaires athérosclérotiques sont des affections multifactorielles associées à un état inflammatoire chronique. De nombreux facteurs de risque cardiovasculaire et du syndrome métabolique dont l'obésité, l'hypertension artérielle, les dyslipidémies, et les diabètes semblent agir en synergie par des voies de signalisation impliquant de nombreux médiateurs inflammatoires et des altérations des réponses immuno-inflammatoires. Les peptides antimicrobiens, les défensines et les cathélicidines, sont considérés comme étant des effecteurs clés de la défense immunitaire innée, mais aussi des réponses inflammatoires. Ils ont une activité chimio-attractante, ils régulent l'expression de cytokines inflammatoires, de chimiokines et de molécules d'adhésion cellulaire. De plus, de nombreuses études ont suggéré que ces peptides sont associés à des pathologies inflammatoires comme l'athérosclérose. **Néanmoins, la relation entre les peptides antimicrobiens et le risque de maladies cardiovasculaires athérosclérotiques est très peu étudiée.**

Au cours de notre travail, nous nous sommes proposé de répondre aux questions suivantes :

- ***Existe-t-il un lien entre l'expression des défensines-α et des cathélicidines dans les cellules immuno-inflammatoires et les facteurs de risque du syndrome métabolique et des maladies cardiovasculaires ? Quels sont les facteurs biologiques influençant l'expression de ces peptides ?***

- ***Par quels mécanismes les défensines et les cathélicidines seraient impliquées dans le risque cardiovasculaire ? Compte tenu du rôle clé de ces peptides dans les réponses immunes et inflammatoires, existe-t-il une relation entre l'expression des défensines-α et des cathélicidines et celle du récepteur des molécules chimio-attractantes, FPR ? Quelle est la place de ce récepteur dans les fonctions immuno-inflammatoires des défensines-α et des cathélicidines?***

- ***Des études ont rapporté l'existence de liens entre des variations génétiques du récepteur FPR et certaines fonctions des cellules immuno-inflammatoires. Existe-t-il des associations entre les polymorphismes génétiques de FPR et les concentrations des marqueurs d'inflammation (cytokines, molécules d'adhésion,…)***

circulants et l'expression des peptides antimicrobiens dans les cellules immuno-inflammatoires ?

- ***L'expression et la mobilisation des défensines-α et des cathélicidines peuvent être régulées par de nombreux stimuli endogènes et/ou exogènes, influençant ainsi leurs fonctions biologiques. Quels sont les facteurs pouvant réguler les gènes de ces peptides dans le contexte du risque de maladies cardiovasculaires, et pouvant expliquer l'implication éventuelle des défensines-α et des cathélicidines dans le développement du risque cardiovasculaire ?***

Ainsi, l'ensemble des études réalisées dans le cadre de ce travail de thèse a eu pour objectif général d'étudier les relations qui pourraient exister entre l'expression des gènes des défensines-α et des cathélicidines et les facteurs de risque du syndrome métabolique et des maladies cardiovasculaires, et de déterminer les mécanismes par lesquels ces peptides pourraient être associés au développement du risque cardiovasculaire.

Afin d'aboutir à la réalisation de notre objectif et de répondre à nos questions, nous avons fait appel à deux approches expérimentales différentes et complémentaires : **L'approche épidémiologique** en menant des études chez des individus de la cohorte Stanislas, et **l'approche mécanistique** en utilisant des modèles cellulaires *in vitro*.

Ainsi, nos études comportent les trois étapes suivantes :

1) **Analyser les relations qui pourraient exister entre l'expression des défensines-α DEFA1-3 et de la cathélicidine LL-37 et les indicateurs et facteurs de risque du syndrome métabolique et des maladies cardiovasculaires.**

   Nous avons étudié le profil d'expression quantitative des ARNm des gènes de la cathélicidine LL-37 et des défensines-α DEFA1-3 dans les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) par RT-PCR en temps réel. Les PBMCs provenaient de 178 sujets adultes (sous-échantillon 1) sélectionnés à partir de la cohorte STANISLAS. Nous avons ensuite réalisé des analyses de corrélation

statistique entre le niveau d'expression des ARNm de LL-37 et des DEFA1-3 et les valeurs des indicateurs de l'obésité, de la pression artérielle, des taux circulants des lipides, des lipoprotéines, de glucose et des indices de l'inflammation chez les individus étudiés.

2) Déterminer la relation éventuelle entre le gène du récepteur des molécules chimio-attractantes, FPR, et l'expression des défensines-α DEFA1-3, de la cathélicidine LL-37 et les concentrations de marqueurs d'inflammation circulants.

Il a été montré que les peptides LL-37 et défensines exercent leur fonction chimiotactique *via* des récepteurs de la famille FPRs. Nous avons donc analysé, dans un premier temps, les corrélations entre l'expression des gènes de LL-37 et des DEFA1-3 et celle du gène du récepteur FPR (*FPR1*) dans les PBMCs des sujets de la cohorte Stanislas (sous-échantillon 1).

Ensuite, nous avons analysé les associations éventuelles entre un variant génétique du récepteur FPR (*FPR1* c.32C>T/p.I11T) et les taux circulants d'une vingtaine de molécules d'inflammation et d'adhésion cellulaire. Pour ce faire, nous avons génotypé le polymorphisme *FPR1* c.32C>T par la technique de PCR-RFLP (*Polymerase Chaine Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*) à partir des ADN génomiques qui provenaient de 325 individus adultes (sous-échantillon 2) de la cohorte Stanislas. Nous avons également testé l'effet éventuel de ce polymorphisme sur l'expression transcriptionnelle des gènes du récepteur FPR et de LL-37 dans les PBMCs des sujets du sous-échantillon 1.

3) Etudier la régulation des gènes des défensines-α et des cathélicidines dans le contexte du risque cardiovasculaire en utilisant des modèles cellulaires *in vitro*.

En troisième partie de ce travail de thèse, et afin de tenter de comprendre la nature de la relation éventuelle entre l'expression des gènes de LL-37 et DEFA1-3 et la variabilité des facteurs de risque cardiovasculaire, nous avons procédé, sur la base des résultats des études d'associations de la première partie, à l'étude de la

régulation des gènes des défensines-α et des cathélicidines par des stimuli athérogènes dans des modèles cellulaires.

Nous avons analysé l'expression du gène de la cathélicidine CRAMP, l'homologue de la cathélicidine humaine chez la souris, dans la lignée d'adipocytes murins 3T3-L1. Nous avons testé l'effet de traitement par du glucose ou/et d'insuline, l'effet de la différenciation adipocytaire, ou encore l'interaction cellulaire entre les adipocytes 3T3-L1 et la lignée de macrophages humains U-937 sur l'expression des ARNm de CRAMP. Nous avons également analysé l'effet de traitement par du glucose ou/et d'insuline sur l'expression des ARNm des DEFA1-3 dans les neutrophiles dérivés des pro-myéloblastes HL-60. L'expression des ARNm des gènes a été analysée par RT-PCR semi-quantitative.

Les méthodologies et les approches expérimentales utilisées pour la réalisation de nos études sont présentées en détail dans la section « MATERIEL ET METHODES ».

MATERIEL ET METHODES

Afin d'étudier l'implication des peptides antimicrobiens dans le risque de développement de maladies cardiovasculaires et du syndrome métabolique, nous avons fait appel à deux approches de recherche à la fois différentes et complémentaires.

1) L'approche épidémiologique portant sur des études d'association avec le gène ou les produits du gène d'intérêt à l'échelle des populations

2) L'approche mécanistique portant sur des études de régulation de l'expression de gènes en utilisant un modèle cellulaire.

Nous avons entrepris ces deux types d'études pour la réalisation du travail effectué dans le cadre de cette thèse.

I.Etudes épidémiologiques

I.1. Populations étudiées

I.1.1. Cohorte STANISLAS

La cohorte STANISLAS (**S**uivi **T**emporaire **A**nnuel **N**on **I**nvasif de la **S**anté des **L**orrains **A**ssurés **S**ociaux) est une cohorte familiale longitudinale recrutée au Centre de Médecine Préventive de Vandoeuvre-Lès-Nancy (France), entre 1993 et 1995 (1er point). Un deuxième examen de ces familles a été réalisé entre 1998 et 2001 (2ème point), puis un troisième examen entre 2003 et 2005 (3ème point). Cette cohorte est constituée de 1006 familles de Meurthe et Moselle et des Vosges (origine Française), comprenant deux parents accompagnés d'au moins deux enfants biologiques âgés de plus de 6 ans. Ses caractéristiques ont été décrites précédemment (Siest *et coll.,* 1998 ; Visvikis-Siest *et coll.,* 2008). Les sujets présentant une maladie aigue et/ou chronique lors du premier point d'examen sont exclus de la cohorte. Cette cohorte a pour objectif principal l'évaluation du rôle des facteurs génétiques et environnementaux et de leur contribution au risque cardiovasculaire. Cette étude a été approuvée par le comité local d'éthique de Nancy et chaque participant a signé un formulaire de consentement.

Deux sous-échantillons de la cohorte STANISLAS ont été sélectionnés.

Sous-échantillon 1 : Pour l'analyse transcriptomique des gènes de la cathélicidine LL-37, des défensines-α 1, 2 et 3 (DEFA1-3) et du récepteur FPR (*Formyl Peptide Receptor*), nous avons sélectionné un sous-échantillon de 178 individus adultes (90 hommes et 88 femmes). Les sujets présentant une concentration de la protéine C-réactive circulante (hight sensitivity-CRP) > 30 mg/L ont été exclus. Nous avons utilisé les résultats du troisième bilan (3ème point) de santé afin d'analyser les relations entre l'expression des gènes et les indicateurs de risque cardiovasculaires et métaboliques.

Sous-échantillon 2 : Pour l'analyse génétique du polymorphisme *FPR1 c.32C>T,* nous avons sélectionné à partir de la cohorte STANISLAS un deuxième sous-échantillon de 325 adultes génétiquement non liés (164 hommes et 161 femmes). Les femmes n'étaient pas enceintes. Les individus présentant des taux supérieurs aux limites de décision pour les variables biologiques suivantes ont été exclus : activités de l'aspartate aminotransférase (TGO), alanine aminotransférase (TGP) ou gamma-glutamyl transférase (GGT) > 200 U/L ; concentration en orosomucoïde ou haptoglobine > 3 g/L ; CRP > 30 mg/L ; concentrations en cholestérol ou en triglycérides > 10 mmol/L ou concentration en glucose > 8mmol/L. Nous avons utilisé les résultats du deuxième bilan (2ème point) de santé.

L'analyse du polymorphisme *FPR1 c.32C>T* a été aussi réalisée dans le sous-échantillon 1 afin d'évaluer l'effet du polymorphisme sur l'expression du gène *FPR1*.

I.1.2. Echantillons en provenance de l'Etablissement Français du Sang (EFS)

Les échantillons sanguins ayant permis l'analyse de la relation entre l'expression des ARNm et l'expression des protéines (peptides) de la cathélicidine LL-37 ont été obtenus auprès de l'Etablissement Français du Sang (Vandœuvre-lès-nancy). Les échantillons ont été prélevés auprès de 21 donneurs supposés sains. Ces prélèvements ont été utilisés pour étudier la relation entre l'expression des ARNm et des protéines de la cathélicidine LL-37 dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) d'une part, et entre le niveau des ARNm dans les PBMCs et le taux plasmatique de LL-37 d'autre part.

I.2. Paramètres cliniques et biologiques

I.2.1. Données médicales et cliniques

Différentes données ont été recueillies auprès de chaque participant lors des examens de santé : l'âge, des paramètres anthropométriques (dont l'indice de masse corporelle (IMC = poids/taille^2) et les mesures de tour de taille et de hanches) et la pression artérielle (PA). Les antécédents familiaux et les conclusions de l'examen médical ont été également recueillis au cours de l'examen de santé. Des données sur la consommation d'alcool et/ou de tabac, les habitudes alimentaires et la prise de médicaments ont été recueillies à l'aide d'auto-questionnaires ou de questionnaires remplis par du personnel qualifié.

La prévalence du syndrome métabolique a été déterminée dans le sous-échantillon 1 de la cohorte STANISLAS selon deux définitions. La première a été proposée par le *National Cholesterol Evaluation Program Adult-Treatment Panel III* (NCEP-ATPIII) (*National Institute of Health*, 2001 ; Grundy *et coll.,* 2004) et la deuxième par la fédération internationale du diabète (IDF) (*International Diabetes Federation*, 2005, Alberti *et coll.,* 2005). Les critères retenus pour ces deux définitions sont résumés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : ***Critères de définition du syndrome métabolique selon NCEP-ATPIII (2001) et IDF (2005).***

Facteurs de risque	NCEP-ATPIII (2001)	IDF (2005)
Intolérance au glucose	GAJ ≥ 6,1	GAJ ≥ 5,6 ou diabète de type 2 précédemment diagnostiqué
Dyslipidémies	TG ≥ 1,7	TG > 1,7 ou traitement médicamenteux
	HDL-C < 0,9 H < 1,0 F	HDL-C < 1,03 H ou < 1,29 F ou traitements médicamenteux
Hypertension artérielle	PAS/PAD ≥ 130/85	PAS/PAD ≥ 130/85 ou traitements médicamenteux
Obésité	Tour de taille ≥ 102 H ≥ 88 F	Européens Tour de taille ≥ 94 H/ 80 F
		Asie du sud et du Sud-est Tour de taille ≥ 90 H/ 80 F
		Japonais Tour de taille ≥ 85 H/ 90 F
Syndrome métabolique	Au moins 3 critères	Obésité + au moins 2 critères

F *: femme ;* ***GAJ*** *: glycémie à jeun (mmol/l) ;* ***H*** *: homme ;* ***HDL-C*** *: high densité lipoprotein-cholesterol (mmol/l) ;* ***PAS/PAD*** *: pression artérielle systolique et diastolique (mmHg) ;* ***TG*** *: triglycérides (mmol/l) ; Tour de taille (cm) ; traitement médicamenteux : traitement spécifique pour l'anomalie.*

I.2.2. Prélèvements et dosages biologiques

Les prélèvements sanguins ont été effectués au niveau d'une veine antécubitale des sujets à jeun depuis 12 heures, en position allongée avec l'avant bras en supination. Le sang a été prélevé dans 5 tubes de type Vacutainer^{TM} (Becton Dickinson, Grenoble), 2 tubes secs avec gel séparateur de 5 et 10 mL (pour la séparation du sérum), 1 tube avec héparinate de sodium de 10 mL (pour l'extraction des protéines totales des cellules mononuclées), et 2 tubes avec EDTA de 10 mL (pour l'extraction des ARN des cellules mononuclées, de l'ADN génomique et pour la séparation du plasma). Le plasma et le sérum ont été obtenus après centrifugation des tubes, respectivement à 1500 g pendant 15 minutes à + 4°C ou à 1000 g

pendant 10 minutes à T° ambiante. Une partie du sérum et le plasma-EDTA sont stockés à -196°C (ou à -80°C pour les échantillons provenant de l'EFS) pour des dosages ultérieurs des molécules d'intérêt comme les molécules d'adhésion cellulaire et d'inflammation. Le reste du sérum est utilisé immédiatement pour les dosages biochimiques.

Les paramètres lipidiques incluant les lipoprotéines, le cholestérol et les triglycérides (TG) ont été dosés à l'aide des automates AU 5021 (Olympus Merck, Boehringer), Cobas Mira (Roche) et BNA (Behring). La concentration en LDL-cholestérol a été calculée à partir de la formule de Friedwald (1972) pour des concentrations en TG inférieures à 400 ng/dL. La glycémie et les activités de la phosphatase alcaline (PA), de TGO et de TGP ont été mesurées à l'aide de kits fournis par Merck sur AU 5021 (Olympus Merck). L'insuline a été dosée par *immuno-essai-microparticulaire* (Abbott) sur IMx.

La CRP a été dosée dans le sérum par une technique immunonéphélémetrique sur BNII (Dade Behring). Les concentrations plasmatiques d'interleukine (IL)-6, du facteur de nécrose tumoral alpha (TNF-α), du récepteur de TNF (TNF-RII), du facteur de croissance insuline-like (IGF-1), de l'IGF-binding protein (IGF-BP3) et les concentrations sériques des molécules d'adhésion (E-sélectine, P-sélectine, L-sélectine et la molécule d'adhésion intracellulaire 1 (ICAM-1)) ont été mesurées par ELISA (kits R&D system). La concentration d'IL-18 a été mesurée dans le plasma par ELISA (Kit MBL Co, Ltd). L'IL-8, la protéine MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), le facteur de croissance épidermique (EGF) et le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) ont été quantifiés dans le plasma par la technique Evidence® (Randox Ltd, Crumlin, UK). Le nombre de globules blancs a été mesuré par MAXIM Analyseur (Beckman Coulter).

I.3. Analyse de l'expression des protéines

I.3.1. Dosage des protéines totales contenues dans les PBMCs

Nous avons procédé à l'extraction, puis au dosage des protéines totales des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) en utilisant les méthodes qui suivent.

I.3.1.1. Extraction des protéines

Dans un premier temps, les PBMCs ont été isolées à partir des tubes de sang avec héparinate de sodium.

Principe

Les éléments figurés du sang, déposés sur une solution de ficoll de haute densité, subissent durant une centrifugation une migration différentielle qui conduit à leur séparation en fonction de la densité. Les érythrocytes et les granulocytes sédimentent au fond du tube et les cellules mononuclées forment un anneau à l'interface entre le plasma et le ficoll.

Réactifs

- Milieu de Hanks *(Hanks'Balanced Solution Salt, SIGMA)*
- Solution de ficoll *(Ficoll paque™ plus, Amersham BioSciences)*

Protocole

- Dans un tube de 15 mL, ajouter du milieu de Hanks (v/v) au sang
- Verser le mélange dans un tube de 15 mL contenant le même volume de ficoll
- Centrifuger 30 min, à 300 g, à T° ambiante (sans frein)
- Récupérer l'anneau de cellules mononuclées dans un tube de 15 mL
- Compléter avec du milieu de Hanks, bien resuspendre par retournement
- Centrifuger à 1000 g, pendant 10 min à T° ambiante (1er lavage)
- Aspirer le surnageant et compléter à 2 mL avec du milieu de Hanks et bien resuspendre
- Prélever 50 µL pour comptage des cellules, puis compléter à 14 mL, bien resuspendre

- Centrifuger à 1000 g, pendant 10 min à T° ambiante (2ème lavage)
- Récupérer le culot dans un 1 mL de milieu de Hanks et transférer dans un tube eppendorf
- Centrifuger à 1000 g, pendant 5 min à T° ambiante
- Aspirer le surnageant
- Ce culot est traité immédiatement pour extraction des protéines totales

Dans un second temps, l'extraction des protéines totales des PBMCs a été réalisée.

Réactifs

- Tampon de lyse cellulaire *(Ceel lytic™ –M, SIGMA)*
- Inhibiteur de protéases *(Protease Inhibitor Cocktail, SIGMA)*

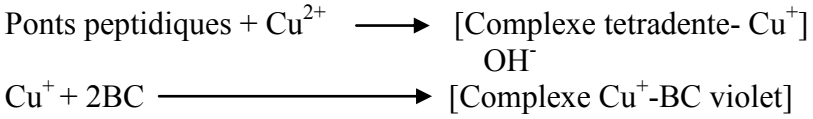
Protocole

- Préparer la solution de lyse : 320 µL de tampon de lyse par échantillon si le nombre de cellules > 10^6 (160 µL de tampon de lyse si nombre de cellules < 10^6) additionnés de 1,6 µL d'inhibiteur de protéases (0,5% V/V)
- Ajouter la solution de lyse au culot de cellules, bien resuspendre
- Mettre sous agitation pendant 15 min à T° ambiante
- Centrifuger à 12000 g pendant 15 min à 4°C
- Récupérer le surnageant, puis l'aliquoter
- Stocker les aliquots à -80°C.

I.3.1.2. Dosage des protéines totales

Principe

La méthode de l'acide bicinchoninique *« BC Assay »* (Uptima, Interchim) est un test colorimétrique qui repose sur le principe de réduction des ions Cu^{2+} en Cu^{+} par les liaisons peptidiques des protéines. Le *BC Assay* (acide bicinchoninique) chélate les ions Cu^{+} avec une très forte spécificité pour former un complexe soluble coloré en violet.



La réaction est mesurée par l'absorbance du complexe Cu^{+} final à 562 nm.

Préparation des réactifs

- Réactif *BC Assay* : 1 volume du réactif B est additionné à 50 volumes du réactif A
- Une gamme de standard (BSA, *Bovine Serum Albumin*) de 20 µg/mL à 2 mg/mL (8 points) est préparée dans le tampon de dilution des échantillons.

Protocole

- Déposer 25 µL de chaque standard (en double), contrôle (en double) et échantillons dans des puits de microplaque de 96 puits
- Ajouter 200 µL de réactif BC Assay par puits et mélanger
- Incuber à 37°C pendant 30 min
- Ramener la microplaque à température ambiante et mesurer l'absorbance à 562 nm

La lecture des absorbances à 562 nm est effectuée sur un lecteur de microplaques Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Inc.). La courbe standard est obtenue par régression linéaire (logiciel Microplate Manager 5.2, Bio-Rad Laboratories, Inc.).
La concentration des protéines dans les échantillons est ainsi déterminée à partir de la courbe standard.

I.3.2. Dosage de LL-37

Le dosage du peptide LL-37 a été réalisé dans des échantillons d'extraits protéiques de PBMCs et de plasma provenant de 21 sujets supposés sains et sélectionnés de l'Etablissement Français du Sang de Vandœuvre-lès-Nancy.

I.3.2.1. Principe de la méthode de dosage

La méthode de dosage repose sur une technique immunoenzymatique quantitative de type « sandwich » appelée ELISA (pour, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Des

anticorps monoclonaux spécifiques aux peptides LL-37 sont pré-déposés au fond de chacun des puits de la microplaque. Les échantillons à quantifier, les standards et le contrôle sont déposés dans les puits de la microplaque et les molécules d'intérêt présentes sont fixées par l'anticorps immobilisé. La présence de LL-37 est révélée à l'aide d'un second anticorps biotynilé spécifique et l'ajout du conjugué Streptavidine-peroxydase qui réagit spécifiquement avec l'anticorps biotynilé fixé sur la molécule d'intérêt. Des lavages successifs permettent d'éliminer les substances non liées et un substrat de la peroxydase, le 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) est ajouté. La coloration qui en résulte est proportionnelle à la quantité de molécule de LL-37 fixée. Après ajout d'une solution d'acide citrique qui neutralise la réaction enzymatique, l'intensité colorimétrique est déterminée par la mesure de l'absorbance à 450 nm par spectrophotométrie.

I.3.2.2. Protocole de dosage

Préparation des réactifs

Les réactifs utilisés proviennent d'un kit commercialisé et les solutions de travail sont préparées suivant les instructions du fournisseur (Hycult Biotechnology, France).

- Reconstitution des standards : pour chaque plaque de 96 puits, un flacon de standard lyophilisé est reconstitué avec 0,5 mL d'eau ultra pure.
- Préparation du tampon de lavage/dilution : 20 mL de la solution A (phosphate buffered saline, Tween 20, 2-chloroacetamide (conservateur)) sont dilués dans 200 mL d'eau ultra pure. 10 mL de la solution B ($MgCl_2$ et 2-chloroacetamide (conservateur)) sont dilués dans 200 mL d'eau ultra pure. Les deux solutions diluées sont ensuite mélangées (v/v).
- Reconstitution du second anticorps biotynilé : pour chaque plaque, un flacon du second anticorps lyophilisé est reconstitué avec 1 mL d'eau ultra pure, puis 11 mL du tampon de dilution sont ajoutés à la solution reconstituée.
- Reconstitution du conjugué : un flacon (streptavidine conjuguée à la peroxydase) est reconstitué avec 1 mL d'eau ultra pure, puis 0,5 mL du conjugué dilué à 12 mL dans du tampon de dilution.
- Préparation des échantillons et des standards : les standards sont préparés par dilution du standard reconstitué dans du tampon de dilution. Les échantillons sont également préparés dans du tampon de dilution.

La lecture des absorbances à 450 nm s'effectue sur un lecteur de microplaques Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Inc.).
Les limites de détection du dosage ELISA de LL-37 sont de 0,14 à 100 ng/mL.

Calcul des concentrations de LL-37

La courbe standard est obtenue par régression logistique à 4 paramètres à partir des valeurs des standards (logiciel Microplate Manager 5.2, Bio-Rad Laboratories, Inc.) (**Figure 28)**. La concentration de LL-37 dans les échantillons est ainsi déterminée à partir de la courbe standard.

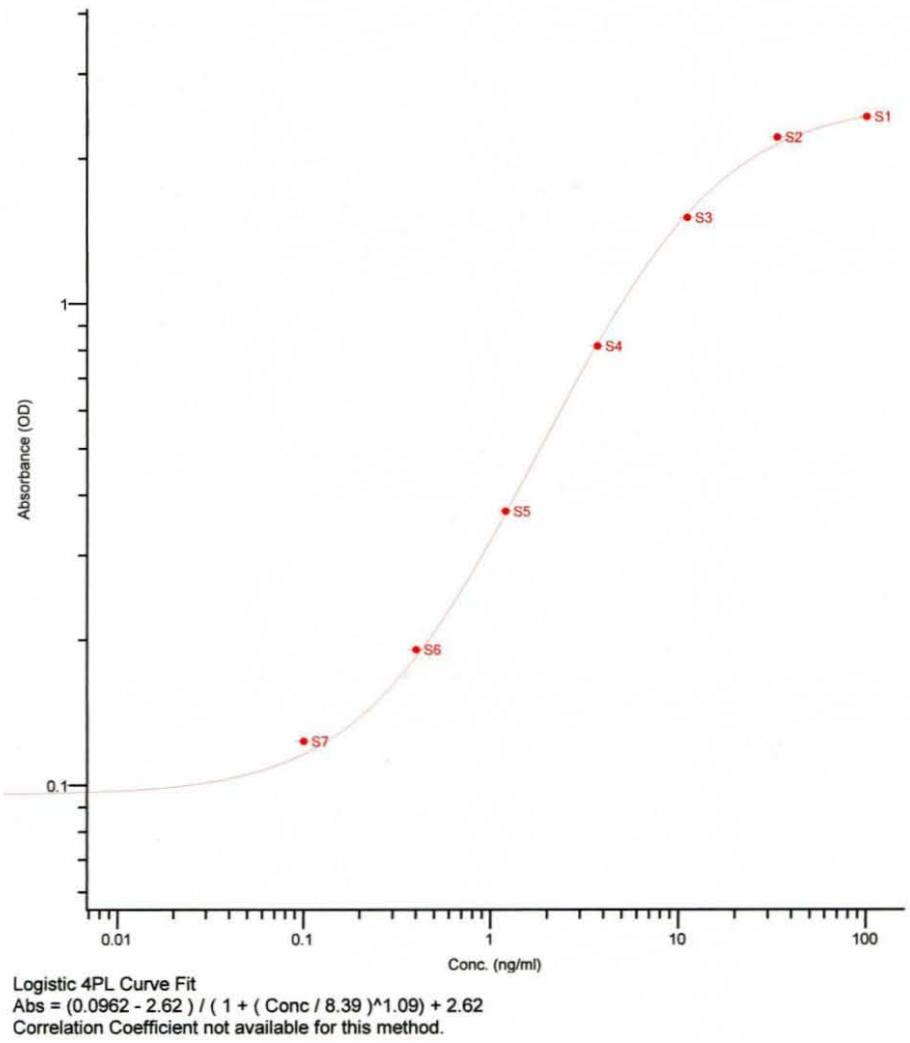


Figure 28 : ***Courbe standard pour le dosage de LL-37 par ELISA. La courbe standard est constituée de huit dilutions (huit points, S) du peptide LL-37 standard.***

I.4. Analyse transcriptomique

Dans cette analyse transcriptomique nous avons quantifié l'expression des gènes des défensines DEFA1-3, cathélicidine LL-37 et du récepteur FPR dans les PBMCs par la technique de RT-PCR en temps réel.

I.4.1. Isolement des cellules mononuclées du sang périphérique

Les PBMCs ont été isolées des échantillons de sang par centrifugation suivant un protocole bien défini avec un rendement en lymphocytes d'environs 97%. Brièvement, 10 mL de sang total ont été recueillis sur tube EDTA (Vacutainer™, Becton Dickinson), puis les PBMCs ont été isolées par centrifugation sur un gradient de Ficoll (Ficoll-Paque™ PLUS, Amersham Biosciences). Les PBMCs ont été ensuite stockées à -80°C dans le tampon de lyse Instapure Eurogentec à raison de 2 x 10^6 cellules par tube dans l'attente de l'extraction de l'ARN total (Marteau *et coll.,* 2005).

I.4.2. Extraction, contrôle qualité et reverse transcription des ARN en ADN complémentaire

L'ARN total est extrait par une technique automatisée, sur MagNa Pure LC (Roche Diagnostics), à l'aide du kit High Performance et du protocole External Lysis (Roche Diagnostics). L'extraction proprement dite est précédée par une étape manuelle pour la lyse finale des cellules par ajout de 520 µL de tampon de lyse (Roche Diagnostics) par échantillon de 200 µL. Afin d'éliminer des contaminations par l'ADN, la concentration initiale de DNase I est multipliée par 2. L'ARN est élué dans un volume de 100 µL, puis dosé à l'aide d'un spectrophotomètre. La pureté de l'ARN est vérifiée par calcul du rapport de l'absorbance à 260 nm / absorbance à 280 nm. Un rapport compris entre 1,8 et 2 atteste de l'absence de contamination par des protéines. L'intégrité de l'ARN est confirmée par un gel d'agarose 1% en conditions dénaturantes (formaldéhyde) pour visualiser les bandes d'ARN ribosomal 28S et 18S et de s'assurer d'un rapport 2:1 en intensité des bandes.

La transcription inverse (RT) de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) est réalisée en deux étapes : élimination d'éventuelle contamination en ADN, puis synthèse de l'ADNc, en utilisant le kit QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen, Coutaboeuf, France).

L'élimination de l'ADN contaminant s'effectue par incubation de 9 µL d'ARN avec 2 µL de tampon de dégradation d'ADN (Qiagen) et 3 µL d'H_2O à 42°C pendant 2 min. La synthèse d'ADNc simple brin est ensuite réalisée à 42°C, pendant 30 min par ajout de 1 µL de Quantiscript Reverse Transcriptase, 1 µL d'un mélange d'oligonucléotides amorces et 4 µL de tampon (contenant $MgCl_2$ et des dNTPs) au mélange contenant l'ARN issu de la première étape. Des témoins négatifs et positifs de RT sont réalisés.

Les ADNc obtenus sont ensuite purifiés à l'aide d'un kit Qiagen (QIAquick PCR Purification Kit), puis dosés par spectrophotométrie (Specord 205, Analytical Jena). La concentration de l'ADNc (ng/µL) est déterminée en multipliant l'absorbance à 260 nm par 50 ng/µL (1 unité d'absorbance à 260nm correspond à 50 ng/µL d'ADN). La solution d'ADNc est ensuite diluée à raison de 5 ng/µL.

I.4.3. Quantification de l'expression des gènes par RT-PCR en temps réel

I.4.3.1. Principe de la technique de quantification

Cette technique a été appliquée pour évaluer l'expression des ARNm de LL-37, DEFA1-3 et du récepteur FPR dans les PBMCs. Le principe consiste, après transcription inverse d'une quantité donnée d'ARN, à amplifier l'ADNc obtenu et à détecter en temps réel la fluorescence émise au fur et à mesure de la formation de l'ADN double brin dans lequel s'insère un agent intercalant fluorescent (le SYBRGreen dans notre technique). La fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié. Ce dernier est alors détecté en temps réel par mesure de l'augmentation de la fluorescence du SYBR Green se liant à l'ADN double brin. La quantité d'ADNc initialement présente dans l'échantillon analysé est déterminée de manière absolue grâce à une gamme de dilutions de standards à concentration connue.

I.4.3.2. Protocole de quantification

Après extraction des ARN et transcription inverse en ADNc tel que décrit ci-dessus, la quantification des transcrits des gènes d'intérêt est réalisée suivant trois étapes :

- Mise au point des conditions de PCR en temps réel pour le gène à quantifier
- Constitution de la gamme de copies du gène d'intérêt

- Quantification du gène d'intérêt dans les échantillons analysés

Nous présentons le protocole de quantification en prenant l'exemple du gène de LL-37.

a) Mise au point des conditions de PCR en temps réel pour le gène de LL-37

Un couple d'amorces sens et anti-sens permettant d'amplifier une partie du gène de LL-37 est utilisé. Les séquences d'amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer Premier 5.0 de Biosoft International.

Amorces sens :	5'-CTC GGA TGC TAA CCT CT-3'
Amorces anti-sens :	5'-CAT ACA CCG CTT CAC C-3'
Taille de l'amplicon :	178 pb

Le fragment de 178 pb est amplifié avec le Kit 1X LightCycler FastStart DNA Master Plus SYBR Green I dans le LightCycler (Roche Diagnostics) selon les conditions suivantes :

Mélange réactionnel	*Volume/ capillaire*	*Concentration finale*
Amorce sens	4 µL	1 µM
Amorce antisens	4 µL	1 µM
Master Mix	4 µL	
H2O	3 µL	
ADNc	5 µL	1,25 ng/µL
Volume total (qsp)	20 µL	

Cycles de température		
35 cycles	Dénaturation	95°C – 10 sec
	Hybridation	61°C – 10 sec
	Elongation	72°C – 7 sec

L'amplification par PCR est suivie d'une phase d'analyse des amplicons obtenus. Cette phase se caractérise par une augmentation progressive de la température du LightCycler donnant ainsi la courbe de fusion du produit de PCR. Cette courbe de fusion (**Figure 29**) permet de confirmer l'amplification spécifique du seul fragment d'intérêt, caractérisé par un seul pic et une même température de fusion (Tm) dans tous les échantillons analysés. La cassure de la pente (**A**) et la présence d'un seul pic (**B**) atteste de l'amplification d'un seul fragment (**Figure 29**). La fluorescence enregistrée diminue progressivement avec l'augmentation de la température pour chuter brutalement à une température spécifique du fragment d'intérêt, à laquelle 50% de l'ADN synthétisé est dénaturé (Tm). Cela permet donc

d'identifier le fragment amplifié pour lequel la température de fusion ainsi déterminée est spécifique. Le produit de PCR est enfin déposé sur gel d'acrylamide 10% pour confirmer l'obtention d'un seul fragment et pour s'assurer que sa taille corresponde bien à celle du fragment d'intérêt.

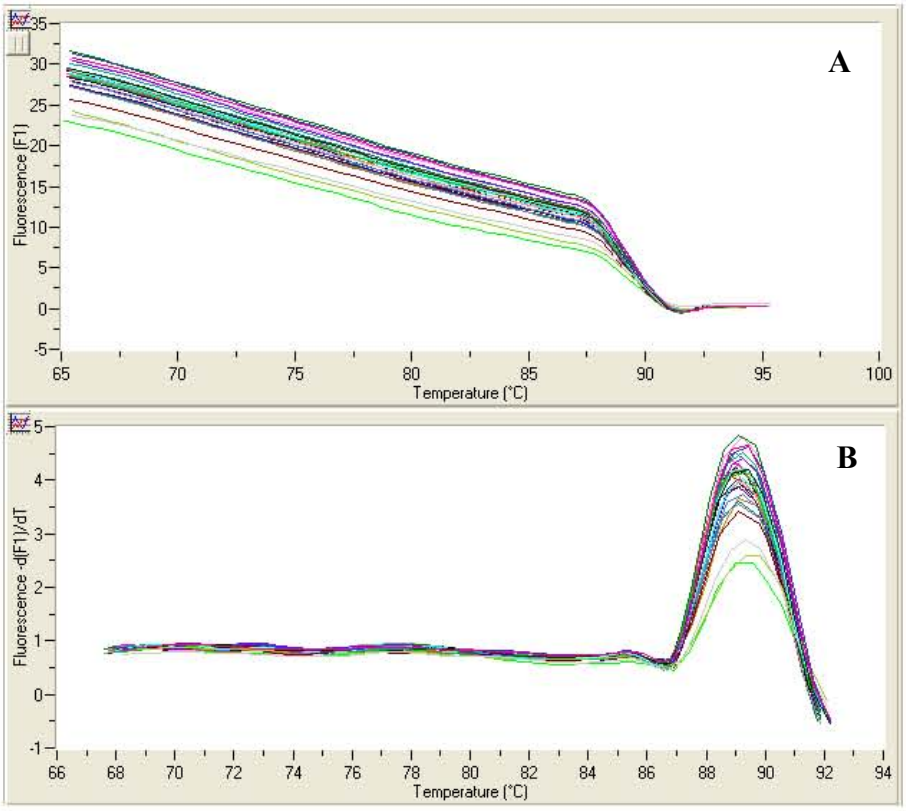


Figure 29 : ***Courbe de fusion***

b) Constitution de la gamme de copies (gamme étalon) du gène de LL-37

Il s'agit de constituer une gamme de copies d'ADN de LL-37 par série de dilutions des produits de PCR correspondants. Le fragment du gène de LL-37 (178 pb) est amplifié par PCR en temps réel selon les conditions optimisées et le principe décrit ci-dessus. Les produits de PCR sont ensuite purifiés sur colonnes Qiagen (QIAquik PCR Purification Kit) et dosés par spectrophotométrie.

Sachant qu'1 unité de densité optique (DO) à 260 nm ≈ 50 ng/µL d'ADN :

Concentration d'ADN (ng/µL) = DO (260 nm) de la dilution x facteur de dilution x 50

L'équivalent en nombre de copies est ensuite déterminé à partir de la concentration d'ADN suivant la formule ci-dessous.

1 mole = 6 x 10^{23} molécules (copies)

Masse moléculaire (g/mol) = nombre de paires de bases x 660 daltons

$$\text{Nombre de copies par } \mu L = 6 \times 10^{23} \text{ (copies/mol)} \times \frac{\text{concentration } [g/\mu L]}{\text{Masse Moléculaire } [g/mol]}$$

La gamme de copies d'ADN est ensuite constituée par dilutions en cascade (au 10ème) de l'ADN purifié et dosé, puis testée sur l'appareil de PCR en temps réel afin de générer la courbe étalon (**Figure 30**). Chaque dilution au 10ème correspond à une différence de 3,3 cycles. La gamme étalon est comprise généralement entre 10 et 10^8 copies du fragment d'ADN d'intérêt. La pente de la courbe étalon est déterminée automatiquement par le logiciel de LightCycler et permet de s'assurer de la qualité de la gamme et de l'efficacité de la PCR.

L'efficacité (E) de la PCR est calculée par la formule suivante : $\mathbf{E = 10^{(-1/pente)} - 1}$

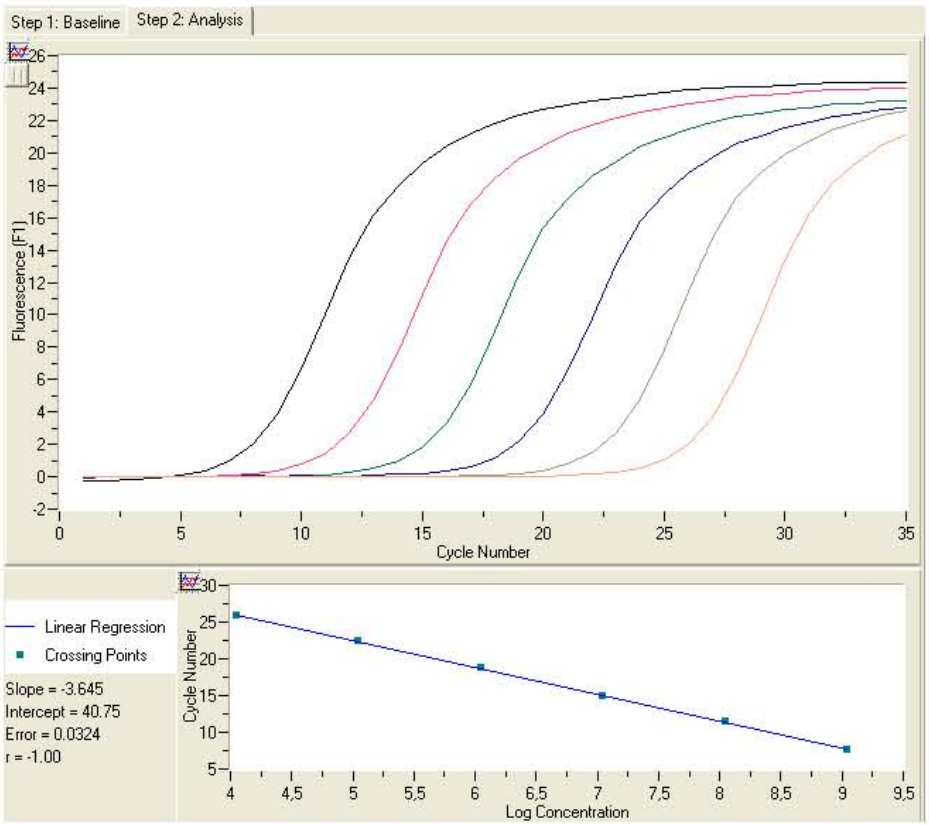


Figure 30 : ***Gamme étalon et droite de régression linéaire.***

Cette gamme est ensuite insérée dans chaque série de PCR pour déterminer le nombre de copies dans chaque échantillon analysé.

c) Quantification du gène d'intérêt dans les échantillons analysés

La quantification du gène d'intérêt peut ainsi se faire par amplification simultanée d'une quantité inconnue d'ADNc du gène d'intérêt avec les différents points de la gamme étalon pour lesquels le nombre de copies est connu. Chaque échantillon à analyser est traité en dupliquat en utilisant une quantité constante d'ADNc, 25 ng. Les échantillons sont amplifiés par PCR avec le LightCycler FastStart DNA Master Plus SYBR Green I kit dans le thermocycleur LightCycler selon les conditions optimisées et le même principe que pour l'établissement de la gamme. La gamme étalon est testée en parallèle. Des témoins (positifs et négatifs) de PCR sont également inclus.

La formation des produits de PCR à chaque cycle d'amplification est représentée par des courbes de quantification (**Figure 31**) où le nombre de copie est fonction du nombre de cycles. Chaque point d'inflexion des courbes correspond au Ct propre de chaque réaction et représente le cycle du seuil de détection (*Cycle Threshold*) de l'échantillon. Ce Ct est inversement proportionnel à la quantité d'ADN initial. Le nombre de copies correspondant au fragment du gène d'intérêt est alors calculé par le logiciel LightCycler à partir de la régression linéaire de la droite de calibration.

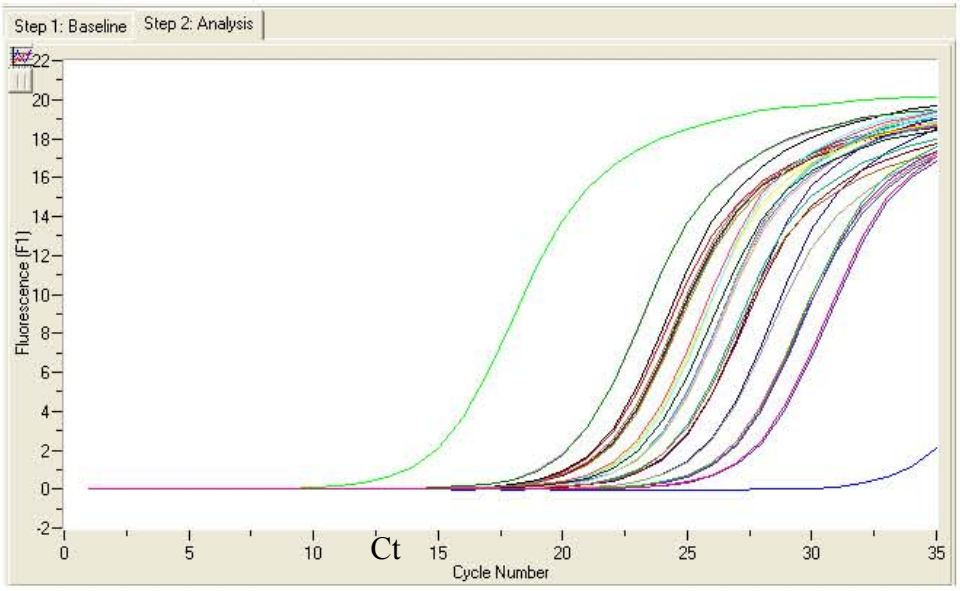


Figure 31 : ***Courbe de quantification.***

Cette technique de quantification d'expression des gènes est aussi appliquée pour l'analyse des gènes suivants : *DEFA1-3* et *FPR1.* Ci-après sont présentées les conditions d'amplification de ces gènes après mise au point.

Conditions d'amplification par PCR en temps réel

Gènes *DEFA1-3*

Amorce sens :	5'-GCG GAC ATC CCA GAA GTG GTT G-3'
Amorce anti-sens :	5'-TCA GCA GCA GAA TGC CCA GAG TC-3'
Taille de l'amplicon :	174 pb

Mélange réactionnel	***Volume/ capillaire***	***Concentration finale***
Amorce sens	2 µL	0,5 µM
Amorce antisens	2 µL	0,5 µM
Master Mix	4 µL	
H2O	7 µL	
ADNc	5 µL	1,25 ng/µL
Volume total (qsp)	20 µL	

Cycles de température		
35 cycles	Dénaturation	95°C – 10 sec
	Hybridation	58°C – 10 sec
	Elongation	72°C – 7 sec

Gène *FPR1*

Amorce sens	5'-TGG ACC AAC GAC CCT AA-3'
Amorce anti-sens	5'-AAG GCT GCT GCG ACA A-3'
Taille de l'amplicon	203 pb

Mélange réactionnel	***Volume/ capillaire***	***Concentration finale***
Amorce sens	2µL	0,5 µM
Amorce antisens	2µL	0,5 µM
Master Mix	4µL	
H_2O	7 µl	
ADNc	5 µL	1,25 ng/µL
Volume total (qsp)	20 µl	

Cycles de température		
35 cycles	Dénaturatio	95°C – 10 sec
	Hybridation	59°C – 10 sec
	Elongation	72°C – 8 sec

I.5. Génotypage du polymorphisme *FPR1* c.32C>T

I.5.1. Extraction de l'ADN génomique

Le sang fraîchement prélevé sur EDTA est centrifugé à 1000 g pendant 10 minutes à température ambiante pour obtenir le « *Buffy coat* » (fraction de globules blancs et de plaquettes localisée entre les globules rouges et le plasma). Ce dernier est utilisé immédiatement ou congelé à -196°C dans de l'azote liquide.

L'extraction de l'ADN génomique du « *Buffy coat* » est réalisée par la méthode de relargage « *salting-out* » décrite par Miller *et coll.* (1988). Le principe de la technique consiste en une dénaturation, suivie d'une déshydratation, puis une précipitation des protéines par une solution de chlorure de sodium saturée. L'ADN est ensuite précipité par de l'éthanol, puis repris en suspension.

I.5.2. PCR-RFLP

Le polymorphisme c.32C>T du gène *FPR1* est génotypé par la méthode PCR-RFLP (*Polymerase Chaine Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*).

I.5.2.1. Principe de la méthode

Le génotypage par PCR-RFLP repose sur le principe que certains polymorphismes (mutations) conduisent à l'apparition ou à la disparition d'un site de restriction spécifique d'une endonucléase sur la séquence nucléotidique d'intérêt. Le clivage par l'enzyme de restriction (endonucléase) est alors fonction de la présence ou non du site de restriction caractéristique. Après amplification par PCR de la séquence d'ADN susceptible de contenir la mutation recherchée, la détection de cette dernière est réalisée par digestion enzymatique du fragment d'ADN amplifié à l'aide d'une endonucléase spécifique. Le clivage ou « non-clivage » du fragment amplifié est donc à l'origine d'une variation du nombre et de la longueur des fragments d'ADN (fragments de restriction) qui en résultent. Il est donc possible de caractériser le génotype du polymorphisme après séparation des différents fragments de restriction par élecrophorèse ou par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

I.5.2.2. Protocole de génotypage

Le génotypage du polymorphisme *FPR1 c.32C>T* est réalisé par PCR-RFLP suivant le protocole décrit par Sahagun-Ruiz *et coll.* (2001), après quelques modifications.

a) PCR

Le fragment d'ADN susceptible de contenir le polymorphisme *FPR1* c.32C>T est amplifié par PCR en utilisant un couple d'amorces spécifiques (Sahagun-Ruiz *et coll.,* 2001).

Amorce sens :	5'-TGA GGA AAT GAC CAC GAC TGC A-3'
Amorce anti-sens :	5'-TCC GGA ATC CAG CCA CCC AGA TC-3'
Taille de l'amplicon :	205 pb

Les conditions de PCR ont été optimisées ainsi :

Mélange réactionnel	***Concentration finale***
Tampon PCR (sans $MgCl_2$)	1X
dNTP	100 µM
$MgCl_2$	2 mM
Amorce sens	0,5 µM
Amorce anti-sens	0,5 µM
Taq polymérase	1 Unité
ADN	200 ng
Volume total (qsp)	50 µL

Cycles de température		
35 cycles	Dénaturation	95°C – 30 sec
	Hybridation	58°C – 1 min
	Elongation	72°C – 1 min

b) Restriction enzymatique

Après amplification par PCR, l'amplicon (205 pb) obtenu est digéré par l'enzyme de restriction *BseLI* (Fermentas Inc.). En absence de la mutation, l'amplicon peut contenir un seul site de restriction (de coupure) «↓» spécifique pour l'enzyme *BseLI* dont la digestion génère deux fragments de restriction (125 + 80 pb).

…CCTCTGG↓AGGG… Avec C = localisation du polymorphisme *FPR1 c.32 C>T*.

La digestion est effectuée selon les conditions suivantes :

Mélange réactionnel	***Vol/réaction***	***Conditions de digestion***	
Tampon (Tango™)	2 µL (1X)	Incubation	55°C – 1 heure
ADN amplifié	10 µL	Inactivation	20 mM EDTA pH 8,0
BseLI	Equivalent 5U		
Vol total (qsp)	20 µL		

c) Détermination des génotypes (Séparation des produits de digestion)

Les fragments d'ADN résultant de la digestion enzymatique sont séparés en fonction de la taille. Deux techniques de séparation sont utilisées.

Electrophorèse sur gel d'acrylamide

La séparation des fragments d'ADN double-brin, qui résultent de la digestion enzymatique de l'amplicon, exploite la variation de la mobilité électrophorétique en fonction de la taille des molécules. Les produits de digestion sont donc séparés sur gel de polyacrylamide 10%, migration 70 minutes à 90 Volt. (**Figure 32)**.

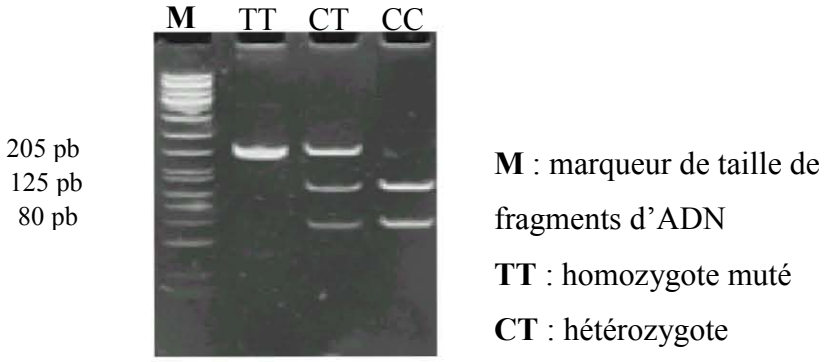


Figure 32 : ***Profil de restriction du polymorphisme FPR1 c.32C>T sur gel de polyacrylamide 10%.***

Chromatographie liquide haute performance

Principe

La technologie Wave System® (Transgenomics®) repose sur le principe de la DHPLC (*Denaturing High Pressure Liquide Chromatography*). Elle est basée sur la possibilité de séparer de façon différentielle l'ADN, en fonction de la taille ou de la nature de l'appariement (homoduplex ou hétéroduplex). L'ADN est adsorbé sur une matrice hydrophobe non poreuse. Le WAVE system est composé de plusieurs compartiments et, en fonction de la température dans le compartiment 'four', il est possible de distinguer trois modes de fonctionnement différents : en conditions dénaturantes, conditions semi-dénaturantes ou conditions non dénaturantes, permettant ainsi des applications multiples avec le même système. Le procédé en conditions non dénaturantes a été employé dans notre étude.

Conditions non dénaturantes : Les applications du WAVE system en conditions non dénaturantes concernent, entre autres, la purification et la séparation en fonction de la taille des fragments d'ADN double brins, notamment des fragments de restriction. L'analyse des échantillons s'effectue à une température constante de 50°C. Le tampon TEAA (*triéthyl ammonium acétate*) hydrophobe par ses groupements alkyl peut interagir avec la surface hydrophobe de la colonne chromatographique. La charge positive de l'ammonium quaternaire permet la liaison au groupement phosphate de l'ADN. A la température d'analyse (50°C), la quantité de TEAA fixant l'ADN est proportionnelle à la taille des fragments d'ADN. Les temps de rétention des ADN sur la colonne sont donc proportionnels à la taille des fragments d'ADN. Par conséquent, l'élution des petits fragments par un gradient croissant d'acétonitrile est plus rapide que pour les fragments longs et s'accompagne d'un profil chromatographique caractéristique à 260 nm. Il est ainsi possible de séparer et de caractériser les fragments d'ADN présents dans l'échantillon.

Procédure

Après digestion de l'amplicon par l'enzyme de restriction *BseLI,* les fragments de restriction sont séparés par chromatographie liquide haute performance (Wave System, Transgenomic) selon le principe de la méthode en conditions non dénaturantes décrit ci-dessus, en utilisant l'application « *Double Stranded-Multiple Fragments* ».

Matériels

- HPLC Wave System (Transgenomic)
- Colonne DNASep (Transgenomic)
- Logiciel WaveMaker (Transgenomic) : acquisition et traitement des données

Composition des tampons

- Tampon A : solution de TEAA à 0,1 M, pH 7,0, contenant 0,025% d'acétonitrile
- Tampon B : solution TEAA à 0,1 M, pH 7,0, contenant 25% d'acétonitrile
- Tampon C : solution d'acétonitrile à 75% pour le lavage de la colonne et comme milieu de stockage de la colonne.
- Tampon D : solution d'acétonitrile à 8% pour chargement de l'échantillon et lavage de la seringue

Choix du gradient d'élution et analyse des chromatogrammes

L'élution du fragment d'ADN doit idéalement se situer vers 4 minutes (temps moyen pour que le fragment se fixe et soit résolu de manière optimale). Le logiciel Wave Maker détermine automatiquement le gradient d'élution à partir des paramètres (taille du fragment,…) entrés par l'utilisateur et propres aux fragments de restriction à séparer.

Dans le cas du polymorphisme *FPR1* 32C>T, le nombre et la taille des fragments attendus sont fonction du génotype :

- Homozygote CC (clivage sur les deux allèles) : 125 pb + 80 pb
- Hétérozygote CT (clivage sur un seul allèle) : 125 + 80 + 205 pb
- Homozygote TT (aucun clivage) : 205 pb

Les fragments dont la taille se trouve dans la gamme de détection du système Wave sont 205 et 125 pb. Le fragment de 80 pb n'est donc pas détecté.

Après digestion enzymatique de l'amplicon, les produits de digestion sont analysés par HPLC (Wave System) en conditions non dénaturantes et chaque amplicon est caractérisé par un ou plusieurs pics chromatographiques en fonction du génotype. Chaque pic généré correspond à un fragment spécifique (**Figure 33**).

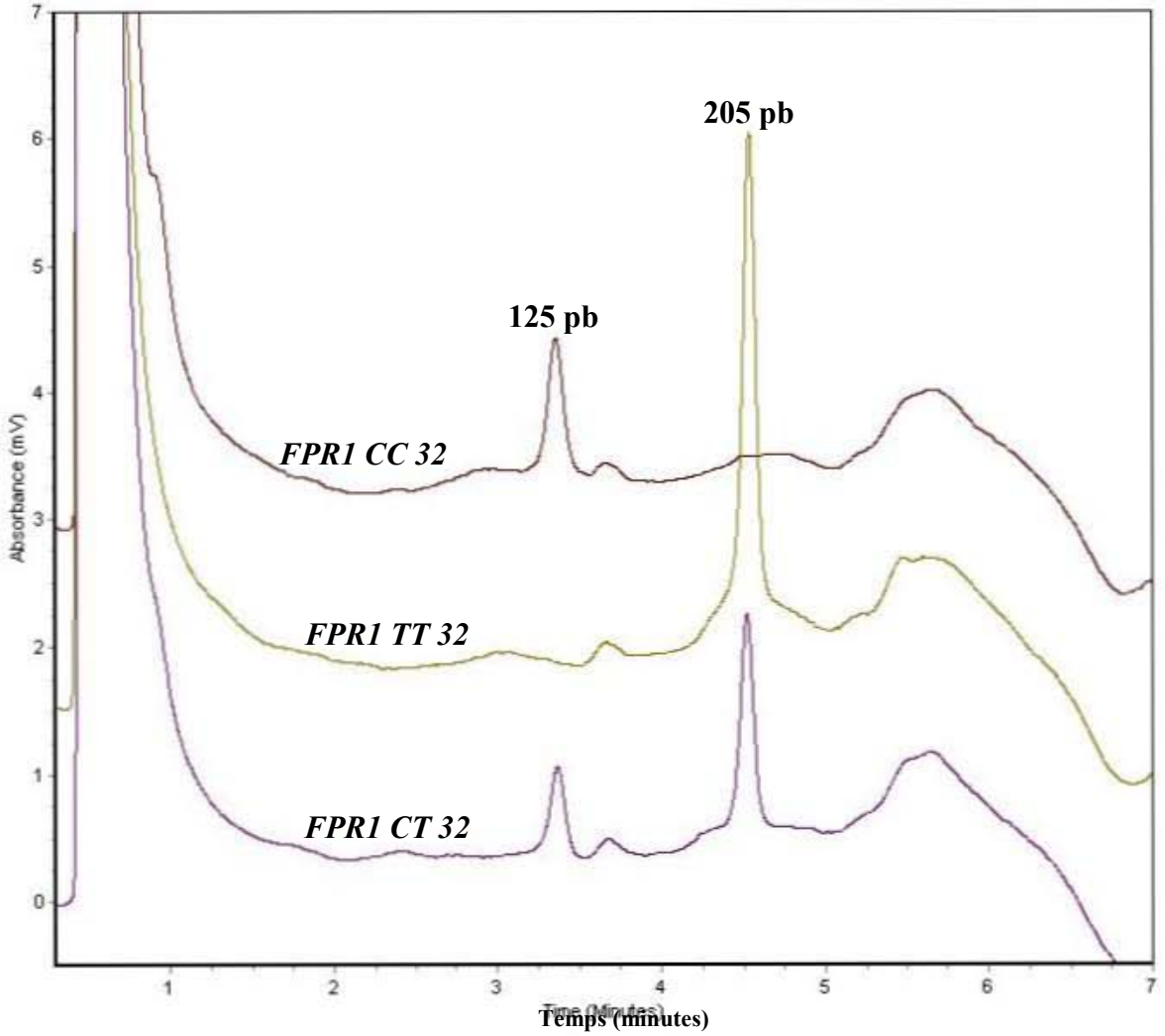


Figure 33 : ***Chromatogramme des fragments de restriction en fonction du génotype FPR1 c.32C>T. Chaque génotype est caractérisé par un chromatogramme propre déterminé par HPLC (Technologie Wave System).***

II.Modèles cellulaires

II.1. Lignées cellulaires

Afin d'étudier le mécanisme de régulation des gènes des défensines-α et de la cathélicidine LL-37, nous avons utilisé deux lignées de cellules monocytaires d'origine humaine. La lignée des pro-monocytes néoplasiques U-937 et la lignée des promyéloblastes HL-60 (*Human Leukocytes-60*). Nous avons également utilisé une lignée de pré-adipocytes fibroblastiques de souris : 3T3-L1.

II.1.1. Cellules U-937

La lignée cellulaire U-937 utilisée durant ce travail a été généreusement offerte par le Docteur Garnotel (Université de Reims, France) et provient de la banque ATCC (*American Type Cell Collection*). Cette lignée a été caractérisée par Sundstrom et Nilsson (1976) comme provenant d'épanchement pleural d'un homme adulte caucasien atteint d'un lymphome histiocytique. Ces cellules ont une morphologie monocytaire. La différenciation monocytique terminale des cellules U-937 peut être induite par plusieurs agents ; comme le surnageant des cultures de lymphocytes en culture, l'ester de phorbol, la vitamine D3, l'interféron-γ, le TNF-α, et l'acide rétinoïque.

II.1.2. Cellules HL-60

Les cellules HL-60 constituent une lignée cellulaire de type promyéloblastique, et sont issues du sang périphérique d'une femme adulte caucasienne atteinte d'une leucémie promyélocytique aigue. Ces cellules, de morphologie myéloblastique, se différencient spontanément et la différenciation peut être stimulée par différents agents, notamment par le butyrate, l'hypoxanthine, l'acide phorbol myristique (PMA), le dimethylsulfoxide (DMSO), l'actinomycine D ou l'acide rétinoïque. Les cellules HL-60 utilisées durant ce travail proviennent de la banque ATCC.

II.1.3. Cellules 3T3-L1

L'utilisation des lignées cellulaires de pré-adipocytes comme modèle d'étude a largement contribué à l'identification de nombreuses biomolécules et à l'élucidation des mécanismes moléculaires impliqués, en particulier dans la régulation métabolique de l'adipogenèse (Cornelius *et coll.,* 1994). La lignée des pré-adipocytes 3T3-L1, initialement établie par Green et Kehinde (1975) constitue un des modèles les plus utilisés pour son potentiel de différenciation en adipocytes relativement stables (Chae et Kwak, 2003). Les 3T3-L1 sont des cellules de type fibroblastique, isolées de l'embryon de souris. La lignée des cellules 3T3-L1 utilisée dans ce travail provient de la banque ATCC.

II.2. Cultures cellulaires

II.2.1. Cellules U-937

Les cellules U-937 ont la propriété de croitre en suspension. Elles sont cultivées dans le milieu RPMI 1640 (Invitrogen™, Cergy Pontoise, France), supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (BioWest, Nuaillé, France), 2 mM de L-Glutamine (Invitrogen), 10 mM HEPES (Invitrogen), 1 mM de sodium pyruvate (Sigma , St. Quentin Fallavier, France), 2,5 g/L de D-Glucose (Sigma), 100 U/ml de pénicilline G, 100 µg/ml de streptomycine et 0,25 µg/ml d'amphotéricine B (Sigma) dans une atmosphère contrôlée à 5% de CO_2 à 37°C. Les cellules sont repiquées tous les 3 jours à raison d'une flasque de 75 cm^2 dans deux flasques de 75 cm^2 de la façon suivante : la suspension cellulaire est transvasée dans un tube de 50 mL et centrifugée pendant 5 minutes à 200 g. Le surnageant est enlevé et le culot cellulaire est repris dans 2 mL de milieu de culture. Les cellules sont ensuite ensemencées dans deux nouvelles flasques de 75 cm^2.

II.2.2. Cellules HL-60

Comme les cellules U-937, les cellules HL-60 ont la propriété de croitre en suspension. Elles sont cultivées dans le milieu RPMI 1640 (Invitrogen), supplémenté par 15% de sérum de veau fœtal (BioWest), 2 mM de L-Glutamine (Invitrogen), 10 mM HEPES (Invitrogen), 1 mM de sodium pyruvate (Sigma), 2,5 g/L de D-Glucose (Sigma), 100 U/ml de

pénicilline G, 100 µg/ml de streptomycine et 0,25 µg/ml d'amphotéricine B (Sigma) dans une atmosphère contrôlée à 5% de CO_2 à 37°C. Les cellules HL-60 sont repiquées tous les 3 jours, de la même façon que les cellules U-937.

II.2.3. Cellules 3T3-L1

Les cellules 3T3-L1 ont la propriété de croitre par adhérence sur un support plastique. Elles sont cultivées dans le milieu D-MEM riche en glucose (Sigma), supplémenté par 10% de sérum bovin (Invitrogen), 4 mM L-glutamine (Invitrogen), 1 mM sodium pyruvate (Sigma), 100 U/ml penicilline et 100 µg/ml streptomycine (Invitrogen) et placées dans une étuve dans une atmosphère contrôlée à 10% CO_2 à 37°C. Les cellules sont maintenues en culture à une densité comprise entre 3 x 10^3 et 6 x 10^4 cellules/cm^2. Elles sont repiquées tous les 3 jours, à raison d'une flasque de 25 cm^2 dans trois flasques de 25 cm^2, de la façon suivante : les cellules sont décollées de la flasque par action de 1 mL de trypsine 0,25 % (W/V)-0,53 mM EDTA (Sigma) pendant 5 min à 37°C. La solution de trypsine est ensuite neutralisée par ajout de 2 mL de milieu complet. La suspension cellulaire ainsi obtenue est placée dans un tube de 15 mL et centrifugée pendant 5 minutes à 125 g. Le surnageant est enlevé et le culot cellulaire est repris dans quelques mL de milieu complet. Les cellules sont ensuite ensemencées dans trois nouvelles flasques de 25 cm^2.

II.3. Conditions de conservation

Les cellules sont conservées dans l'azote liquide, en cryotube, dans le milieu de culture complet additionné de 5% de DMSO (Sigma). La décongélation est réalisée le plus vite possible pour éviter le stress des cellules.

II.4. Test de viabilité et numération cellulaire

La viabilité cellulaire est évaluée par le test d'exclusion au bleu Trypan (Invitrogen). Le principe de la technique consiste à évaluer le nombre de cellules mortes ayant ingéré le bleu Trypan tandis que les cellules vivantes y sont imperméables. Cela permet aussi l'évaluation de la densité cellulaire.

- A un volume de 450 µL de suspension cellulaire, sont ajoutés 50 µL de bleu

trypan à 0,4% (Invitrogen)

- Après homogénéisation à la pipette et après un délai de 3 minutes, une goutte de suspension colorée est déposée sur la lame de l'hémocytomètre
- Après sédimentation pendant quelques instants, la numération cellulaire est réalisée à l'aide d'une cellule de Malassez :
  - Les cellules colorées en bleu sont mortes (perméables au colorant)
  - Les cellules vivantes restent claires et réfringentes (non perméables au colorant).

Pour la mise en pratique des expériences, la préparation cellulaire ne doit pas contenir plus de 20% de cellules mortes (sauf après décongélation où l'on peut en trouver davantage). Le nombre de cellules présentes dans la cellule de Malassez correspondant à un volume de 1µL est noté N. La densité cellulaire est alors de N cellules/µL soit : N x 10^3 cellules/mL.

II.5. Différenciation et révélation des cellules différenciées

II.5.1. Différenciation des cellules U-937 en macrophages

La différenciation des cellules U-937 en cellules ressemblant à des macrophages est réalisée en utilisant le Phorbol 12-Myristate 13-Acétate (PMA). Le PMA stimule de façon spécifique l'activité de la protéine kinase C qui joue un rôle important dans la prolifération et la différenciation des monocytes (Kim *et coll.,* 2005). La différenciation est induite dans des plaques de 6 puits (COSTAR®) de la façon suivante (Angst *et coll.,* 2008) : la suspension cellulaire est placée dans un tube de 50 mL et centrifugée pendant 5 min à 200 g. Le surnageant est enlevé et le culot cellulaire est repris dans quelques mL de milieu. Les cellules sont ensuite ensemencées à raison de 1,5 x 10^6 cellules/puits en présence de 10 nM de PMA (Sigma), puis placées à 37°C dans une atmosphère à 5 % de CO_2 pendant 48 heures. La différenciation des cellules U-937 en macrophages est évaluée sur la base de critères morphologiques. Nous avons suivi en microscopie l'adhérence des cellules sur les plaques de culture. La visualisation de cellules adhérentes avec une forme irrégulière témoigne de leur différenciation en macrophages.

II.5.2. Différenciation des cellules HL-60 en macrophages et en neutrophiles

Les cellules HL-60 sont différenciées en cellules ressemblant soit à des macrophages soit à des polynucléaires neutrophiles en utilisant respectivement le PMA et le DMSO (Coburn, 2006). Les cellules sont différenciées dans des plaques de 6 puits (COSTAR®) à raison de 1,5 x 10^6 cellules / puits. La différenciation en macrophages est induite par 100 nM de PMA pendant 24 h, alors que la différenciation en neutrophiles est induite en deux étapes en présence de 1,2% DMSO pendant 5 jours. Après 48 heures d'incubation en présence de 1,2% DMSO, la suspension cellulaire est centrifugée et le culot est remis en culture pendant 72 heures supplémentaires en présence de 1,2% DMSO.

La différenciation des HL-60 en neutrophiles est évaluée sur la base de critères morphologiques et moléculaires. Au niveau moléculaire, nous avons quantifié l'expression d'un marqueur de différenciation en neutrophiles, le CD11b (Xu M *et coll.,* 2008), alors qu'au niveau morphologique, nous avons procédé à une coloration au *May-Grünwald Giemsa* qui permet la visualisation des noyaux segmentés et caractéristiques des cellules polynucléaires. Quelques gouttes des suspensions cellulaires traitées ou non au DMSO sont étalées sur une lame de verre. Les cellules sont ensuite fixées par immersion dans une solution de May-Grünwald Giemsa non diluée pendant 3 min. Après un premier lavage avec de l'eau neutre, deux séries d'incubations/lavages successifs réalisés pendant 1 et 20 min en utilisant respectivement les dilutions 2 fois et 10 fois de la solution May-Grünwald Giemsa. Après séchage, les lames sont examinées au microscope.

Nous avons également suivi en microscopie l'adhérence des cellules HL-60 traitées par du PMA. La visualisation de cellules adhérentes en forme d'amas de cellules au fond des puits atteste de leur différenciation en macrophages. Au niveau moléculaire, l'expression du gène *CD14*, un marqueur des macrophages, a été quantifiée dans les cellules HL-60 traitées ou non avec du PMA.

II.5.3. Différenciation des cellules 3T3-L1 en adipocytes

La différenciation des 3T3-L1 en adipocytes est réalisée dans des plaques de 6 puits (2 x 10^6 cellules/puits) suivant le protocole publié par Choi *et coll.* (2006) avec quelques modifications. Après confluence (jour 0), la différenciation des 3T3-L1 en adipocytes est

induite par un milieu complet additionné de 0,5 mM méthylisobutylxanthine (Sigma), 250 nM dexaméthasone (Sigma) et 5 µg/mL d'insuline (Sigma). Deux jours après, le milieu est remplacé par un milieu complet contenant 0,5 µg/mL d'insuline uniquement. Ce milieu est alors renouvelé tous les deux jours jusqu'à 7 jours (jour 7).

La différenciation adipocytaire est évaluée par une coloration *oil red O* (Sigma). La différenciation adipocytaire étant caractérisée par une accumulation des lipides dans les cellules. Le principe de cette technique repose sur les propriétés lipophiles du colorant *oil red O* vis-à-vis des lipides neutres. Les lipides intracellulaires sont ainsi colorés en rouge. La coloration des cellules 3T3-L1 est réalisée suivant le protocole de Sen *et coll.* (2001) avec quelques adaptations. Après élimination du milieu de culture dans les puits, les cellules sont lavées avec 500 µL de PBS 1X (Invitrogen) par puits. Les cellules sont ensuite fixées par ajout de 500 µL d'une solution de formaline à 10% pendant 1 heure à 4°C. Après lavage à l'eau, 1 mL de solution de colorant *oil red O* à 60% dans l'isopropanol est ajouté dans chaque puits, puis les cellules sont incubées 15 min à température ambiante. Après élimination de la solution de coloration, les cellules sont lavées 3 fois à l'eau distillée (au troisième lavage, l'eau de rinçage devient incolore), puis examinées au microscope.

II.6. Traitements des cellules

II.6.1. Solutions de traitement

- Solution de glucose à 25 mM (Sigma).
- Solution d'insuline humaine à 1,72 mM (Sigma). Une solution de travail à 17,2 µM est préparée par une dilution à 1/100 dans du milieu de culture.
- Surnageants de culture cellulaire : les surnageants de culture des cellules U-937 sont récupérés après 48 h d'incubation dans les conditions de culture décrites précédemment. Les surnageants sont centrifugés pendant 5 min à 500 g avant application sur les cellules 3T3-L1.

II.6.2. Traitements

Les cellules 3T3-L1 sont cultivées pendant sept jours après induction de la différenciation adipocytaire. Les cellules U-937 sont cultivées pendant 48 h après induction

de la différenciation en macrophages et les cellules HL-60 sont cultivées pendant 5 jours après induction de la différenciation en neutrophiles. Le milieu est ensuite remplacé par du milieu sans sérum de veau et les cellules sont, soit non traitées, soit traitées avec :

- Cellules HL-60 : 4,5 et 10 mM de glucose en présence ou non de 150 nM d'insuline pendant 6 heures
- Cellules 3T3-L1 : 5 et 10 mM de glucose en présence ou non de 100 ou 150 nM d'insuline pendant 6 h. Surnageant de culture des cellules U-937 à raison de 50 % du volume de culture pendant 24 h.

II.6.3. Co-culture des lignées cellulaires U-937 et 3T3-L1

La co-culture des cellules permet d'étudier l'effet des interactions entre les deux lignées cellulaires sur l'expression du gène de la cathélicidine CRAMP (l'homologue de LL-37 chez la souris) dans les adipocytes 3T3-L1. Les cellules 3T3-L1 sont cultivées pendant sept jours après induction de la différenciation adipocytaire dans des plaques de 6 puits, alors que les cellules U-937 sont cultivées pendant 48 h après induction de la différenciation en macrophages dans des puits individuels « *Transwells* » (BD Bioscience). Les *Transwells* sont disposés sur des plaques de 6 puits. Le fond des *transwells* constitue une membrane avec une porosité de 0,4 µm pour permettre le passage et la diffusion des substances du compartiment interne du *transwell* dans le puits dans lequel il est disposé (**Figure 34**). Après avoir remplacé le milieu de culture des cellules par un milieu sans sérum, le *transwell* des cellules U-937 est disposé dans le puits des cellules 3T3-L1 et incubé pendant 48 h à 37°C.

Figure 34 : ***Schéma du système de co-culture (BD Falcon^{TM}).***

II.7. Analyse transcriptionnelle des gènes des DEFA1-3 et de CRAMP

II.7.1. Extraction et contrôle de qualité des ARN

II.7.1.1. Principe de la technique

La technique d'extraction utilisée est basée sur le principe d'adsorption spécifique des acides nucléiques sur une matrice de silice dans des colonnes de purification (Qiagen). Elle est proposée dans le kit RNeasy mini de Qiagen®. Après lyse des cellules et homogénéisation, l'homogénat est déposé sur une colonne de purification. L'ARN total est retenu sur la membrane de silice de la colonne, alors que les autres constituants se trouvant dans l'échantillon sont éliminés par des lavages successifs. Enfin, les ARN sont élués par un volume d'eau dépourvue de ribonucléases (RNases).

II.7.1.2. Protocole

Les cellules cultivées sont récupérées directement dans du PBS 1X (Invitrogen) à raison de 0,5 mL/puits dans des tubes eppendorf de 2 mL. L'ARN total est extrait à l'aide du kit RNeasy mini (Qiagen) en utilisant le protocole dédié aux cellules d'origine animale. Toutes les manipulations sont réalisées dans la glace. La lyse des cellules est réalisée en ajoutant au tampon de lyse du β-mercaptoéthanol (99:1, v/v). Ce dernier permet l'inactivation des éventuelles RNases présentes dans l'échantillon. Les ARN retenus sur la colonne d'extraction sont traités avec une solution de DNase I afin d'éliminer l'éventuelle contamination en ADN génomique. L'ARN total est élué dans 50 µl d'H_2O stérile dépourvue de RNases.

Le dosage et la vérification de la pureté de l'ARN sont effectués par mesure des absorbances aux longueurs d'onde 260 nm et 280 nm. L'ARN n'est pas ou peu contaminé par des protéines si le rapport absorbance à 260 nm / absorbance à 280 nm est compris entre 1,8 et 2,1. L'absorbance à 260 nm permet de connaître la concentration d'ARN. Sachant qu'une unité d'absorbance à 260 nm correspond à 40 ng/µL :

$$[ARN]\ (ng/\mu L) = abs\ 260\ nm \times 40 \times facteur\ de\ dilution$$

L'intégrité de l'ARN est confirmée par une électrophorèse en gel d'agarose en conditions dénaturantes (formaldéhyde). La visualisation de deux bandes distinctes correspondant aux ARN ribosomaux 28S et 18S avec un rapport d'intensité des bandes de 2 : 1 est la preuve de la bonne qualité de l'ARN.

II.7.2. Quantification des peptides antimicrobiens par RT-PCR semi-quantitative

Les taux d'expression des gènes des peptides antimicrobiens (DEFA1-3 et CRAMP*)* et des marqueurs de différenciation cellulaire (CD11b et CD14) sont déterminés par RT-PCR semi-quantitative. L'expression des ARNm des DEFA1-3 et de CRAMP est normalisée sur les gènes de référence 18S et β-actine, respectivement.

II.7.2.1. Transcription inverse (RT)

Pour une réaction de RT, 200 ng d'ARN total provenant des cellules U-937 ou HL-60, ou 300 ng d'ARN total provenant des cellules 3T3-L1 sont utilisés. La synthèse d'ADNc simple brin s'effectue selon le protocole suivant : les ARN sont mélangés à 0,25 µg d'Oligo $(dT)_{15}$ (Promega®, Charbonni, France) (soit 0.5 µL) et 1X de tampon RT (Promega®) (soit 4 µL) dans un volume de 13,5 µL, ajusté avec de l'eau déporvue de RNases. Après 5 min d'incubation à 65°C dans le thermocycleur (I-Cycler®, Biorad), le mélange est placé dans de la glace, puis, 2 mM de dNTP (Promega®), 20 unités d'inhibiteur de RNases (RNasine) (Promega®) et 200 unités d'enzyme de reverse transcription (*Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase*) (Promega®) sont ajoutées. Le volume final est ajusté à 20 µL avec de l'eau dépourvue de RNases, puis incubé à 42°C pendant 60 min pour la synthèse de l'ADN complémentaire. L'ADNc obtenu est ensuite soumis à des PCR semi-quantitatives. Des témoins de RT et de PCR sont effectués.

II.7.2.2. PCR semi-quantitative

La PCR est appelée semi-quantitative car le résultat de quantification est exprimé par le rapport entre l'intensité de la bande correspondant au gène d'intérêt et celle correspondant au gène de référence, aussi dit domestique, en l'occurrence le 18S humain et la β-actine de souris. Les PCR des gènes étudiés ont été réalisées dans des conditions non saturantes déterminées préalablement (**Tableau 5**).

La PCR semi-quantitative est réalisée à l'aide d'un appareil I-Cycler® (Biorad). 50 µL de mélange réactionnel de PCR inclus le tampon de la Taq polymérase à concentration 1X (Roche), 200 µM de dNTPs (Roche), 0,20 à 0,50 µM (**Tableau 5**) de chacun des oligonucléotides amorces spécifiques (Sigma), 1 unité de Taq DNA polymérase (Roche) et 2 µL d'ADNc. Les paramètres d'amplification sont les suivants : après un cycle de dénaturation initiale à 95°C pendant 4 min, 30 cycles d'amplification sont réalisés chacun est effectué ainsi : séparation des brins à 95°C pendant 30 sec, hybridation à 60,4°C pendant 30 sec, élongation à 72°C pendant 30 sec. Un cycle d'élongation finale est réalisé à 72°C pendant 5 min. Les séquences des oligonucléotides amorces utilisées et les conditions de PCR pour les gènes codant les DEFA1-3*,* LL-37*,* CRAMP*,* 18S, CD14, CD11b et β-actine sont présentées dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 : ***Séquences d'oligonucléotides et conditions d'amplification des gènes étudiés par RT-PCR semi-quantitative.***

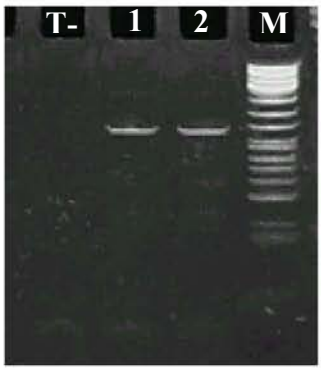
Gènes	Séquences des amorces		Amorces (µM)	Dénaturation (°C/sec)	Hybridation (°C/sec)	Elongation (°C/sec)	Nombre de cycles	Taille de l'amplicon (pb)
LL-37	Sens : Antisens :	5'- CTC GGA TGC TAA CCT CT- 3' 5'-CAT ACA CCG CTT CAC C-3'	0,50	95/30	62,3/60	72/60	35	178
DEFA1-3	Sens : Antisens :	5'- GCG GAC ATC CCA GAA GTG GTT G - 3' 5'-TCA GCA GCA GAA TGC CCA GAG TC - 3'	0,50	95/30	63/30	72/30	30	174
CRAMP	Sens : Antisens :	5'-CCGAGCTGTGGATGACTTCAA-3' 5'-CTG CCC CCA TAC ACT GCT TCA C-3'	0,25	95/30	60,4/30	72/30	35	215
B-actine	Sens : Antisens :	5'-AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC-3' 5'-TCC CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA-3'	0,20	95/30	60,4/30	72/30	35	231
18s	Sens : Antisens :	5'-TAT GGT TCC TTT GGT CGC TC-3' 5'-CTT GGA TGT GGT AGC CGT TT-3'	0,40	95/30	62,3/60	72/60	35	153
CD14	Sens : Antisens :	5'-ACT CCC TCA ATC TGT CGT TCG CTG-3' 5'-CTG AAG CCA AGC AGT TTG AGT CC-3'	0,50	95/30	63°C/60	72/60	30	250
CD11b	Sens : Antisens :	5'-CAGAGCGTGGTCCAGCTTCA-3' 5'-CCTTCATCCGCCGAAAGTCA-3'	0,25	95/30	60/30	72/30	30	406

II.7.2.3. Electrophorèse et quantification

La quantification se traduit par la mesure de l'intensité des bandes d'ADN amplifié, obtenues après électrophorèse et révélation sur gel de polyacrylamide. Le polyacrylamide forme un maillage. Sous un courant électrique, les fragments d'ADN migrent au travers du réseau de polyacrylamide, du négatif vers le positif en fonction de leurs tailles. Ces fragments sont ensuite révélés sous une lumière UV (ultraviolet) par mise en présence de bromure d'éthidium, un intercalant de l'ADN qui émet une fluorescence sous UV.

Le gel utilisé dans ce travail est un gel à 10% d'acrylamide composé de : 3,15 mL d'eau, 1,125 mL d'acrylamide à 40% (Sigma), 450 µL de tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) (Merk), 45 µL de persulfate d'ammonium à 10% (Quantum biotachnologies) et 4,5 µL de TEMED (NNN'N'-Tétra Méthyl Etthylène Diamine) (Bioprobe). Une fois le gel polymérisé, 8 µL d'échantillon de PCR mélangés à 1,6 µL de tampon de charge sont déposés (Promega, 6X) (excepté pour 18S et β-actine : respectivement 5 µL et 1 µL). Un marqueur de taille (ϕX174/*Hinf* I, Promega) est aussi déposé sur un puits du gel. La migration est effectuée à 70V, entre 70 et 90 minutes selon la taille des fragments d'ADN à séparer. Le gel est ensuite incubé dans un bain de 50 mL d'eau en présence de 5 µL de bromure d'éthidium (Sigma) pendant 10 minutes. Sous UV, une photo du profil d'électrophorèse sur gel est prise à l'aide d'un appareil photo numérique (Kodak EDAS) (**Figure 35**). L'analyse et l'estimation de l'intensité des bandes d'intérêt sont réalisées au moyen du logiciel Kodak 1 D 3.5. (Kodak EDAS).

174 pb (DEFA1-3)



M : marqueur de taille de fragments d'ADN
1, 2 : produits de PCR de DEFA1-3 (174 pb)
T- : témoin négatif

Figure 35 : ***Profil d'électrophorèse des produits de PCR de DEFA1-3 sur gel de polyacrylamide à 10 %.***

III.Analyses statistiques

Outils

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels SAS version 9.1 (SAS Institute Inc, NC, USA) et STATVIEW (SAS Institute Inc, NC, USA).

Le seuil de significativité a été fixé à 5% excepté pour les analyses d'association entre le polymorphisme *FPR1* c.32C>T et les molécules d'inflammation et d'adhésion cellulaire (seuil à 2‰).

Etudes d'associations

- Vérification de la normalité de la distribution des valeurs des paramètres étudiés par calcul des coefficients de dissymétrie (Skewness), d'applatissement (Kurtosis) et calcul des moyennes, des écart-types et des valeurs minimales et maximales des différents paramètres biologiques étudiés dans notre population.

- Transformation des valeurs de concentration des paramètres pour lesquels les distributions ne suivent pas une loi normale. Transformation en Log_{10} pour les paramètres suivants : transcrits de LL-37, DEFA1-3 et FPR, Triglycérides, CRP, TGO, TGP, IL-6, IL-8, IL-18, MCP-1, TNF-α, TNF-RII, EGF, IGF-1, IGF-BP3, VEGF, E-selectine, L-selectine, P-selectine, ICAM-1 et les globules blancs.

- Comparaison des moyennes des paramètres entre les groupes étudiés par l'analyse de variance (ANalyse Of VAriance ; ANOVA) portant sur les valeurs brutes ou transformées (pour les paramètres dont la distribution n'est pas normale), ajustées ou non sur les facteurs de confusion considérés dans chaque analyse, à l'aide de la procédure GLM pour des sujets génétiquement indépendants. Dans le cas de LL-37, lorsque l'analyse de variance montre une différence significative du taux de transcrits de LL-37 entre les groupes d'IMC, le test Tukey-Kramer est utilisé pour déterminer quel groupe est significativement différent des autres.

- Analyse de corrélation entre les variables anthropométriques (IMC, tour de taille,…) et/ou les concentrations de variables biologiques avec les variables à expliquer en utilisant le

coefficient de corrélation de Pearson (test paramétrique) ou le coefficient de corrélation de Spearman (test non paramétrique).

- Estimation de l'effet des variables (IMC, PAS,…) et/ou des concentrations des variables biologiques sur les variables à expliquer en utilisant les analyses de régression linéaire multiples. Ceci permet de calculer les coefficients de régression et les pourcentages de variabilité expliquée des variables étudiées par la procédure GLM.

- Test de l'équilibre de Hardy Weinberg pour le polymorphisme *FPR1* c.32C>T par le test de Chi2 (χ^2). La loi de Hardy-Weinberg permet, sous certaines conditions, le calcul des fréquences génotypiques à partir des fréquences alléliques. Ainsi : soient A et a deux allèles d'un même locus, tel que q est la fréquence de l'allèle A et 1-q la fréquence de l'allèle a. les fréquences des génotypes en équilibre de Hardy-Weinberg sont :

q^2 = fréquence du génotype AA
2q (1-q) = fréquence du génotype Aa
$(1-q)^2$ = fréquence du génotype aa

L'équilibre de Hardy-Weinberg est le modèle théorique central de la génétique des populations. La notion d'équilibre dans le modèle de Hardy Weinberg est soumise aux hypothèses/conditions suivantes :

- la population est panmitique (les couples se forment au hasard (panmixie) et leurs gamètes se rencontrent au hasard (pangamie)).
- La population est « infinie » (très grande pour minimiser les variations d'échantillonnage).
- Il ne doit y avoir ni sélection, ni mutation, ni migration (pas de perte/gain d'allèles).
- Les générations successives sont discrètes (pas de croisement entre générations différentes).

Dans ces conditions la diversité génétique de la population se maintient et doit tendre vers un équilibre stable de la distribution génotypique.

Le test du Chi2 de conformité a été réalisé afin de comparer les fréquences génotypiques observées aux valeurs théoriques (calculées à partir des fréquences allèliques).

- Estimation de l'effet du polymorphisme *FPR1* c.32C>T sur les concentrations des molécules d'inflammation et d'adhésion cellulaire par comparaison des trois groupes de génotypes. En utilisant le test ANOVA, nous avons testé 4 modèles avec ou sans ajustement :

  - Comparaison du génotype CT vs. CC et TT vs. CC
  - Comparaison du génotype TT vs. CT + CC ; effet récessif
  - Comparaison TT + CT vs. CC ; effet dominant
  - Comparaison entre les trois génotypes en assignant les valeurs 0, 1, 2 pour les génotypes CC, CT et TT, respectivement de l'allèle T ; effet allèlique.

- Estimation de l'effet des traitements sur l'expression des molécules d'intérêt dans les modèles cellulaires par le *test Student*.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'objectif global de ce travail est de comprendre l'éventuelle implication des peptides antimicrobiens, défensines-α et cathélicidines, dans la physiopathologie cardiovasculaire et d'évaluer si nous pouvons proposer ces peptides comme de nouveaux biomarqueurs du risque cardiovasculaire.

Dans un premier temps, nous avons étudié le profil d'expression des ARNm des défensines-α 1, 2 et 3 (DEFA1-3) et de la cathélicidine LL-37 dans les PBMCs en relation avec les indicateurs et facteurs de risque de maladies cardiovasculaires. Nous avons déterminé l'expression quantitative des ARNm des DEFA1-3 et de LL-37 dans les PBMCs de sujets choisis dans la cohorte STANISLAS. Ensuite, nous avons testé les associations entre l'expression de ces gènes et les indicateurs et facteurs de risque cardiovasculaire. Les PBMCs ont été choisies pour les raisons suivantes :

1) Ce sont des cellules facilement accessibles chez l'Homme.
2) En circulation, les PBMCs sont en contact avec différents tissus et peuvent répondre à des changements de l'activité de ces tissus en régulant l'expression des gènes impliqués dans les réponses immunes et inflammatoires.
3) Elles expriment de nombreuses molécules liées à l'inflammation et à la réponse immunitaire.

Dans un second temps, nous avons étudié l'expression quantitative des ARNm du récepteur FPR, un membre de la famille des récepteurs des peptides antimicrobiens, dans les PBMCs. Nous avons ensuite corrélé l'expression des ARNm de FPR et celles des DEFA1-3 et de LL-37. Nous avons également réalisé des études d'associations entre un polymorphisme du gène de FPR, *FPR1 c.32C>T,* et les taux circulants de molécules d'inflammation et d'adhésion cellulaire et les taux des ARNm de FPR et de LL-37.

Enfin, le troisième objectif vise à comprendre la régulation de l'expression des défensines-α et des cathélicidines en réponse à différents stimuli. Nous avons donc entrepris des études *in vitro* sur la régulation de l'expression de ces molécules dans des modèles cellulaires en réponse au glucose, l'insuline et l'adipogenèse.

I. Association entre l'expression de la cathélicidine et des défensines-α dans les PBMCs et les facteurs de risques métaboliques et cardiovasculaires dans la cohorte STANISLAS

I.1. Analyse quantitative de l'expression du gène de la cathélicidine LL-37 par RT-PCR en temps réel (*Publication 1*).

Afin d'évaluer l'éventuelle relation entre l'expression de la cathélicidine humaine LL-37 et les indicateurs et facteurs de risque de maladies cardiovasculaires, nous avons quantifié par RT-PCR en temps réel l'expression du gène de LL-37 dans les PBMCs d'un échantillon de sujets sélectionnés à partir de la cohorte STANISLAS.

I.1.1. Caractéristiques de l'échantillon étudié

L'échantillon de travail utilisé dans cette étude est composé de 178 sujets adultes (90 hommes et 88 femmes). Les caractéristiques cliniques et biologiques de ces sujets comparées selon le sexe sont présentées dans le **Tableau 6**. Les hommes présentent un indice de masse corporelle, un tour de taille, un rapport tour de taille/hanches, une pression artérielle, des taux de LDL-C, apoB, triglycérides, glucose, une concentration en monocytes et des activités des enzymes hépatiques TGO et TGP significativement plus élevés ($p \leq 0,01$ à $p \leq 0,001$) que les femmes. A l'inverse, les femmes présentent des taux de HDL-C ($p \leq 0,001$) et d'apoA-I ($p \leq 0,01$) significativement plus élevés que les hommes.

Parmi les 178 sujets, certains individus prennent des médicaments : 2 hommes et 2 femmes sous antidiabétiques, 2 hommes et 3 femmes sous hypolipémiants, 1 homme et 1 femme sous anti-inflammatoires, 4 femmes prenant des contraceptifs oraux et 12 femmes sont en ménopause. Toutefois, ces sujets n'ont pas été exclus car ni la prise de ces médicaments ni la ménopause ne semble affecter les corrélations étudiées par la suite. En effet, nous n'avons pas trouvé de différence de significativité des corrélations selon que les sujets sous traitement et les femmes en ménopause sont inclus ou non dans l'analyse.

Tableau 6 : ***Caractéristiques cliniques et biologiques des sujets de la cohorte STANISLAS ayant fait l'objet d'une étude d'expression du gène de LL-37 par RT-PCR en temps réel.***

Variable	Hommes (n=90)	Femmes (n=88)
Age (années)	51,8 ± 4,9	49,8 ± 3,8**
IMC (Kg/m^2)	26,4 ± 3,6	24,7 ± 3,9**
Tour de taille (cm)	88,5 ± 11,0	74,4 ± 9,7***
Rapport tour taille/hanche	0,90 ± 0,07	0,77 ± 0,06***
SM selon ATP III [n (%)]	11 (12,1%)	6 (6,8%)
SM selon IDF [n (%)]	15 (16,5%)	13 (14,8%)
PAS (mm Hg)	124,1 ± 13,7	116,4 ± 15,1***
PAD (mm Hg)	75,2 ± 8,2	68,0 ± 9,0***
Cholestérol total (mmol/l)	5,87 ± 0,90	5,64 ± 0,88
HDL-C (mmol/l)	1,63 ± 0,38	1,87 ± 0,46***
LDL-C (mmol/l)	3,65 ± 0,83	3,27 ± 0,81**
ApoA-I (g/l)	1,59 ± 0,24	1,70 ± 0,26**
ApoB (g/l)	1,09 ± 0,20	0,99 ± 0,20***
Triglycérides (mmol/l) [a]	1,15 (0,76 - 1,74)	0,95 (0,60 - 1,51)**
Glucose (mmol/l)	5,70 ± 0,89	5,27 ± 0,54***
CRP (mg/l) [a]	1,12 (0,38 - 3,31)	1,02 (0,35 - 2,95)
TGO (U/l) [a]	25,7 (19,5 - 33,9)	19,5 (14,8 - 25,7)***
TGP (U/l) [a]	29,5 (19,9 - 43,6)	19,9 (12,6 - 31,6)***
Globules blancs (10^9 cellules/l) [a]	5,75 (4,57 - 7,24)	5,89 (4,47 - 7,76)
Lymphocytes (%)	29,8 ± 7,1	30,1 ± 7,5
Neutrophiles (%)	58,1 ± 7,9	59,4 ± 8,4
Ratio lymphocyte/neutrophile	0,54 ± 0,19	0,54 ± 0,22
Monocytes (%)	9,0 ± 1,7	7,8 ± 1,9***

Valeurs présentées en moyenne ± écart-type
[a] Valeurs log_{10}-transformées et présentées en moyenne géométrique (rangée de 1 écart-type)
SM : syndrome métabolique
ANOVA globale entre le groupe des hommes et le groupe des femmes sur les valeurs non transformées (valeurs présentées en moyennes arithmétiques) ou sur les valeurs log_{10}-transformées (valeurs présentées en moyennes géométriques).
*** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.*

En général, et en accord avec les données de la littérature, l'analyse des caractéristiques cliniques et biologiques de l'échantillon de travail suggère que les femmes, contrairement aux hommes, présentent un profil avantageux vis-à-vis du risque des maladies cardiovasculaires et du syndrome métabolique. Ces observations montrent bien l'intérêt de distinguer les hommes des femmes dans les études d'associations.

I.1.2. Quantification de l'expression des ARNm du gène de LL-37

Les ARNm du gène de LL-37 sont exprimés en quantité largement suffisante pour être détectés chez 177 sujets (1494 ± 2378 copies de transcrits/25ng d'ADNc) sur les 178 sujets étudiés. Un sujet n'a donc pas fait l'objet d'une quantification par RT-PCR pour LL-37, à cause d'une mauvaise préparation de cet échantillon ou d'une quantité insuffisante d'ARNm disponible. Les valeurs d'expression de LL-37 ne suivent pas une distribution normale et sont donc $\log_{10}$-transformées.

Du fait que nous avons observé des différences significatives entre les hommes et les femmes au niveau des caractéristiques cliniques et biologiques de l'échantillon étudié, nous avons comparé l'expression du gène de LL-37 entre les hommes et les femmes afin d'évaluer l'effet du sexe sur l'expression de ce gène.

Nos résultats montrent que la moyenne des taux d'expression des ARNm de LL-37 est de l'ordre de 2 fois plus élevé chez les hommes que chez les femmes [991 (339-2691) vs. 575 (214-1549) copies de transcrits] ($p \leq 0,001$; **Figure 36**), suggérant que le sexe pourrait être un déterminant biologique de l'expression de LL-37 dans les PBMCs.

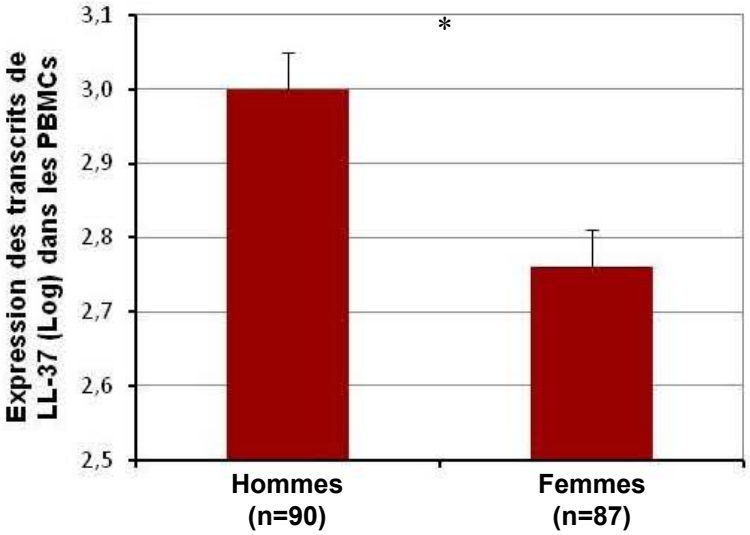


Figure 36 : ***Expression des transcrits du gène de LL-37 selon le sexe. Les valeurs sont transformées en $\log_{10}$, ensuite présentées par la moyenne ± ES (erreur standard). (* $p \leq 0,001$; test ANOVA).***

I.1.3. Association entre l'expression du gène de LL-37 et les facteurs de risque cardiovasculaire et du syndrome métabolique

I.1.3.1. Corrélations simples

Etant donné que l'expression des ARNm de LL-37 varie significativement selon le sexe et afin d'évaluer l'existence de liens entre le niveau d'expression de ces ARNm dans les PBMCs et les indicateurs de risque cardiovasculaire et métabolique, nous avons calculé le coefficient de corrélation de Pearson chez les hommes et les femmes séparément (**Tableau 7**).

Tableau 7 : ***Corrélations entre les paramètres cliniques et biologiques et le taux des ARNm de LL-37 chez les hommes et les femmes (Test de Pearson, p ≤ 0,05).***

Variable	Hommes (n=90)	Femmes (n=87)	$p^{\dagger}$
	r	*r*	
Age (années)	0,093	0,068	NS
IMC (Kg/m^2)	0,184	**0,341*** **	NS
Tour de taille (cm)	0,191	**0,283** **	NS
Rapport tour taille/hanches	**0,255***	0,107	NS
PAS (mm Hg)	**0,351*** **	**0,240***	NS
PAD (mm Hg)	0,165	0,125	NS
Cholestérol total (mmol/l)	-0,013	0,067	NS
HDL-C (mmol/l)	**-0,400*** **	**-0,252***	NS
LDL-C (mmol/l)	0,113	0,141	NS
ApoA-I (g/l)	**-0,227***	-0,106	NS
ApoB (g/l)	0,167	0,184	NS
Triglycérides (mmol/l) [a]	**0,233***	**0,221***	NS
Glucose (mmol/l)	**0,274** **	0,077	NS
CRP (mg/l) [a]	0,139	0,132	NS
TGO (U/l) [a]	0,120	-0,090	NS
TGP (U/l) [a]	**0,308** **	0,006	NS
Globules blancs (10^9 cellules/l) [a]	**0,214***	0,175	NS
Neutrophiles (%)	**0,327** **	0,128	NS
Lymphocytes (%)	**-0,397*** **	-0,089	NS
Monocytes (%)	0,077	-0,168	NS

r : coefficient de corrélation de Pearson
$P^{\dagger}$: probabilité du test d'interaction avec le sexe
[a] Valeurs log_{10}-transformées
** p ≤ 0,05 ; ** p ≤ 0,01 ; *** p ≤ 0,001.*

Nos résultats montrent que le taux d'expression des ARNm de LL-37 est significativement corrélé avec l'IMC ($r = 0,341$; $p \leq 0,001$) et le tour de taille ($r = 0,283$; $p \leq 0,01$) chez les femmes, alors qu'il est corrélé avec le rapport tour de taille/hanche ($r = 0,255$; $p \leq 0,05$) chez les hommes **(Tableau 7)**. De plus, le taux des ARNm de LL-37 est également corrélé positivement avec la PAS ($p \leq 0,05$), le taux de triglycérides ($p \leq 0,05$) et négativement avec le taux de HDL-C ($p \leq 0,05$) chez les femmes. L'expression des ARNm de LL-37 chez les hommes est corrélé positivement avec la PAS ($p \leq 0,001$), les taux de triglycérides ($p \leq 0,05$) et de glucose ($p \leq 0,01$), l'activité TGP ($p \leq 0,01$) et le nombre des neutrophiles ($p \leq 0,01$), et négativement avec les taux de HDL-C ($p \leq 0,001$), d'apoA-I ($p \leq 0,05$) et le nombre de lymphocytes ($p \leq 0,001$).

Bien que l'analyse de corrélations simples montre des associations avec l'expression des ARNm de LL-37 dépendantes du sexe, le test d'interaction avec le sexe n'est significatif pour aucun des paramètres analysés. La différence d'associations observées entre le groupe des hommes et le groupe des femmes pourrait donc être due à une faible puissance du test statistique.

Nous avons ensuite analysé plus en détail la relation entre l'IMC et l'expression des ARNm de LL-37. Chez les femmes, le taux d'ARNm de LL-37 est significativement augmenté dans le groupe de femmes ayant un IMC > 30 kg/m^2 (considérées comme obèses) par comparaison aux groupes de femmes en surpoids (IMC = [25 - 30] kg/m^2) ou de poids normal (IMC < 25 kg/m^2) ($p = 0,015$; *Test Tukey-Kramer*). Cependant, aucune différence significative concernant l'expression des ARNm de LL-37 n'a été observée entre les différents groupes d'IMC chez les hommes **(Figure 37).**

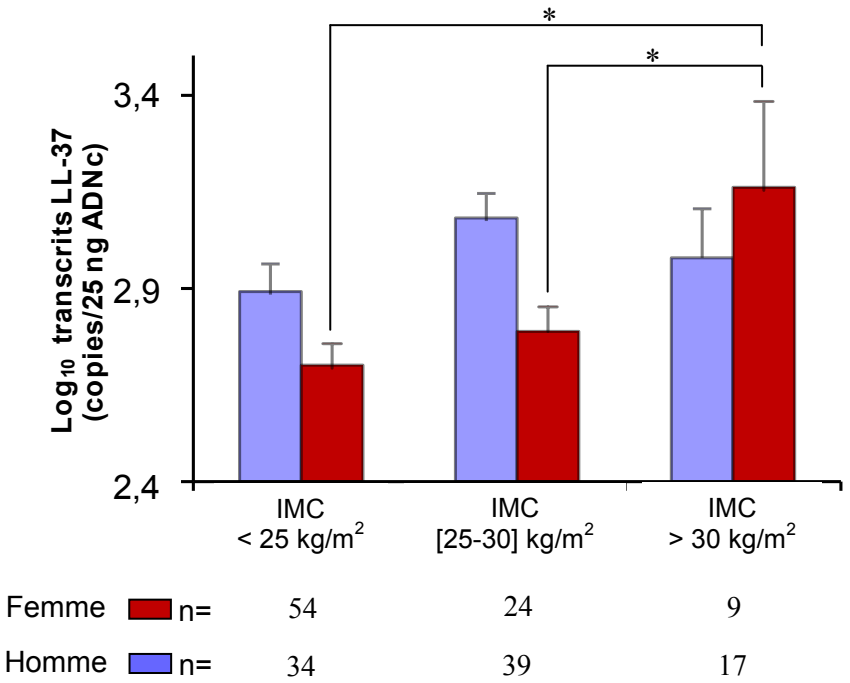


Figure 37 : ***Expression des transcrits de LL-37 chez les hommes et les femmes en fonction des classes d'IMC. Les valeurs d'expression des transcrits de LL-37 sont transformées en log_{10} et présentées sous forme de moyenne ± erreur standard. * p = 0.015 (Test Tukey-Kramer). (Benachour et coll., 2009).***

I.1.3.2. Régressions multiples

L'obésité, notamment l'obésité abdominale constitue un facteur de risque central du syndrome métabolique et des complications cardiovasculaires (Eckel *et coll.,* 2005 ; Després et Lemieux, 2006 ; Cameron *et coll.,* 2008). Du fait que l'expression de LL-37 semble être fortement associée avec les indicateurs de l'obésité, à savoir l'IMC et le tour de taille, nous avons évalué la variabilité des différents indicateurs de risque cardiovasculaire expliquée par l'expression de LL-37 indépendamment des indicateurs de l'obésité, l'IMC et la mesure de tour de taille **(Tableau 8).**

Après ajustement sur l'IMC et le tour de taille, l'expression des ARNm de LL-37 reste significativement associée avec la PAS (p = 0,003), les taux de HDL-C (p < 0,001) et de glucose (p = 0,028), l'activité de l'aminotransférase TGP (p = 0,013), les neutrophiles (p = 0,001) et les lymphocytes (p < 0,001), expliquant respectivement 7,9% ; 11,5% ; 4,2% ; 5,8% ; 11,3% et 16,3% de la variabilité de ces indicateurs chez les hommes (**Tableau 8**). Cependant, les associations observées avec le rapport tour de taille/hanches, les taux de

triglycérides et d'apoA-I ne sont plus significatives après ajustement sur l'IMC et le tour de taille. En revanche, aucune association significative n'est observée chez les femmes après ajustement sur l'IMC et le tour de taille bien que le test d'interaction avec le sexe ne soit significatif qu'avec la variable activité TGP (p = 0,025 ; **Tableau 8**).

Tableau 8 : ***Corrélations significatives (p ≤ 0,05) entre le taux des ARNm de LL-37 et les paramètres cliniques et biologiques après analyse de régressions multiples et ajustement sur l'IMC et le tour de taille.***

Variable	Hommes		Femmes		$p^{\dagger}$
	p	R^2 partiel	*p*	R^2 partiel	
PAS (mm Hg)	**0,003**	0,079	**0,062**	-	NS
HDL-C (mmol/l)	**<0,001**	0,115	-	-	NS
ApoA-I (g/l)	0,093	0,029	-	-	NS
Triglycérides (mmol/l) [a]	-	-	-	-	-
Glucose (mmol/l)	**0,028**	0,042	-	-	NS
TGP (U/l) [a]	**0,013**	0,058	-	-	**0,025**
Globules blancs (10^9 cellules/l) [a]	**0,052**	0,042	-	-	NS
Neutrophiles (%)	**0,001**	0,113	-	-	NS
Lymphocytes (%)	**<0,001**	0,163	-	-	NS

Les valeurs des transcrits de LL-37 sont ajustées sur l'IMC et le tour de taille avant l'analyse statistique.
R^2 : coefficient de régression
[a] Tests statistiques sur les valeurs log_{10}-transformées.
$p^{\dagger}$: probabilité du test d'interaction avec le sexe

I.1.3.3. Taux d'expression des ARNm du gène de LL-37 chez les sujets atteints du syndrome métabolique

Etant donné que l'obésité, la pression artérielle et les perturbations de l'homéostasie lipidique, notamment un taux faible de HDL-C constituent des éléments du syndrome métabolique (SM), nous avons déterminé la prévalence de ce syndrome dans l'échantillon de travail en utilisant deux définitions différentes. Parmi les 177 sujets, 11,1% des hommes et 6,4% des femmes (selon les critères NCEP-ATP III ; NIH, 2001), et 15,6% des hommes et 4,9% des femmes (selon les critères IDF, 2005) présentent un diagnostic positif du syndrome métabolique (**Tableau 9)**.

Tableau 9 : ***Taux d'expression des ARNm de LL-37 en fonction du syndrome métabolique (SM) (Test ANOVA).***

	Hommes		Femmes	
	Sans SM	**Avec SM**	**Sans SM**	**Avec SM**
Définition ATPIII				
n	80	10	81	6
Prévalence SM (%)		11,1		6,4
Transcrits de LL-37[1]	877 (320-2400)	2641 (1017-6857)**	551 (208-1459)	1379 (489-3888)*
Définition IDF				
n	76	14	74	13
Prévalence SM (%)		15,6		14,9
Transcrits de LL-37[1]	869 (312-2415)	2029 (772-5334)**	511 (207-1261)	1299 (401-4213)**

ANOVA globale entre les deux groupes de sujets (sans SM vs. Avec SM) sur les valeurs de transcrits de LL-37 transformées en log_{10} chez les hommes et les femmes séparémment. Expression de transcrits de LL-37 présentée en moyenne géométrique (rangée de 1 écart-type). [1] *Copies de transcrits de LL-37/25ng ADNc. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$*

Le taux des ARNm de LL-37 est de 2,5 à 3 fois plus élevé dans le groupe de sujets atteints du syndrome métabolique comparé au groupe de sujets qui en sont exempts, aussi bien chez les hommes que chez les femmes (**Tableau 9**). Ces résultats préliminaires suggèrent un lien entre l'expression de LL-37 et le syndrome métabolique. Cependant, ces études méritent d'être approfondies en utilisant un échantillon plus large de patients atteints de syndrome métabolique.

I.1.3.4. Corrélation entre l'expression des ARNm et celle des peptides de LL-37

En absence d'échantillons biologiques nécessaires, nous n'avons pas pu réaliser le dosage protéique de LL-37 dans la même population que l'étude des ARNm. Afin d'évaluer la relation entre l'expression des ARNm et celle des peptides de la cathélicidine LL-37, nous avons utilisé un échantillon composé de 21 volontaires adultes supposés sains et sélectionnés au niveau de l'Etablissement Français du Sang (Vandoeuvre-Les-Nancy). L'expression du peptide LL-37 a été déterminée par ELISA dans le plasma et dans l'extrait cellulaire des

PBMCs. L'expression des ARNm de LL-37 a été déterminée dans les PBMCs par RT-PCR en temps réel. Nous avons ensuite calculé le coefficient de corrélation de *Spearman* entre les taux d'expression des peptides et les taux d'expression des ARNm de LL-37.

Ces études nous ont permis de montrer que l'expression des ARNm de LL-37 est significativement corrélée avec le taux peptidique de LL-37 dans les PBMCs (p = 0,011; **Figure 38**). L'étude d'expression de LL-37 dans les PBMCs est très peu décrite dans la littérature. Toutefois, nos résultats, bien que préliminaires, vont dans le même sens que ceux obtenus par d'autres études montrant une corrélation entre les taux des ARNm et les taux des peptides de LL-37 dans des tissus autres que les PBMCs (Dorschner *et coll.,* 2001 ; Malm *et coll.,* 2000). Cependant, le taux plasmatique de LL-37 ne semble pas être corrélé avec son taux d'ARNm dans les PBMCs (p = 0,351 ; **Figure 39**). Nous avons également noté l'absence de corrélation entre les taux peptidiques de LL-37 dans le plasma et les PBMCs (résultats non présentés, p = 0,162).

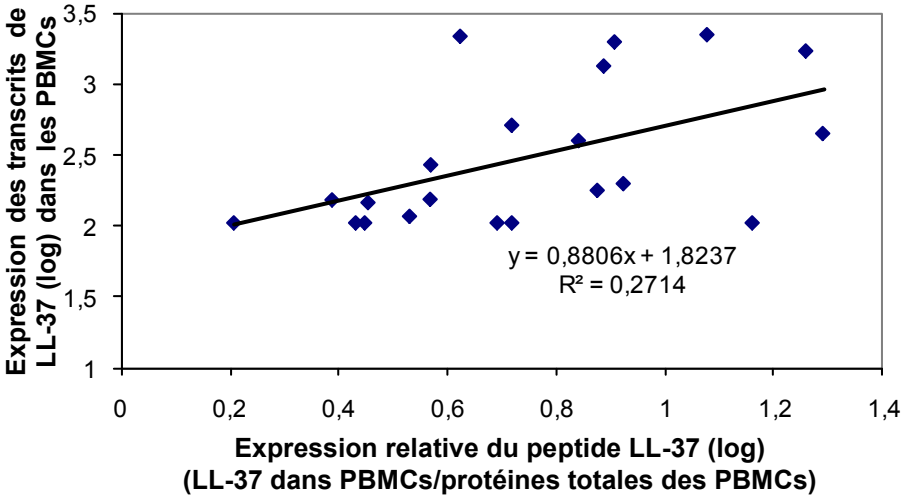


Figure 38 : ***Corrélation entre le taux des transcrits et le taux des peptides de LL-37 dans les PBMCs. Le taux peptidique de LL-37 est normalisé par rapport au taux de protéines totales dans les PBMCs. Les valeurs sont transformées en log_{10}. (p = 0,010 ; Test de Spearman).***

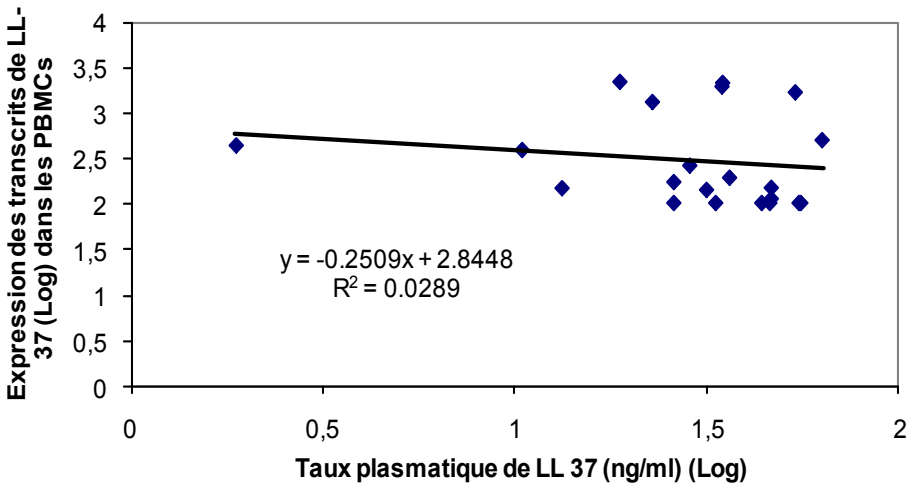


Figure 39 : ***Corrélation entre le taux plasmatique de LL-37 et son taux de transcrits dans les PBMCs. Les valeurs sont transformées en log_{10}. (p = 0,35 ; Test de Spearman).***

En résumé, cette dernière manipulation nous a permis de vérifier la relation entre la transcription et le niveau protéique de LL-37. Le taux des ARNm de LL-37 est corrélé avec le taux des peptides correspondant dans les cellules mononuclées du sang périphérique alors qu'il n'y a pas de corrélation entre les taux de LL-37 dans les cellules mononuclées et son taux plasmatique chez des individus supposés sains.

I.1.4. Discussion

Afin d'évaluer la relation entre l'expression de la cathélicidine humaine LL-37 et les facteurs de risque cardiovasculaire, nous avons étudié l'expression de LL-37 dans les PBMCs d'un groupe de sujets sélectionnés à partir de la cohorte STANISLAS. Nous avons montré que :

1) Les ARNm de LL-37 sont exprimés dans les PBMCs et que leur taux d'expression est significativement élevé chez les femmes obèses par comparaison aux femmes en surpoids ou de poids normal.
2) L'expression des ARNm de LL-37 est significativement corrélée avec l'IMC et le tour de taille chez les femmes, et avec le rapport tour de taille/hanches chez les hommes.
3) Le taux d'ARNm de LL-37 est significativement corrélé chez les hommes avec les facteurs de risque cardiovasculaire et du syndrome métabolique indépendamment

des indicateurs de l'obésité. Ces facteurs incluent la PAS, les taux circulants de HDL-C et du glucose, l'activité TGP et le taux de leucocytes.

4) L'expression des ARNm de LL-37 est significativement augmentée chez les sujets atteints du syndrome métabolique par comparaison aux sujets contrôles.

Ces résultats suggèrent que l'expression des ARNm de LL-37 dans les PBMCs est associée aux indicateurs et facteurs de risque cardiovasculaire et du syndrome métabolique.

L'expression des ARNm du gène de LL-37 est associée aux indicateurs de l'obésité

A notre connaissance, la présente étude est la première à mettre en évidence une association entre l'expression du gène de LL-37 et les indicateurs de l'obésité, à savoir l'IMC, la mesure du tour de taille et le rapport tour de taille/hanches. L'IMC est considéré comme un indice permettant d'évaluer la prévalence de l'obésité. Il a été montré que l'IMC est significativement associé au risque de maladies cardiovasculaires et de diabète de type 2 (Colditz *et coll.,* 1995). Toutefois, la distribution de la masse grasse dans l'organisme joue un rôle déterminant dans la prédisposition au risque de ces deux types de pathologies (Illouz *et coll.,* 2008). La mesure du tour de taille est dans ce contexte largement recommandée comme indicateur de l'obésité abdominale (viscérale), la manifestation la plus prépondérante dans le syndrome métabolique et le dysfonctionnement du tissu adipeux (Després et Lemieux, 2006). Bien que l'étude de la relation entre l'expression de LL-37 et l'obésité soit absente dans la littérature, nos résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par Bekri *et coll.* (2006) montrant que l'expression de l'hépcidine, un polypeptide doté lui aussi d'une activité antimicrobienne, est augmentée au niveau transcriptionnel et protéique dans le tissu adipeux des patients obèses. De plus, de nombreuses études chez l'homme et l'animal ont montré des liens potentiels entre l'obésité et certains éléments du système immunitaire inné. Shi *et coll.* (2006) ont démontré que l'expression du récepteur de l'immunité innée Toll Like-Receptor (TLR)-4 est augmentée chez les souris obèses. Des résultats similaires ont été obtenus sur l'expression du récepteur TLR-2 chez des patients obèses et des patients diabétiques (Creely *et coll.,* 2007). Shi *et coll.,* (2006) ont démontré que, contrairement à des souris sauvages, les souris déficientes en TLR-4 ($TLR4^{-/-}$) ne développent pas d'insulino-résistance induite par un régime alimentaire riche en matière grasse. De plus, une augmentation des concentrations de leucocytes, neutrophiles et lymphocytes, qui représentent des sources majeures de peptides antimicrobiens (Dixon et O'Brien, 2006), ainsi que des altérations des fonctions des cellules immunes (Fontana *et coll.,* 2007) ont été fortement associées à l'augmentation de l'IMC et

donc à l'obésité. L'ensemble de ces observations conforte nos résultats suggérant que la cathélicidine LL-37 pourrait être associée au développement de l'obésité.

La corrélation entre l'expression des ARNm de LL-37 et les indicateurs de l'obésité pourrait dépendre du sexe

Il est important de noter que l'expression des ARNm de LL-37 est fortement associée avec l'IMC et la mesure du tour de taille uniquement chez les femmes. L'effet du sexe sur cette relation pourrait être dû à la différence de la distribution de la masse grasse et l'activité du tissu adipeux entre les hommes et les femmes (Illouz *et coll.,* 2008), ou encore à des effets liés à des hormones stéroïdiennes sexuelles. D'ailleurs, Srivastava *et coll.* (2007) ont démontré que la progestérone active l'expression des peptides antimicrobiens, la cathélicidine LL-37 et les défensines-α 1, 2 et 3, dans différentes lignées de leucocytes humaines. La distribution de la masse grasse dans l'organisme étant différente entre les hommes et les femmes, et du fait que cette distribution influence significativement le risque des maladies cardiovasculaires de manière dépendante du sexe (Thomas *et coll.,* 2006), l'expression des gènes susceptibles d'être associés aux processus de développement de ces pathologies pourrait être différente en fonction du sexe (Voisey *et coll.,* 2002 ; Linder *et coll.,* 2004). Il a été montré que la leptine (Hellstrom *et coll.,* 2000), une cytokine sécrétée par les cellules adipeuses et qui joue le rôle d'hormone de régulation des dépenses énergétiques, présente un profil d'expression variable en fonction du sexe. De la même manière, il a été rapporté que des cytokines comme le TNF-α et la protéine fixant les LPS, (*LBP, lipopolysaccharide-binding protein*) sont exprimée de manière différente entre les hommes et les femmes (Van Eijk *et coll.,* 2007).

Quels sont les facteurs susceptibles de stimuler l'expression de LL-37 chez les patients en surpoids ?

La cathélicidine LL-37 étant un élément clé de la défense immunitaire innée, son expression serait sensible à une multitude de stimuli endogènes et exogènes. Une infection dite « silencieuse » pourrait contribuer à l'induction de l'expression de LL-37 dans les PBMCs des femmes obèses. Cette hypothèse peut être confortée par les études montrant une augmentation de la prévalence et la sévérité des infections chez les patients obèses (Stallone, 1994 ; Arslan *et coll.,* 2009), mais il serait intéressant d'étudier la relation entre l'infection et l'obésité ainsi que l'éventuel effet du sexe sur cette relation. De plus, l'impact de l'adiposité et de sa distribution dans l'organisme sur l'expression de LL-37 reste à déterminer. Il est

admis que l'obésité est fortement associée à une inflammation chronique de bas niveau induite, du moins en partie, par les cellules immunitaires infiltrant le tissu adipeux. Ce milieu inflammatoire pourrait réguler l'expression de LL-37 dans le contexte de l'obésité.

L'expression du gène de LL-37 peut être liée à l'homéostasie des lipides dans la circulation

L'obésité est un facteur de risque majeur des maladies cardiovasculaires et est aussi potentiellement liée à des anomalies de l'homéostasie des lipides et des lipoprotéines plasmatiques (Després, 1994). Il a été clairement démontré qu'un excès de masse grasse, notamment au niveau viscéral caractérisant l'obésité abdominale, est associé avec des taux élevés de triglycérides et des taux faibles de HDL-C dans le plasma (Desprès *et coll.,* 1989 ; Eckel *et coll.,* 2005). Dans la présente étude nous montrons qu'en plus de sa corrélation avec les indicateurs de l'obésité, le taux des ARNm de LL-37 est corrélé négativement avec le taux de HDL-C et positivement avec le taux de triglycérides circulants. Toutefois, ces associations semblent être dépendantes des indicateurs de l'obésité (IMC et tour de taille) tel qu'il est montré par l'analyse de régressions multibles. En effet, l'association entre l'expression des ARNm de LL-37 et le taux de triglycérides circulants n'est plus significative après ajustement sur l'IMC et le tour de taille aussi bien chez les hommes que chez les femmes. De la même manière, l'expression des ARNm de LL-37 n'est plus corrélée avec le taux de HDL-C chez les femmes après ajustement sur l'IMC et le tour de taille. Ces observations suggèrent que l'expression de LL-37 est liée aux anomalies de l'homéostasie des lipoprotéines et lipides circulants associées à l'obésité. Bien que notre étude soit la première à mettre en évidence un lien entre l'expression du gène de LL-37 et les lipides circulants, nos résultats sont en accord avec les études de Higazi *et coll.* (2000) montrant que les peptides antimicrobiens défensines-α contribuent au métabolisme des lipoprotéines. Ces auteurs ont montré que les défensines-α favorisent la fixation des particules LDL et lipoprotéines (a) sur les cellules endothéliales vasculaires *in vitro* et stimulent les modifications de ces particules (Higazi *et coll,* 1997 et 2000). Bien qu'il ait été montré que le peptide LL-37 peut se fixer sur les particules apoA-I et HDL-C dans la circulation (Wang *et coll.,* 1998 ; Lau *et coll.,* 2006), le rôle de la cathélicidine LL-37 dans le métabolisme lipidique reste à déterminer.

L'expression des ARNm de LL-37 est associée à la pression artérielle

L'hypertension artérielle est un autre facteur de risque majeur des maladies cardiovasculaires dont le mécanisme étiologique est très complexe et mal connu. Il a été

rapporté aussi bien chez l'homme que chez l'animal hypertendu que des dysfonctionnements chroniques des systèmes immunitaire et vasculaire sont fortement associées (Bernard C *et coll.,* 1998). Des altérations du système immunitaire, associées aux lymphocytes T, ont été rapportées chez un modèle de rats hypertendus (Dzielak, 1992 ; Khraibi, 1991). Dans notre étude, nous avons montré que l'expression des ARNm de LL-37 dans les PBMCs est significativement et positivement associée avec la PAS chez les hommes ($p \leq 0,001$) et chez les femmes ($p \leq 0,05$). Bien que l'obésité soit fortement associée à l'hypertension artérielle (Hall, 2003 ; Sironi *et coll.,* 2004), il est intéressant de noter que le taux d'expression des ARNm de LL-37 dans les PBMCs reste significativement associé à la PAS, notamment chez les hommes, indépendamment des indicateurs de l'obésité (l'IMC et le tour de taille) tel qu'il a été montré par l'analyse de régressions multiples. A notre connaissance, cette étude est la première à mettre en évidence une relation entre l'expression du gène de LL-37 dans les cellules circulantes et la pression artérielle chez l'Homme.

Des études *in vitro* ont suggéré un lien entre le peptide LL-37 et la fonction vasomotrice. Berkestedt *et coll.* (2008) ont montré que le peptide LL-37 induit la relaxation endothélium-dépendante des segments de veines humaines *ex vivo*, un effet médié par le récepteur FPRL1 endothélial. Ciornei *et coll.* (2003) ont montré que le peptide LL-37 inhibe la production de l'oxyde nitrique (NO) induite par les LPS ou par l'interleukine-1β dans des segments d'aorte de rat *ex vivo*. Dans cette étude, les auteurs ont démontré que LL-37 inhibe la vasodilatation induite par les LPS dans les segments d'aorte de rat. Bien que ces résultats concernant l'effet de LL-37 sur la réponse vasomotrice semblent être contradictoires, ce qui dépend probablement des espèces et/ou du système vasculaire considéré (Berkestedt *et coll.,* 2008), l'ensemble de ces observations avec les nôtres suggèrent que la cathélicidine LL-37 peut avoir un effet sur la fonction vasomotrice.

L'expression de la cathélicidine LL-37 dans les PBMCs pourrait être un indicateur du syndrome métabolique

Le syndrome métabolique constitue une constellation de facteurs de risque cardiovasculaire. Nous montrons dans cette étude que l'expression des ARNm de LL-37 dans les PBMCs est significativement augmentée chez les individus présentant un diagnostic positif du syndrome métabolique comparé à ceux qui en sont exempts. Ces résultats suggèrent que les individus présentant un taux élevé des ARNm de LL-37 pourraient être exposés à un risque élevé de développement du syndrome métabolique et ses complications

cardiovasculaires. D'ailleurs, outre la PAS, les indicateurs de l'obésité et de dyslipidémies, nous avons montré dans cette étude que l'expression du gène de LL-37 est également associée à la glycémie et l'activité de l'aminotransférase TGP, deux autres facteurs de risque du syndrome métabolique. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Gubern *et coll.* (2006) montrant que la BPI (*bactericidal/permeability-increasing protein*), protéine dotée d'une activité antimicrobienne comme LL-37, est fortement associée avec les indicateurs du syndrome métabolique et de l'obésité abdominale. Ces observations suggèrent que la cathélicidine LL-37 pourrait être associée au risque de développement du syndrome métabolique et ses complications cardiovasculaires. Cependant, la relation de cause à effet entre l'expression de LL-37 et le syndrome métabolique reste à déterminer.

L'expression transcriptionnelle de LL-37 est corrélée avec son expression protéique dans les PBMCs

Il est admis que le niveau d'expression protéique d'un gène est biologiquement plus significatif que son niveau d'expression transcriptionnelle. Cela peut s'expliquer par des modifications post-transcriptionnelles qui peuvent affecter la qualité et le taux des ARNm disponibles pour être traduits en protéines fonctionnelles. Nous avons montré que le peptide LL-37 est exprimé dans les PBMCs et que cette expression est corrélée significativement et positivement avec son niveau d'expression transcriptionnelle dans ces mêmes cellules. D'autres études avaient déjà montré la présence de corrélation entre l'expression des ARNm et des peptides de LL-37 dans d'autres tissus (Dorschner *et coll.,* 2001 ; Malm *et coll.,* 2000). Ces résultats suggèrent que comme les ARNm, le taux peptidique de LL-37 dans les PBMCs pourrait être corrélé avec les indicateurs de risque cardiovasculaire et du syndrome métabolique tels que l'IMC, la PAS, les taux circulants de HDL-C et du glucose. Toutefois, ces relations restent à vérifier en réalisant des études de corrélation entre l'expression protéique de LL-37 dans les PBMCs et les indicateurs de risque cardiovasculaire et du syndrome métabolique. En revanche, aucune corrélation n'est observée entre le taux circulant du peptide LL-37 et son expression dans les PBMCs (ARNm et protéines). Ces résultats suggèrent que les cellules mononuclées du sang périphériques ne représentent pas la seule source du peptide LL-37 sécrété dans la circulation. De plus, nous ignorons encore si le peptide LL-37, produit par les PBMCs des individus en conditions physiologiques (de non stress) est sécrété dans la circulation.

I.2. Analyse quantitative de l'expression des défensines-α DEFA1-3 par RT-PCR en temps réel (*Publication 3, soumise*).

Nous nous sommes également intéressés à l'analyse des éventuelles associations entre l'expression des défensines DEFA1-3 et les indicateurs de risque cardiovasculaire et du syndrome métabolique. Comme pour LL-37, nous avons quantifié l'expression des ARNm des DEFA1-3 par RT-PCR en temps réel dans le même échantillon de 178 sujets décrit précédemment (*section I.1 de résultats et discussions*).

I.2.1. Expression des ARNm des gènes *DEFA1-3*

Les ARNm correspondant aux gènes *DEFA1-3* sont largement exprimés chez tous les sujets étudiés (n = 178). L'expression des ARNm des DEFA1-3 (moyenne ± écart type) est de 17877 ± 27882 copies de transcrits/25ng d'ADNc. La distribution de ce paramètre n'étant pas normale, nous avons transformé en $\log_{10}$ les valeurs correspondantes.

Nous avons observé que le taux d'expression des ARNm des DEFA1-3 dans les PBMCs est d'environ 2 fois plus élevé chez les hommes que chez les femmes [12589 (3981-39811) vs. 5754 (1905-17378) copies de transcrits, respectivement] ($p \leq 0,0001$; **Figure 40**). Cela suggère que l'expression des DEFA1-3 dans les PBMCs pourrait dépendre du sexe.

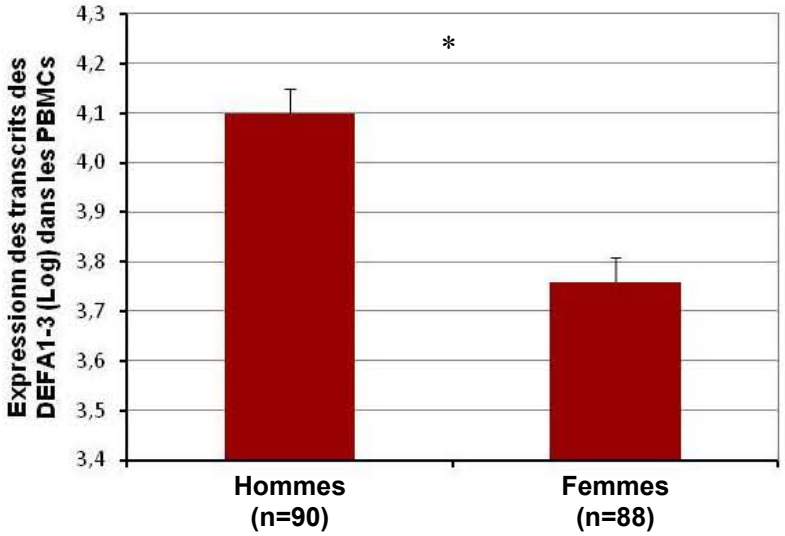


Figure 40 : ***Expression des transcrits des DEFA1-3 dans les PBMCs en fonction du sexe. Les valeurs sont transformées en $\log_{10}$, puis présentées sous forme de moyenne ± erreur standard (* $p \leq 0,0001$; test ANOVA).***

I.2.2. Corrélations entre l'expression des ARNm des DEFA1-3 et les facteurs de risque cardiovasculaire et du syndrome métabolique

I.2.2.1. Corrélations simples

Afin d'évaluer l'existence de relations significatives entre l'expression des ARNm des DEFA1-3 dans les PBMCs et les indicateurs de risque de maladies cardiovasculaires et du syndrome métabolique, nous avons calculé le coefficient de corrélation de Pearson dans l'échantillon total après ajustement des valeurs sur le sexe et l'âge (**Tableau 10**).

Tableau 10 : ***Corrélations entre le taux des ARNm des DEFA1-3 et les paramètres cliniques et biologiques des 178 sujets de la cohorte STANISLAS, après ajustement sur l'âge et le sexe (p ≤ 0,05, Test de Pearson).***

Variables	*r*	*p*
n=178		
IMC (Kg/m^2)	0,271	0,0003
Tour de taille (cm)	0,253	0,0007
Rapport tour taille/hanche	0,186	0,013
PAS (mmHg)	0,344	<0,0001
PAD (mmHg)	0,171	0,023
Cholestérol total (mmol/l)	-0,081	NS
HDL-C (mmol/l)	-0,273	0,0003
LDL-C (mmol/l)	-0,022	NS
ApoA-I (g/l)	-0,151	0,045
ApoB (g/l)	0,068	NS
Triglycérides (mmol/l) [a]	0,258	0,0005
Glucose (mmol/l)	0,195	0,009
CRP (mg/l) [a]	0,208	0,006
TGO (U/l) [a]	0,018	NS
TGP (U/l) [a]	0,110	NS
Globules blancs (10^9 cellules/l) [a]	0,281	0,0002
Lymphocytes (%)	-0,310	<0,0001
Neutrophiles (%)	0,302	<0,0001
Ratio lymphocyte/neutrophile	-0,323	<0,0001
LL-37 (copies de transcrits) [a]	0,786	<0,0001

r : coefficient de corrélation de Pearson
[a] *Valeurs log10-transformées avant analyse statistique*
Les valeurs sont ajustées sur l'âge et le sexe avant analyse statistique

Nous montrons que le taux des ARNm des DEFA1-3 est significativement corrélé avec les indicateurs de l'obésité : l'IMC ($r = 0,271$; $p = 0,0003$), le tour de taille ($r = 0,253$; $p = 0,0007$) et le rapport tour de taille /hanches ($r = 0,186$; $p = 0,013$). De même, l'expression des ARNm des DEFA1-3 est significativement et positivement corrélée avec la PAS ($p < 0,0001$), la PAD ($p = 0,013$), le taux des triglycérides ($p = 0,0005$), la glycémie ($p = 0,009$), le taux circulant de la CRP ($p = 0,006$), les globules blancs ($p = 0,0002$), les neutrophiles ($p < 0,0001$), et avec l'expression des ARNm de LL-37 ($p < 0,0001$). De plus, le taux des ARNm des DEFA1-3 est inversement corrélé avec les taux de HDL-C et d'apoA-I (respectivement, $p = 0,0003$ et $p = 0,045$) et avec le taux des lymphocytes ($p < 0,0001$).

Nous avons montré que l'expression des ARNm des DEFA1-3 dans les PBMCs varie significativement selon le sexe (**Figure 40**). Cependant, le test d'interaction avec le sexe n'est significatif pour aucune des corrélations testées, suggérant que les corrélations observées avec le taux des ARNm des DEFA1-3 ne varient pas selon le sexe. Pour cela, nous n'avons pas séparé les hommes et les femmes dans la suite de nos analyses.

I.2.2.2. Corrélations partielles

Afin d'examiner les corrélations observées avec l'expression des DEFA1-3 indépendamment des indicateurs de l'obésité, nous avons réalisé des corrélations partielles de Pearson.

Après ajustement sur l'IMC et le tour de taille (en plus de l'âge et le sexe), l'expression des ARNm des DEFA1-3 reste significativement associée avec la PAS ($r = 0,289$; $p = 0,0001$), les HDL-C ($r = -0,196$; $p = 0,009$) et les triglycérides ($r = 0,159$; $p = 0,037$). De plus, les globules blancs, les lymphocytes, les neutrophiles et l'expression de LL-37 restent également significativement associés à l'expression des ARNm des DEFA1-3 ($p = 0,012$ à $p < 0,0001$) ; tandis que les associations observées avec la PAD, l'apoA-I, la glycémie et la protéine CRP dans l'analyse de corrélations simples, disparaissent après ajustement sur l'IMC et le tour de taille (**Tableau 11**).

Tableau 11 : ***Corrélations partielles significatives (p ≤ 0,05) entre le taux des ARNm des DEFA1-3 et les paramètres cliniques et biologiques après ajustement sur l'âge, le sexe, l'IMC et le tour de taille.***

Variables	*r* partiel	*p*
n=178		
PAS (mmHg)	0,289	**0,0001**
PAD (mmHg)	-	-
HDL-C (mmol/l)	-0,196	**0,009**
ApoA-I (g/l)	-	-
Triglycérides (mmol/l) [a]	0,159	**0,036**
Glucose (mmol/l)	0,127	0,095
CRP (mg/l) [a]	-	-
Globules blancs (10^9 cellules/l) [a]	0,249	**0,0009**
Lymphocytes (%)	-0,317	**<0,0001**
Neutrophiles (%)	0,305	**<0,0001**
Ratio lymphocyte/neutrophile	-0,323	**<0,0001**
LL-37 (copies de transcrits) [a, b]	0,768	**<0,0001**

Les valeurs des transcrits des DEFA1-3 sont ajustées sur l'âge, le sexe, l'IMC et le tour de taille avant analyse statistique.
r : coefficient de corrélation partielle de Pearson
[a] *Tests statistiques sur les valeurs log_{10}-transformées.*
[b] *Nombre de copies de transcrits de LL-37/25 ng ADNc.*

I.2.2.3. Expression des ARNm des DEFA1-3 chez les sujets atteints du syndrome métabolique

Il est admis que l'association de plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire chez un même individu constitue un diagnostic positif du syndrome métabolique (selon les définitions conventionnelles du syndrome métabolique). En utilisant la définition IDF du syndrome métabolique, nous avons trouvé que parmi les 178 sujets étudiés, 28 d'entre eux présentent un diagnostic positif du syndrome métabolique. Nous avons donc analysé l'expression différentielle des ARNm des DEFA1-3 en fonction du statut du syndrome métabolique chez les sujets étudiés (**Figure 41**).

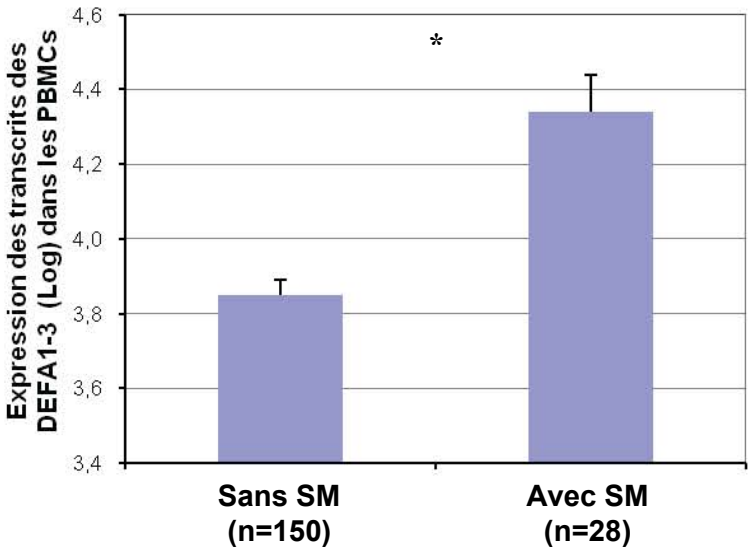


Figure 41 : ***Expression différentielle des ARNm des DEFA1-3 chez les sujets avec (n=28) et sans SM (n=150). Moyenne de nombre de copies des ARNm (log_{10}) ± erreur standard. (Test ANOVA après ajustement sur le sexe, * p<0,0001 ;). SM : syndrome métabolique.***

L'expression des ARNm des DEFA1-3 est 3 fois plus élevée dans le groupe des sujets avec syndrome métabolique (n = 28) comparé au groupe de sujets qui en sont exempts (p < 0,0001 ; test ANOVA, **Figure 41).**

I.2.3. Discussion

Des études récentes ont suggéré l'existence d'une association entre les défensines-α et le risque de maladies cardiovasculaires. Afin d'évaluer la significativité de cette association, nous avons analysé les relations entre le profil d'expression des ARNm des DEFA1-3 et les facteurs du syndrome métabolique et de risque cardiovasculaire dans un échantillon de la cohorte STANISLAS. Nous avons montré que le taux d'expression des ARNm des DEFA1-3 dans les PBMCs est significativement corrélé avec les indicateurs de risque cardiovasculaire et du syndrome métabolique. Ces indicateurs incluent ceux de l'obésité, la pression artérielle, des paramètres lipidiques et inflammatoires, ainsi que la glycémie. L'expression des DEFA1-3 reste significativement associée avec la PAS, les taux circulants de HDL-C et de triglycérides, le nombre de leucocytes et l'expression des ARNm de LL-37 de manière indépendante des indicateurs de l'obésité. De plus, l'expression des DEFA1-3 est significativement augmentée chez les sujets présentant un diagnostic positif de syndrome métabolique.

L'expression des gènes DEFA1-3 est associée aux indicateurs de l'obésité

Nos études montrent que l'expression des ARNm des DEFA1-3 dans les PBMCs est significativement et positivement associée aux indicateurs de l'obésité à savoir l'IMC, le tour de taille et le rapport tour de taille/hanches. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par des études récentes suggérant l'existence de liens entre les DEFA1-3 et le surpoids. Manco *et coll.* (2007) ont montré qu'une perte substantielle de poids excédentaire chez des femmes fortement obèses est associée à une diminution significative du taux circulant des DEFA1-3. Saraheimo *et coll.* (2008) ont conforté ces résultats en montrant que le taux circulant des DEFA1-3 est positivement associé au rapport tour de taille/hanches chez des sujets diabétiques. Cependant, des résultats contradictoires ont été rapportés par Lopez-Bermejo *et coll.* (2007) qui ont montré que le taux circulant des DEFA1-3 est inversement corrélé avec les indicateurs de l'obésité et le taux de cholestérol total chez des hommes supposés sains. Les résultats contradictoires de cette dernière étude pourraient être expliqués par des différences dans les méthodologies utilisées et les conditions expérimentales.

En plus de l'association que nous avons montré dans les présentes études entre l'expression de la cathélicidine LL-37 dans les PBMCs et les indicateurs de l'obésité, de nombreuses études épidémiologiques et expérimentales ont mis en évidence des liens potentiels entre des éléments du système immunitaire inné et l'obésité (Bekri *et coll.,* 2006 ; Shi *et coll.,* 2006 ; Creely *et coll.,* 2007 ; Dixon et O'Brien, 2006 ; Fontana *et coll.,* 2007 ; Gubern *et coll.,* 2006), confortant ainsi nos résultats. Ces résultats suggèrent que les peptides antimicrobiens DEFA1-3 et la cathélicidine LL-37 pourraient être associés aux processus impliqués dans le développement de l'obésité, notamment l'obésité abdominale et ses complications.

Par quel mécanisme les DEFA1-3 pourraient être impliquées dans le processus de développement de l'obésité ?

Il a été rapporté que les lymphocytes T pro-inflammatoires sont détectés dans le tissu adipeux viscéral et pourraient contribuer à l'activation locale des cellules inflammatoires, suggérant un rôle de ces cellules dans l'initiation et la perpétuation de l'inflammation du tissu adipeux (Kintscher *et coll.,* 2008). Les défensines-α étant impliquées dans le processus inflammatoire de nombreuses pathologies, des signaux inflammatoires comme les cytokines et les adipokines dérivés du tissu adipeux pourraient affecter le niveau d'expression des DEFA1-3 dans les cellules circulantes et les cellules susceptibles d'interagir, voire d'infiltrer

les tissus adipeux. En plus de son caractère inflammatoire chronique, il est aussi important de noter que l'obésité est caractérisée par des anomalies du métabolisme énergétique. Dans ce contexte, nous avons observé une association significative et positive entre le taux d'expression des ARNm des DEFA1-3 et le taux de glucose circulant. Néanmoins, cette association semble être dépendante des indicateurs de l'obésité tel qu'il est montré par l'analyse de régressions multiples après ajustement sur l'IMC et le tour de taille. L'expression des gènes *DEFA1-3* pourrait donc être associée à l'obésité *via* des mécanismes impliquant des signaux inflammatoires et métaboliques comme des mécanismes du métabolisme de glucose. Des études mécanistiques seront nécessaires afin de comprendre le lien entre les DEFA1-3 et l'adiposité.

Les DEFA1-3 pourraient être associées à l'homéostasie des lipides circulants et à la fonction vasomotrice : rôle dans le métabolisme lipidique et l'athérosclérose

Dans la présente étude nous avons également observé que l'expression des ARNm des DEFA1-3 est associée significativement et positivement au taux de triglycérides et négativement à celui des HDL-C dans la circulation. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus précédemment concernant LL-37 dans la présente étude. Ils sont également en accord avec les résultats obtenus par Manco *et coll.* (2007), montrant qu'en plus de sa diminution après une perte de poids chez des sujets obèses, le taux circulant de défensines-α 1-3 est corrélé avec le taux de triglycérides circulants chez ces mêmes sujets. De plus, une étude récente réalisée sur une population de sujets diabétiques a montré que le taux sérique de défensines-α 1-3 est associé positivement aux concentrations de cholestérol total et de triglycérides et négativement au taux de HDL-C (Saraheimo *et coll.,* 2008). Bien que l'obésité soit fortement associée à des anomalies du métabolisme lipidique, notamment l'hyper-triglycéridémie et l'hypo-HDL-C, il est important de noter que les associations observées dans la présente étude entre l'expression des DEFA1-3 et les paramètres lipidiques sont indépendantes des indicateurs de l'obésité que sont l'IMC et le tour de taille. Les données de la littérature et nos résultats suggèrent donc l'existence de relations entre la régulation des gènes *DEFA1-3* dans les cellules circulantes et le métabolisme lipidique. Dans ce contexte, il a été montré que les défensines-α 1-3 stimulent la fixation, l'internalisation et la modification des particules de LDL (Higazi *et coll.,* 2000) et de lipoprotéines (a) (Higazi *et coll,* 1997) sur les cellules vasculaires et la matrice extracellulaire *in vitro* (Bdeir *et coll.,* 1999), des processus qui pourraient favoriser le développement de l'athérosclérose. D'autres éléments

corroborant les relations entre les défensines-α et le développement de l'athérosclérose sont les résultats de deux études montrant que les défensines-α 1-3 sont abondamment présentes dans l'endothélium et l'intima des artères carotidiennes et coronaires athérosclérotiques humaines (Higazi *et coll.,* 1997 ; Bernathan *et coll.,* 1997). De plus, le dysfonctionnement endothélial étant l'évènement majeur dans le processus d'initiation de l'athérosclérose, des études expérimentales ont démontré que les défensines-α 1-3 régulent la contraction des cellules vasculaires (Nassar *et coll.,* 2002 et 2007 ; Lopez-Bermejo *et coll.,* 2007) et induisent le dysfonctionnement endothélial des artères coronaires chez le porc (Kougias *et coll.,* 2006). Ces données expérimentales, suggérant l'implication des défensines-α dans le dysfonctionnement vasculaire et le risque d'athérosclérose, sont maintenant confortées par notre présente étude épidémiologique montrant que l'expression des DEFA1-3 dans les PBMCs est significativement corrélée avec la PAS. Nos résultats sont aussi en accord avec ceux publiés récemment par Saraheimo *et coll.* (2008) qui ont montré que le taux circulant des défensines-α 1-3 est associé à la PAS dans une population de sujets diabétiques. Sur la base des résultats de notre présente étude et les données de la littérature, l'expression des gènes *DEFA1-3* pourrait être impliquée dans les processus contribuant au dysfonctionnement vasculaire et au développement de l'athérosclérose.

Le profil d'expression des gènes DEFA1-3 pourrait servir de biomarqueur de risque cardiovasculaire

Les leucocytes sont connus pour leur rôle majeur dans le dysfonctionnement endothélial et le processus inflammatoire d'athérosclérose (Hoffman *et coll.,* 2004). Dans la présente étude nous avons mis en évidence des corrélations significatives entre l'expression des *DEFA1-3* et le taux de leucocytes. Le taux des ARNm des DEFA1-3 dans les PBMCs est corrélé avec le taux de globules blancs, mais aussi positivement avec celui des neutrophiles et négativement avec celui des lymphocytes et avec le ratio lymphocytes/neutrophiles. Bien que le taux de globules blancs circulants ait été proposé comme biomarqueur pour la prédiction du risque cardiovasculaire (Pearson *et coll.,* 2003) et du statut inflammatoire (Hoffman *et coll.,* 2004), il a été récemment rapporté que le taux des neutrophiles et notamment le ratio neutrophiles/lymphocytes constitue un biomarqueur indépendant pour l'augmentation du risque cardiovasculaire (Horne *et coll.,* 2005 ; Angela Papa *et coll.,* 2008 ; Tamhane *et coll.,* 2008). Sur la base de ces observations, nos résultats montrant de fortes associations entre l'expression des DEFA1-3 et différentes populations de leucocytes suggèrent que le profil

d'expression des DEFA1-3 pourrait avoir une valeur prédictive du risque cardiovasculaire. Dans ce contexte, il existe trois études dans la littérature qui soutiennent cette hypothèse et suggèrent que les défensines-α 1-3 pourraient servir de marqueurs cliniques pour le risque cardiovasculaire. Joseph *et coll.* (2008) ont montré que le taux plasmatique des défensines-α 1-3 est significativement associé à la morbidité et la mortalité cardiovasculaire chez des patients souffrant de diabète de type 1. Le taux circulant des défensines-α 1-3 a été également associé à la néphropathie diabétique chez des patients atteints de diabète de type 1 (Saraheimo *et coll.,* 2008). Outre l'information clinique qui peut être véhiculée par leur taux circulant, les défensines-α 1-3 semblent s'accumuler dans des tissus périphériques où leur taux est corrélé avec le risque cardiovasculaire. Nassar *et coll.* (2007) ont montré que les défensines-α 1-3 s'accumulent au niveau des tissus cutanés et que leur taux dans ces tissus est significativement corrélé avec la sévérité de l'atteinte de l'artère coronaire. Les défensines-α 1-3 ont été également détectées en quantité abondante dans les parois vasculaires athérosclérotiques (Higazi *et coll.,* 1997 ; Bernathan *et coll.,* 1997). Notre présente étude semble corroborer ces découvertes en montrant que l'expression des DEFA1-3 dans les PBMCs est significativement augmentée chez les sujets atteints de syndrome métabolique (syndrome métabolique défini selon les critères IDF) comparé aux sujets contrôles. Bien qu'à notre connaissance, le lien entre les défensines-α et le syndrome métabolique n'ait pas été étudié dans la littérature, Gubern *et coll.* (2006) ont montré que la BPI (*bactericidal/permeability-increasing protein*), une protéine antimicrobienne, est fortement associée aux indicateurs du syndrome métabolique et de l'obésité abdominale. De plus, de nombreuses études ont suggéré que des altérations dans les fonctions du système immunitaire inné sont intrinsèques au syndrome métabolique (Ridker *et coll.,* 2003 ; Festa *et coll.,* 2000 ; Engstrom *et coll.,* 2003 ; Schmidt *et coll.,* 1999 ; Fernandez-Real et Ricart, 2003).

L'ensemble de nos résultats avec ceux décrits dans la littérature suggère que les défensines-α 1-3 pourraient constituer un lien entre le processus immuno-inflammatoire et les altérations métaboliques conduisant au dysfonctionnement cardiovasculaire athérosclérotique. Néanmoins, il reste à déterminer s'il peut s'agir de facteur de risque et/ou de biomarqueur de risque cardiovasculaire.

II. Lien entre le gène du récepteur FPR (*FPR1*) et l'expression de LL-37, des DEFA1-3 et les marqueurs d'inflammation

II.1. Lien entre l'expression des ARNm de LL-37 et DEFA1-3 et celle des ARNm de *FPR1* dans les PBMCs

Le récepteur FPR, codé par le gène *FPR1* et appartenant à la famille des récepteurs FPRs, est un récepteur transmembranaire des chimio-attractants exprimé principalement par les cellules immuno-inflammatoires. En réponse à de nombreux agonistes, FPR joue un rôle clé dans les réponses immunitaires et inflammatoires par la médiation de nombreuses fonctions cellulaires. Le peptide LL-37 semble activer un récepteur de la famille FPRs pour exercer son activité chimiotactique et réguler la prolifération cellulaire.

Dans le but de comprendre le mécanisme par lequel les peptides LL-37 et défensines-α 1-3 seraient impliqués dans les altérations métaboliques et immuno-inflammatoires associées au risque cardiovasculaire, nous avons évalué la relation qui pourrait exister entre l'expression de *FPR1* et celle des gènes de LL-37 et des DEFA1-3 dans les PBMCs. Nous avons également analysé l'expression de *FPR1* en fonction des indicateurs de risque cardiovasculaire. L'expression des ARNm de *FPR1* a été déterminée par RT-PCR en temps réel dans les PBMCs des mêmes sujets impliqués dans l'étude de LL-37 et DEFA1-3 (***voir section I.1.1 de résultats et discussion***).

II.1.1. Expression des ARNm de *FPR1* dans les PBMCs

Les ARNm de FPR sont fortement exprimés dans les PBMCs de tous les sujets étudiés (moyenne Log (copies de transcrits de *FPR1*) = 4,46 ± 0,30). Contrairement à ce que nous avions observé pour LL-37 et DEFA1-3, le taux des ARNm de *FPR1* ne semble pas être significativement différent entre les hommes et les femmes [31623 (15488-64565) vs. 26303 (13490-51286) copies de transcrits respectivement, $p > 0,05$]. N'ayant pas une distribution normale, les valeurs d'expression de *FPR1* sont donc $\log_{10}$-transformées.

II.1.2. Corrélations de l'expression des ARNm de *FPR1*

Afin d'évaluer l'existence de relations entre l'expression des ARNm de FPR et celle des ARNm de LL-37 et DEFA1-3 dans les PBMCs d'une part, et les liens éventuels entre l'expression de FPR avec les indicateurs de risque cardiovasculaire d'autre part, nous avons calculé les coefficients de corrélation de Pearson dans l'échantillon étudié. Sont présentés dans le **Tableau 12** les paramètres significativement corrélés avec l'expression de FPR.

Tableau 12 : ***Corrélations entre le taux des ARNm de FPR et les paramètres cliniques et biologiques et les ARNm de LL-37 chez les hommes et les femmes (p ≤ 0,05, Test de Pearson).***

Variable	Hommes (n=90)	Femmes (n=87)	$p^{\dagger}$
	r	*r*	
TGO (U/l) [a]	0,292*	0,256*	NS
Monocytes (%)	0,354***	0,256*	NS
LL-37 (copies de transcrits) [a]	0,329**	0,330**	NS

r *: coefficient de corrélation de Pearson.* $\boldsymbol{P^{\dagger}}$ *: probabilité du test d'interaction avec le sexe. NS : non significatif.* [a] *Valeurs* log_{10}*-transformées avant analyse statistique.*
** p ≤ 0,05 ; ** p ≤ 0,01 ; *** p ≤ 0,001.*

Le taux des ARNm de FPR est corrélé positivement avec l'activité de l'enzyme hépatique TGO (p ≤ 0,05) chez les hommes et les femmes, et avec le taux de monocytes (p ≤ 0,001 et p ≤ 0,05 respectivement chez les hommes et les femmes).

Comme nous l'avons souligné dans l'introduction, des études *in vitro* ont montré que l'activité chimiotactique du peptide LL-37 pour les cellules immunitaires est médiée par des récepteurs de la famille FPRs (Yang *et coll.,* 2000). Nous montrons dans la présente étude une corrélation significative et positive entre l'expression des ARNm de FPR et celle des ARNm de LL-37 dans les PBMCs (r = 0,33 ; p ≤ 0,01) chez les hommes et les femmes (**Tableau 12, Figure 42**).

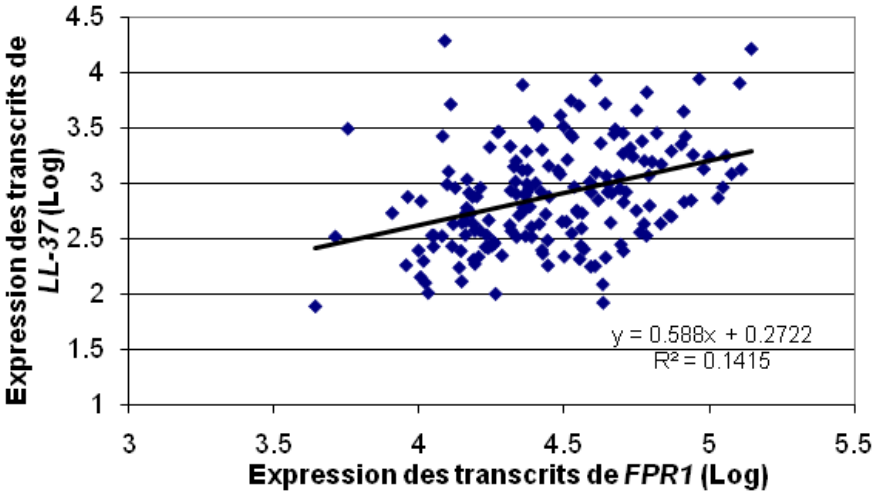


Figure 42 : ***Corrélation entre l'expression des transcrits de LL-37 et celle des transcrits du gène de FPR (FPR1) dans les PBMCs. Valeurs d'expression (copies de transcrits) log_{10}-transformées. (r = 0,33 ; p ≤ 0,01 ; Test de Pearson).***

Nous avons également observé une corrélation significative entre l'expression des ARNm de FPR et des DEFA1-3 dans l'échantillon total sans distinction du sexe (r = 0,190 ; p = 0,012 ; résultats non présentés).

Contrairement à ce que nous avions observé avec l'expression des ARNm de LL-37 et DEFA1-3, il n'y a aucune corrélation significative entre l'expression des ARNm de FPR dans les PBMCs et les facteurs du syndrome métabolique. A noter également qu'aucune différence significative n'est observée entre les hommes et les femmes concernant les corrélations avec l'expression de FPR (Test d'interaction avec le sexe, $p^{\dagger} > 0,05$).

II.1.3. Discussion

Les FPRs constituent une famille de récepteurs de chimio-attractants, caractérisés par une structure à sept domaines transmembranaires et couplés aux protéines G. Les récepteurs FPRs, principalement exprimés par les leucocytes, jouent un rôle clé dans les réponses immunitaires et inflammatoires par la médiation des fonctions cellulaires. Des études *in vitro* ont montré que l'interaction FPRs-ligands induit des cascades de signalisation qui activent de nombreuses fonctions cellulaires et processus biologiques notamment le chimiotactisme, un événement qui caractérise l'étape précoce de la réponse immuno-inflammatoire, l'activation de la NADPH oxydase responsable de la génération des ions superoxyde et la dégranulation

des cellules immunitaires libérant des substances capables de moduler les réponses immunitaires et inflammatoires (Le Y *et coll.,* 2002 ; De Yang *et coll.,* 2000).

Parallèlement au nombre croissant de ligands des récepteurs FPRs, la distribution tissulaire et cellulaire de ces récepteurs s'est élargie. De nombreuses études ont rapporté l'expression de ces récepteurs dans d'autres tissus et cellules non hématopoïétiques, suggérant que ces récepteurs peuvent avoir des rôles fonctionnels autres que la défense de l'organisme (Rescher *et coll.,* 2002 ; Becker *et coll.,* 1998). Il a été montré que le récepteur FPR est exprimé dans les cellules hépatiques (McCoy *et coll.,* 1995 ; Becker *et coll.,* 1998) et dans les cellules de l'épithélium pulmonaire (Rescher *et coll.,* 2002), et il participe à la régulation des gènes des protéines de la phase aigue dans ces cellules. Dans ce contexte, notre présente étude montre une corrélation entre l'expression de *FPR1* dans les PBMCs et l'activité de l'enzyme hépatique TGO, qui se comporte comme un marqueur d'inflammation clinique.

De Yang *et coll.* (2000) ont montré que le peptide antimicrobien LL-37 se fixe sur un récepteur FPRs, appelé FPRL1 (FPR2/ALX), pour exercer une activité chimiotactique sur les neutrophiles, monocytes et des lymphocytes T humains. De plus, Tjabringa *et coll.* (2006) ont rapporté que le peptide LL-37 mobilise les éosinophiles et les neutrophiles primaires humains par le processus de chimiotactisme à travers les récepteurs FPRs. En accord avec les relations établies entre LL-37 et les récepteurs FPRs au niveau fonctionnel, nous montrons pour la première fois dans la présente étude que l'expression de FPR est positivement corrélée avec l'expression des gènes de LL-37 et DEFA1-3 dans les PBMCs. Le récepteur FPR présente 69 % d'homologie avec le récepteur FPRL1. Notre résultat supporte l'hypothèse suggérant que les récepteurs FPRs pourraient être des médiateurs fonctionnels de la cathélicidine LL-37 *in vivo*. Cette hypothèse peut être corroborée par des études récentes montrant que l'activation du récepteur FPRL1 par le peptide LL-37 conduit à l'augmentation de la demi-vie des neutrophiles par un mécanisme anti-apoptotique induit par l'interaction FPRL1-LL-37 (Nagaoka *et coll.,* 2006). Cette interaction conduit également à l'activation de la NADPH oxydase induisant la production des espèces réactives de l'oxygène (Iaccio *et coll.,* 2009). Ces phénomènes sont accompagnés par la phosphorylation des protéines kinase ERK-1/2, la suppression de l'expression de la protéine anti-apopotique Bcl-x_L, l'inhibition de l'activité de la caspase 3, la phosphorylation et la translocation de la sous unité $p47^{phox}$ de la NADPH oxydase. Ces résultats suggèrent que le peptide LL-37, présent au niveau des parois de l'endothélium vasculaire, pourrait stimuler le recrutement et l'activation des neutrophiles à

travers les récepteurs FPRs et ainsi contribuer à l'entretien de l'inflammation et le dysfonctionnement vasculaire. D'ailleurs, il a été montré que le peptide LL-37 est capable d'induire l'expression de la chimiokine MCP-1 et de la molécule d'adhésion intercellulaire ICAM-1 dans les cellules endothéliales *in vitro* (Edfeldt *et coll.,* 2006). Ces molécules jouent un rôle clé dans le recrutement des cellules immunitaires dans l'espace sous endothélial. De plus, une étude récente a montré que le peptide LL-37 régule la contraction vasculaire à travers un effet sur le récepteur FPRL1 endothélial (Berkestedt *et coll.,* 2008). Nos résultats montrant une corrélation positive entre l'expression de LL-37 et celle de FPR dans les PBMCs constituent alors un nouvel argument confortant les liens établis entre ce peptide et les récepteurs de la famille FPRs au niveau fonctionnel.

Les défensines-α exercent également une activité de chimio-attraction des cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques et les lymphocytes T (Grigat *et coll.,* 2007), à travers un récepteur de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (De Yang *et coll.,* 2000), comme les récepteurs FPRs. En accord avec cette hypothèse, notre étude montre que l'expression de FPR est significativement corrélée avec l'expression des DEFA1-3 dans les PBMCs. Nos résultats suggèrent alors un lien entre les peptides antimicrobiens et les récepteurs FPRs. En ce sens, d'autres molécules naturelles à activité antimicrobienne, CRAMP et la cathepsine G, semblent aussi activer les récepteurs FPRL1 (Kurosaka *et coll.,* 2005) et FPR (Sun *et coll.,* 2004), respectivement. En conclusion, les liens observés à la fois au niveau fonctionnel et maintenant au niveau de l'expression entre le récepteur FPR et les peptides LL-37 et les défensines-α 1-3 suggèrent que le récepteur FPR pourrait être un médiateur fonctionnel de ces peptides.

II.2. Association entre le polymorphisme *FPR1 c.32C>T* et le taux circulant de la E-sélectine (*Publication 2*)

Vu l'importance du récepteur FPR dans le processus immuno-inflammatoire, des variations génétiques au niveau de cette molécule peuvent affecter la production et les fonctions des molécules d'inflammation. D'ailleurs, certains polymorphismes génétiques du récepteur FPR ont été associés à des altérations de fonctions cellulaires caractéristiques de certaines pathologies inflammatoires ou infectieuses. Nous nous sommes donc intéressés à l'évaluation de l'influence éventuelle d'un variant génétique de FPR, *FPR1* c.32C>T (I11T), sur les taux circulants d'un nombre de molécules d'inflammation et d'adhésion cellulaire ainsi que l'effet éventuel sur l'expression des gènes de FPR et de LL-37 dans la cohorte STANISLAS.

II.2.1. Caractéristiques de l'échantillon étudié

L'étude de la relation entre le polymorphisme *FPR1* c.32C>T (I11T) et les molécules d'inflammation et d'adhésion cellulaire est réalisée sur le sous-échantillon 2 de la cohorte STANISLAS (n = 325 ; 164 hommes et 161 femmes). Il s'agit de parents uniquement, donc génétiquement non liés. La moyenne d'âge est de 44,0 ± 4,5 ans et varie de 33 à 58 ans. Les différentes caractéristiques cliniques et biologiques, ainsi que la prise de médicaments et autres habitudes de vie sont présentées dans le **Tableau 13**.

Tableau 13 : ***Caractéristiques cliniques et biochimiques de l'échantillon des 325 sujets ayant fait l'objet de l'étude du polymorphisme FPR1 c.32C>T.***

Variable	Moyenne	Minimum	Maximum
n = 325			
Age (années)	44,0±4,5	33,0	58,0
Hommes [n (%)]	164 (50,5%)		
IMC (kg/m^2)	25,0±3,9	16,7	44,5
PAS (mm Hg)	123,3±13,6	92,3	177,3
PAD (mm Hg)	74,0±10,3	40,7	116,7
Consommation de tabac (Cigarettes/jour)	3,9±8,6		
Consommation d'alcool (g/jour)	13,5±20,8		
Paramètres lipidiques et glucose			
Triglycérides (mmol/l) [a, b]	1,07 (0,66-1,74)	0,32	3,80
Cholestérol total (mmol/l) [b]	5,71±0,97	3,24	9,67
Apo-A1 (g/l) [b]	1,63±0,27	1,03	2,69
ApoB (g/l) [b]	1,01±0,24	0,25	1,88
HDL-C (mmole/l) [b]	1,62±0,48	0,77	3,90
LDL-C (mmole/l) [b]	3,64±0,95	0,73	7,75
Glucose (mmol/l) [b]	5,02±0,56	3,87	9,76
Prise de médicaments [n sujets (%)]			
Anti-inflammatoires	17 (5,2%)	-	-
Antibiotiques	4 (1,2%)	-	-
Contraceptifs oraux [c]	35 (21,7%)	-	-

Valeurs présentées sous forme de moyenne ± Ecart-type.
[a] *Moyenne géométrique (rangée de 1 Ecart-type).*
[b] *variables biologiques mesurées dans le sérum.*
[c] *% des femmes qui prenaient des contraceptifs oraux.*

II.2.2. Fréquence du polymorphisme *FPR1 c.32C>T* dans l'échantillon étudié

Nous avons établi la fréquence du polymorphisme *FPR1 c.32C>T* dans l'échantillon de travail (**Tableau 14**). Les fréquences génotypiques du polymorphisme *FPR1 c.32C>T* sont respectivement de 55%, 38% et 7% pour les génotypes CC, CT et TT. Ainsi, la distribution de ces génotypes respecte l'équilibre prédit par la loi de Hardy-Weinberg. Les fréquences allèliques obtenues sont de 74% pour l'allèle C et de 26% pour l'allèle rare T. La fréquence de l'allèle rare est similaire à celle reportée dans la littérature (Bhattacharya *et coll.,* 2007 ; Sahagun-Ruiz *et coll.,* 2001).

Tableau 14 : ***Fréquences génotypiques et allèliques du polymorphisme FPR1 c.32C>T dans l'échantillon étudié.***

	Génotypes			Allèles	
	CC	CT	TT	C	T
Effectif	178	125	22	481	169
Fréquence	0,55	0,38	0,07	0,74	0,26

(T : allèle rare)

II.2.3. Association entre le polymorphisme *FPR1 c.32C>T* et le taux circulant de la E-sélectine

Une étude récente a montré que le polymorphisme *FPR1 c.32C>T* est associé avec les indices inflammatoires, notamment le taux circulant de la protéine CRP dans une population canadienne (Bhattacharya *et coll.,* 2007). Afin de vérifier si le polymorphisme *FPR1 c.32C>T* affecte les taux circulants de la CRP et d'autres marqueurs d'inflammation dans la cohorte STANISLAS, nous avons corrélé les génotypes du polymorphisme *FPR1 c.32C>T* avec les taux circulants de nombreuses molécules d'inflammation et d'adhésion cellulaire, ainsi que le taux de leucocytes dans l'échantillon. Les facteurs d'ajustement : sexe, âge, IMC, la consommation de tabac et d'alcool, la prise d'antibiotiques, d'anti-inflammatoires et de contraceptifs oraux chez les femmes ont été inclus dans le modèle statistique **(Tableau 15).**

Parmi les sujets étudiés, 17 d'entre eux prennaient des anti-inflammatoires, 4 sujets étaient sous antibiotiques et 35 femmes prennant des contraceptifs oraux. Afin d'éliminer tout effet éventuel de la prise de médicaments sur la relation qui pourrait exister entre le polymorphisme *FPR1 c.32C>T* et les variables analysées, nous avons refait l'analyse d'association après exclusion des sujets sous traitements médicamenteux. Les variables d'ajustement inclues dans ce modèle sont alors le sexe, l'âge, l'IMC, la consommation de tabac et d'alcool.

Vu le nombre élevé de comparaisons réalisées, nous avons fait un ajustement de *Sidak* et seules les associations pour lesquelles $p \leq 0{,}002$ sont considérées statistiquement significatives.

Tableau 15 : ***Association du polymorphisme FPR1 c.32C>T avec les indices inflammatoires et les molécules d'adhésion cellulaire.***

	Génotypes *FPR1*c.32C>T			
Variable	CC	CT	TT	*p*
n	178	125	22	
Globules blancs (10^9 cells/l) [a]	6,69±1,53	6,93±1,63	6,68±2,37	NS
Neutrophiles (%) [a]	58,6±7,4	59,1±7,6	55,2±7,2	NS
Lymphocytes (%) [a]	29,6±6,4	29,8±6,2	33,3±7,1	NS
CRP (mg/l) [b]	0,98 (0,31-3,04)	0,83 (0,28-2,39)	0,89 (0,29-2,73)	NS
Haptoglobine (g/l) [a, b]	1,11±0,51	1,08±0,51	1,25±0,61	NS
Orosomucoïde (g/l) [a, b]	0,76±0,18	0,73±0,19	0,76±0,22	NS
IL-6 (ng/l) [c]	1,48 (0,83-2,63)	1,58 (0,69-3,64)	1,35 (0,87-2,11)	NS
IL-8 (ng/l) [c]	1,62 (0,76-3,46)	1,49 (0,71-3,14)	1,57 (0,83-2,98)	NS
IL-18 (ng/l) [c]	200 (131-304)	196 (117-327)	223 (125-395)	NS
MCP-1 (ng/l) [c]	88,9 (59,5-132,6)	86,2 (59,7-124,3)	90,2 (68,2-119,3)	NS
TNF-α (ng/l) [c]	2,47 (1,33-4,57)	2,34 (1,31-4,18)	2,61 (1,51-4,50)	NS
TNF-RII (ng/l) [c]	1474 (1106-1965)	1455 (1090-1941)	1551 (1185-2030)	NS
EGF (ng/l) [c]	11,3 (4,3-29,9)	11,5 (4,2-31,0)	15,0 (5,8-38,4)	NS
IGF-1 (µg/l) [c]	76,5 (50,9-114,9)	75,1 (47,4-118,9)	68,5 (49,2-95,5)	NS
IGF-BP3 (µg/l) [c]	2889 (2082-4010)	3020 (2289-3984)	2993 (2236-4006)	NS
VEGF (ng/l) [c]	27,3 (13,7-54,2)	32,5 (15,9-66,3)	26,3 (13,7-50,3)	NS
E-sélectine (µg/l) [b, d]	47,3 (29,5-75,8)	47,3 (25,0-89,7)	32,2 (16,8-61,7)	**0,001***
L-sélectine (µg/l) [b, d]	978 (690-1385)	1025 (769-1367)	960 (720-1280)	SN
P-sélectine (µg/l) [b, d]	127 (91-179)	126 (91-173)	127 (100-162)	NS
ICAM-1 (µg/l) [b, d]	253 (197-325)	253 (187-344)	249 (179-345)	NS

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes géométriques (rangée de 1 écart-type) ou de [a] moyenne arithmétique ± écart-type.
[b] variables biologiques mesurées dans le sérum.
[c] variables biologiques mesurées dans le plasma
[d] Les concentrations des molécules d'adhésion E-selectine, L-selectine, P-selectine et ICAM-1 sont déterminées chez 152, 107 et 19 sujets respectivement pour les 3 groupes de génotypes CC, CT et TT.
Test ANOVA après ajustement sur le sexe, âge, IMC, consommation d'alcool et de tabac, la prise d'antibiotiques, d'anti-inflammatoires et des contraceptifs oraux.
Différence significative si p ≤ 0,002 (ajustement Sidak)
** Modèle de transmission récessive (TT vs. CC+CT)*

Nous avons montré que parmi les molécules analysées, seule la E-sélectine circulante s'avère associée significativement au polymorphisme *FPR1 c.32C>T* (**Tableau 15, figure 43**). Dans l'échantillon total, les sujets homozygotes pour l'allèle rare (TT) ont un taux circulant moyen de 32,2 (16,8-61,7) µg/L contre 47,3 (29,5-75,8) pour les sujets hétérozygotes (CT) et 47,3 (25,0-89,7) pour les sujets homozygotes pour l'allèle fréquent (CC). Les individus homozygotes pour l'allèle 32T (TT) ont ainsi un taux de E-sélectine circulante d'environ 68% plus faible que les hétérozygotes et les homozygotes CC (p = 0,001 ; *ANOVA* selon le modèle récessif).

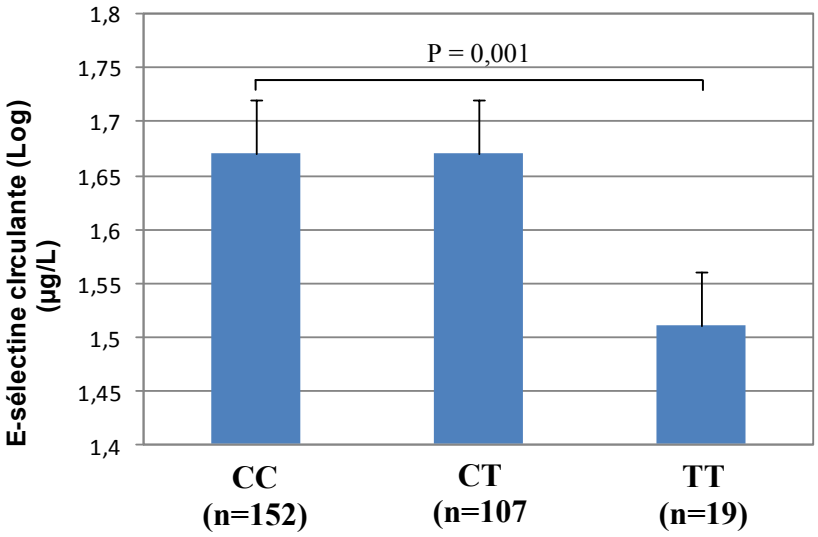


Figure 43 : ***Concentration de la E-sélectine circulante en fonction des génotypes de FPR1 c.32C>T dans l'échantillon étudié. Test ANOVA suivant le modèle récessif (CC + CT vs. TT).***

Après avoir exclu les sujets prenant des médicaments, l'association du polymorphisme *FPR1* c.32C>T avec le taux circulant de la E-sélectine reste statistiquement significative (**Figure 44).** Les homozygotes pour l'allèle rare (TT) présentent un taux moyen de E-sélectine significativement plus faible comparé aux hétérozygotes (CT) et les homozygotes fréquents (CC) (p = 0,002 ; modèle récessif).

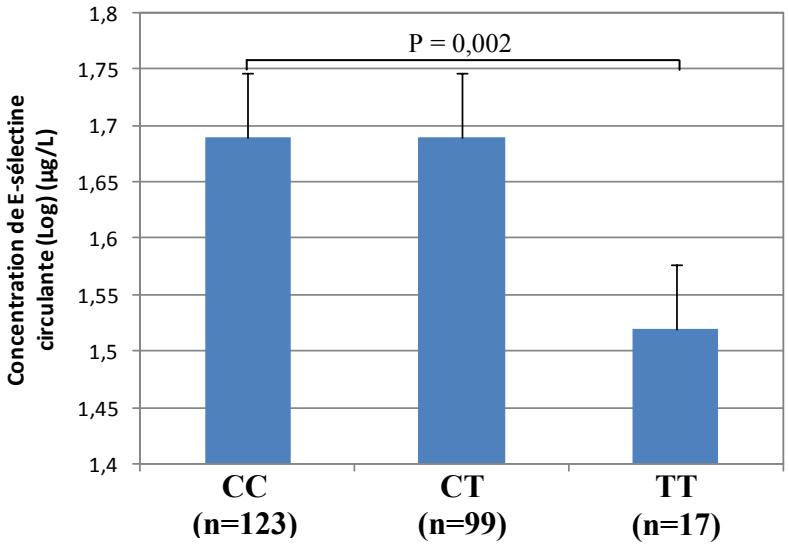


Figure 44 : ***Concentration de la E-sélectine circulante en fonction des génotypes de FPR1 c.32C>T après exclusion des sujets sous traitement médicamenteux. Test ANOVA selon le modèle récessif (CC + CT vs. TT).***

Enfin, nous avons évalué l'effet éventuel du polymorphisme *FPR1 c.32C>T* sur l'expression des ARNm de FPR et de LL-37 dans les PBMCs dans le sous-échantillon 1 décrit dans la ***section I.1.1 de résultats et discussions***. Nous avons observé que ce polymorphisme ne semble pas être associé au taux d'expression des ARNm de FPR ni de LL-37 (résultats non présentés). Ces résultats suggèrent que le polymorphisme *FPR1 c.32C>T* n'affecte pas les niveaux de transcription des gènes de FPR (*FPR1*) et de LL-37 dans les PBMCs.

II.2.4. Discussion

De nombreux polymorphismes ont été identifiés dans les régions codantes du récepteur FPR. Certaines de ces variations génétiques ont été récemment associées à des anomalies de la réponse inflammatoire (Gwinn *et coll.,* 1999 ; Sahagun-Ruiz *et coll.,* 2001). Vu le rôle clé des récepteurs FPRs dans les réponses immunes et inflammatoires, notamment dans la médiation de l'activité chimiotactique du peptide LL-37, nous avons évalué les relations éventuelles entre un variant génétique du récepteur FPR, *FPR1* c.32C>T/p.I11T, et le taux circulant d'un nombre de molécules d'inflammation et d'adhésion cellulaire dans la cohorte STANISLAS. Nous avons également analysé l'effet éventuel du polymorphisme sur l'expression des ARNm de FPR et de LL-37 dans les PBMCs.

Le polymorphisme *FPR1* c.32C>T est localisé dans l'extrémité N-terminale située dans la partie extracellulaire du récepteur. Parmi une vingtaine de marqueurs d'inflammation analysés dans la présente étude, la E-sélectine circulante est le seul paramètre à être corrélé de façon significative au polymorphisme *FPR1 c.32C>T/ p.I11T.* Nous avons montré que le génotype homozygote pour l'allèle rare (TT) est associé à des taux significativement faibles de E-sélectine circulante. Etant donné que la E-sélectine est exprimée par les cellules endothéliales puis libérée dans la circulation en réponse à une activation de l'endothélium, notre résultat suggère que le variant *FPR1* c.32C>T / p.I11T pourrait être un facteur génétique impliqué dans la modulation de la fonction endothéliale.

Des variations génétiques dans le gène *FPR1* ont été associées à des pathologies inflammatoires et à la réponse immunitaire. Il a été rapporté que l'altération de deux codons de *FPR1*, un dans le troisième domaine transmembranaire (c.329T>C / p.F110S) et l'autre dans la seconde boucle intracellulaire (c.378C>G / p.C126W), sont significativement associés à la forme agressive de la parodontite (Gwinn *et coll.,* 1999), une pathologie inflammatoire d'origine bactérienne affectant les tissus de soutien dentaire. De plus, des études expérimentales ont montré que des souris délétères du gène *fpr1*, un orthologue du gène *FPR1* humain, se développent normalement, mais présentent une sensibilité élevée aux infections bactériennes (Gao *et coll.,* 1999). Ces études montrent clairement l'importance du récepteur FPR dans la défense immuno-inflammatoire. Dans la présente étude, nous montrons pour la première fois une association entre le polymorphisme *FPR1 c.32C>T* et le taux circulant de la E-sélectine, suggérant que ce polymorphisme pourrait être lié au processus d'activation de

l'endothélium vasculaire. Il est largement établi que la sélectine endothéliale constitue un médiateur des fonctions des cellules inflammatoires au niveau vasculaire (Ruchaud-Sparagano *et coll.,* 2000). Des taux élevés de molécules d'adhésion, comme la E-sélectine, ont été associés au dysfonctionnement endothélial et des états inflammatoires comme le choc septique, les maladies de l'artère coronaire, le diabète, l'arthrite rhumatoïde ou encore l'asthme (Bevilacqua et Nelson, 1993 ; Carlos et Harlan, 1994). De plus, les molécules d'adhésion sont connues pour leur rôle de médiateur des interactions entre les leucocytes et les cellules endothéliales conduisant à l'activation de l'endothélium. La E-sélectine joue un rôle clé dans le recrutement des neutrophiles dans les tissus endommagés ou des sites d'infection en vue de l'activation d'une réponse immuno-inflammatoire (McMeekin *et coll.,* 2006). D'ailleurs, le blocage fonctionnel ou l'absence de la E-sélectine induit une diminution du recrutement des neutrophiles en réponse à un gradient de molécules chimio-attractantes comme les peptides N-formylés ou le facteur *macrophage inflammatory protein-2* (Ley *et coll.,* 1998).

Le résultat obtenu dans la présente étude suggère que le polymorphisme *FPR1 c.32C>T* pourrait être associé au processus d'activation de l'endothélium et la libération de la E-sélectine dans la circulation. Nous avons également observé dans cette étude que le polymorphisme *FPR1 c.32C>T* n'affecte pas l'expression des ARNm de FPR dans les cellules circulantes. Bien que le mécanisme par lequel ce polymorphisme pourrait affecter le taux circulant de la E-sélectine reste à déterminer, nous postulons que le polymorphisme *FPR1 c.32C>T* pourrait affecter l'organisation structure/fonction de la protéine FPR du fait que la variation génétique induit un changement d'acide aminé (Ile>Thr). En accord avec cette hypothèse, une étude récente a montré *in vitro* une accumulation intracellulaire substantielle du variant FPR p.I11T, contrairement au récepteur FPR sauvage (Bhattacharya *et coll.,* 2007). Une telle accumulation pourrait affecter la fonction du récepteur FPR. Un autre mécanisme, par lequel ce polymorphisme affecterait le taux de la E-sélectine, impliquerait le processus de clivage de la E-sélectine de la surface des cellules productrices. L'expression de formes distinctes du récepteur FPR pourrait affecter le clivage protéolytique de la E-sélectine de la surface des cellules endothéliales activées, conduisant à des taux variables de la forme soluble de la E-sélectine. Sur la base de ces hypothèses, une analyse approfondie de la relation entre le polymorphisme *FPR1 c.32C>T* et la structure/fonction du récepteur FPR pourrait améliorer la compréhension de la réponse de l'endothélium à l'activation du récepteur FPR.

Il est important de noter que contrairement à ce qui a été rapporté récemment par Bhattacharya *et coll.* (2007), nous n'avons pas trouvé dans la présente étude d'association entre le polymorphisme *FPR1 c.32C>T* et le taux de la protéine CRP. Cette différence pourrait être due aussi bien à des différences dans les méthodologies utilisées qu'aux populations étudiées. Bien que les deux populations soient d'origine caucasienne, l'environnement et leur mode de vie peuvent être différents. Des facteurs environnementaux pourraient affecter l'impact des variations génétiques au travers d'interactions gène-environnement. En accord avec cette hypothèse, une étude récente a montré qu'un polymorphisme au niveau du gène du récepteur de l'oestrogène-α est associé à une diminution du taux de la E-sélectine chez les femmes sous thérapie hormonale (Yeboah *et coll., 2008*).

En conclusion, l'ensemble de ces études sur le gène du récepteur FPR montre que

1) L'expression des ARNm du récepteur FPR est associée à celle de des ARNm deLL-37 et des DEFA1-3.
2) Des altérations dans le gène du récepteur FPR (*FPR1)* pourraitent être associées à l'activation vasculaire et la libération dans la circulation de médiateurs inflammatoires comme la E-sélectine.

Du fait que l'expression des gènes de LL-37 et des DEFA1-3 semblent être associées aux facteurs de risque de dysfonctionnement vasculaire (pression artérielle, homéostasie lipidique, obésité,…), les défensines-α DEFA1-3 et la cathélicidine LL-37 pourraient être impliquées dans les mécanismes de dysfonctionnement vasculaire au travers, partiellement du moins, du récepteur FPR. Des études futures sur les fonctions des défensines-α et cathélicidine et leurs relations avec les récepteurs FPRs pourraient révéler un intérêt pharmacologique pour ces molécules dans le domaine des maladies cardiovasculaires.

III. Etude de la régulation de l'expression des défensines-α et des cathélicidines in vitro

Nos études épidémiologiques décrites dans les chapitres précédents ont montré que l'expression de la cathélicidine LL-37 et des défensines-α 1-3 dans les cellules circulantes est corrélée à des variations des taux circulants des lipides (triglycérides, HDL-C,…), de glucose, des indices inflammatoires (leucocytes) et à d'autres facteurs de risque du syndrome métabolique et des maladies cardiovasculaires. Ces résultats nous ont amenés à nous demander quelle est la nature de la relation entre les variations biochimiques et métaboliques et l'expression des gènes des DEFA1-3 et de LL-37. Pour mieux comprendre ces corrélations, nous avons procédé à l'étude de la régulation de l'expression de ces gènes dans des lignées cellulaires en réponse à des traitements par le glucose ou/et l'insuline, l'adipogenèse, ou en réponse à des interactions cellulaires entre des cellules immunes et des adipocytes.

III.1. Régulation de l'expression des *DEFA1-3* en réponse au traitement par le glucose ou/et l'insuline

III.1.1. Etablissement du modèle cellulaire

III.1.1.1. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires humaines U-937 et HL-60 sont des monocytes néoplasiques (U-937) ou des pro-myéloblastes (HL-60) fréquemment utilisées pour étudier la régulation et le profil d'expression des gènes impliqués dans le processus d'athérosclérose. Nous avons donc choisi d'utiliser ces deux lignées cellulaires afin d'étudier la régulation des *DEFA1-3* dans le contexte des altérations métaboliques comme l'hyperglycémie.

III.1.1.2. Analyse de l'expression des gènes *DEFA1-3*

Afin de vérifier si les lignées cellulaires HL-60 et U-937 expriment les *DEFA1-3*, nous avons procédé à l'extraction des ARN totaux à partir des cellules HL-60 et U-937 en culture confluente, ensuite nous avons analysé l'expression des gènes *DEFA1-3* par RT-PCR semi-quantitative. Nos résultats montrent que les *DEFA1-3* sont exprimées dans la lignée cellulaire HL-60 mais pas dans les cellules U-937. Leur expression est détectée après migration sur gel de polyacrylamide natif (10%) par la visualisation d'une bande correspondant à la taille attendue, 174 pb (**Figure 45**). Pour la suite des expériences, nous avons utilisé les cellules HL-60.

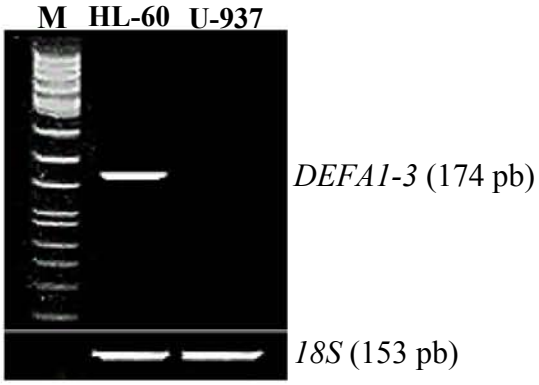


Figure 45 : ***Profil d'expression des gènes DEFA1-3 dans les lignées cellulaires HL-60 et U-937. L'expression des gènes est déterminée par RT-PCR semi-quantitative. M : marqueur de taille de fragments d'ADN.***

Etant donné que les macrophages et les neutrophiles contribuent au développement du processus inflammatoire de l'athérosclérose, nous avons induit la différenciation des cellules HL-60 en cellules ayant les caractéristiques des neutrophiles et des macrophages afin d'analyser l'expression des DEFA1-3.

III.1.1.3. Différenciation des cellules HL-60 en neutrophiles

Plusieurs composés sont décrits dans la littérature et utilisés pour induire la différenciation des pro-myéloblastes HL-60 en cellules qui ressemblent à des neutrophiles. Parmi ces composés se trouvent le diméthyle sulfoxyde (DMSO) et l'acide rétinoïque. Dans nos études, nous avons choisi de traiter les cellules HL-60 avec le DMSO en testant deux concentrations, 1,2 et 1,3 % suivant le protocole de Coburn *et coll.* (2006). Afin de s'assurer

de la différenciation en neutrophiles, nous nous sommes basés sur deux critères essentiels. Le premier étant les changements morphologiques des cellules, et donc la capacité du traitement à transformer des cellules de forme régulière et à noyau rond, caractéristiques des pro-myéloblastes, en cellules de forme irrégulière avec un cytoplasme granuleux et un noyau segmenté, caractéristiques des granulocytes neutrophiles. Un deuxième critère au niveau moléculaire est basé sur la capacité du DMSO à induire l'expression du gène *CD11b*, un marqueur des neutrophiles matures (Xu *et coll.,* 2008).

Les changements morphologiques induits au niveau des cellules par le traitement au DMSO ont été évalués par microscopie après coloration au May-Grünwald Giemsa. L'observation microscopique des cellules non traitées montre une morphologie des pro-myéloblastes typiques possédant un large noyau arrondi. En revanche, lorsque ces cellules sont traitées au DMSO, des changements morphologiques sont observés. A noter l'existence de cellules de petite taille avec une forme irrégulière, un noyau segmenté et un moindre rapport noyau/cytoplasme par comparaison aux cellules non traitées. Un tel phénotype est caractéristique des neutrophiles matures (Collins *et coll.,* 1978).

Pour confirmer la différenciation des cellules HL-60 en neutrophiles, nous avons quantifié l'expression du gène *CD11b* par RT-PCR semi-quantitative dans les cellules traitées et non traitées au DMSO. Nous avons montré que le traitement par 1,2% de DMSO pendant 5 jours était suffisant pour transformer les pro-myéloblastes HL-60 en neutrophiles. En effet, ce traitement induit l'expression du gène *CD11b* dès le 4ème jour de traitement pour atteindre un seuil d'induction significatif au 5ème jour (**Figure 46).** L'utilisation de 1,3% de DMSO induit les mêmes changements morphologiques et moléculaires (induction de *CD11b*) dans les cellules HL-60. Néanmoins, la concentration de 1,3% de DMSO a un effet cytotoxique important. Le pourcentage de mortalité cellulaire estimé par le test d'exclusion au bleu de Trypan est de 40% pour les cellules traitées par 1,3% DMSO après 4 jours de traitement, alors qu'il est de 20% seulement pour les cellules traitées par 1,2% de DMSO pendant cette même durée. Dans la suite de nos études, nous avons retenu la concentration de 1,2% de DMSO pendant 5 jours de traitement.

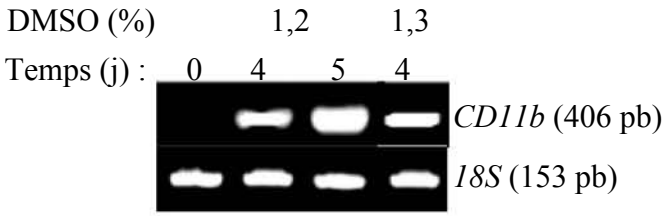


Figure 46 : ***Expression des ARNm de CD11b dans les cellules HL-60 traitées par 1,2 ou 1,3% de DMSO pendant le temps indiqué. Le gène 18S est utilisé comme contrôle interne.***

III.1.1.4. Différenciation des cellules HL-60 en macrophages

La différenciation des pro-myéloblastes HL-60 en cellules ressemblant aux macrophages a été induite par le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), un composé connu, entre autres, pour sa capacité à induire la différenciation des cellules U-937 et HL-60 en macrophages. Après mise au point des conditions expérimentales de différenciation, les cellules ont été traitées avec 100 nM de PMA pour différencier $1,5x10^6$ cellules/puits. Le traitement a été appliqué pendant 24 h pour permettre la différenciation d'environ 90% des cellules contenues dans la flasque. Afin de confirmer la différenciation des cellules, nous avons évalué par microscopie les changements morphologiques des cellules traitées avec du PMA. Les cellules traitées deviennent adhérentes au fond des puits formant des amas avec une forme irrégulière. Ces cellules présentent également un noyau de forme irrégulière par comparaison aux cellules non traitées qui ont un noyau rond. Pour confirmer, au niveau moléculaire, la différenciation en macrophages des cellules traitées au PMA, nous avons quantifié par RT-PCR semi-quantitative l'expression du gène *CD14,* un marqueur des macrophages. L'expression de *CD14* est détectée dans les cellules traitées au PMA pendant 12 h et présente un seuil d'induction significatif après 24 h de traitement (**Figure 47**). A l'inverse, les cellules non traitées n'ont pas exprimé le gène *CD14,* témoignant que la différenciation en macrophages a bien eu lieu dans les cellules traitées par le PMA.

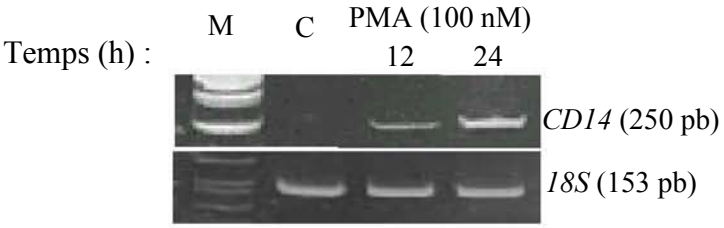


Figure 47 : ***Expression de CD14 dans les cellules HL-60 traitées avec 100 nM de PMA pendant les durées indiquées. M : marqueur de taille ; C : HL-60 non traitées.***

III.1.1.5. Expression des gènes *DEFA1-3* dans les cellules HL-60 différenciées en neutrophiles et en macrophages

Nous avons évalué l'effet que pourrait avoir la différenciation des cellules HL-60 sur l'expression des gènes *DEFA1-3*. Nous avons quantifié par RT-PCR semi-quantitative l'expression des *DEFA1-3* dans les cellules HL-60 différenciées et non différenciées. Nos résultats montrent que les cellules HL-60 différenciées en neutrophiles produisent la même quantité d'ARNm des DEFA1-3 que les cellules non différenciées, ce qui suggère que la différenciation en neutrophiles n'affecte pas l'expression des DEFA1-3 dans les cellules HL-60. En revanche, nous avons constaté une inhibition complète de l'expression de DEFA1-3 dans les cellules différenciées en macrophages, suggérant que le traitement des cellules HL-60 avec le PMA réprime l'expression de DEFA1-3. Ces résultats nous ont permis de conclure que les neutrophiles dérivés des cellules HL-60 pourraient être un modèle d'intérêt pour étudier la régulation de l'expression de DEFA1-3.

III.1.2. Régulation de l'expression des *DEFA1-3* dans les neutrophiles dérivés des cellules HL-60

III.1.2.1. Effet du glucose

L'identification de la lignée cellulaire exprimant les DEFA1-3 et sa différenciation en neutrophiles nous ont permis d'étudier l'effet du glucose sur l'expression des gènes *DEFA1-3*. Les neutrophiles dérivés des cellules HL-60 en culture ont été traités avec les concentrations de 4,5 mM et 10 mM de glucose pendant 6 h. Cette durée de traitement simule l'étape post-prandiale de l'organisme humain, caractérisée par la présence de taux élevés de glucose dans la circulation. Nous avons montré que le traitement des neutrophiles HL-60 avec 10 mM de glucose pendant 6 h a provoqué une diminution significative du taux d'expression des ARNm des DEFA1-3 par comparaison au contrôle ($p < 0,001$) (**Figure 48**). Les cellules en culture étant en carence d'insuline, le transport de glucose dans les cellules pourrait être lent. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons ajouté de l'insuline dans le milieu de culture des cellules traitées par du glucose.

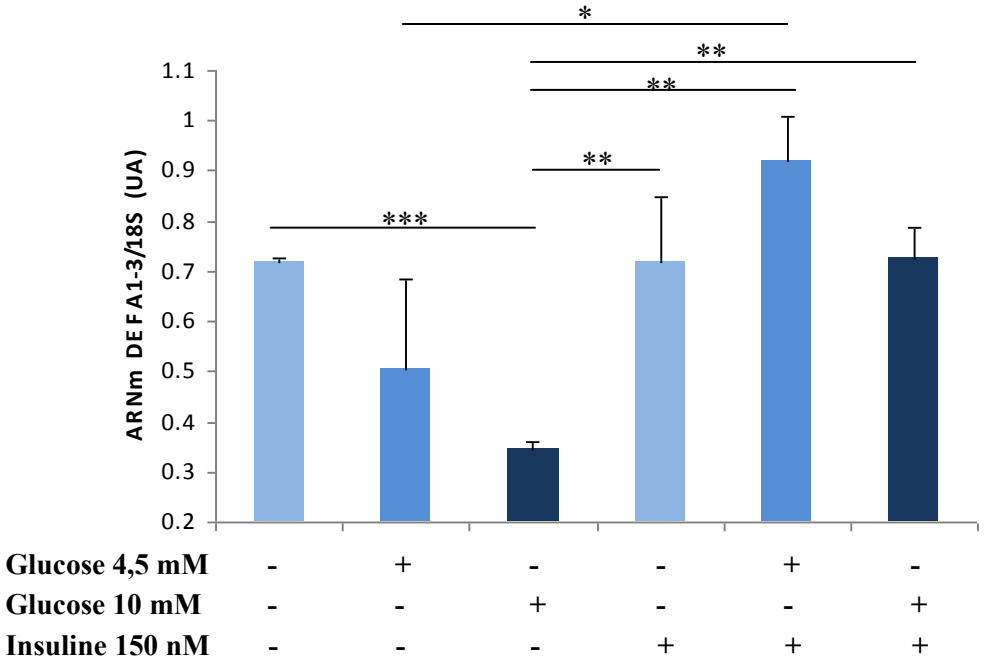


Figure 48 : ***Régulation de l'expression des ARNm des DEFA1-3 dans les neutrophiles dérivés des cellules HL-60 par le glucose ou/et l'insuline. Les neutrophiles ont été traités pendant 6 h avec les concentrations indiquées. Les ARNm des DEFA1-3 sont quantifiés par RT-PCR semi-quantitative. Les résultats présentés sont la moyenne d'expression des DEFA1-3 de deux expériences, exprimée en rapport d'ARNm DEFA1-3/18S (moyenne ± écart type). * p = 0,08 ; ** p < 0,05 ; *** p = 0.001 ; Test t Student.***

III.1.2.2. Effet du glucose en présence d'insuline sur l'expression des *DEFA1-3*

Après traitement des cellules avec le glucose en présence cette fois-ci de 150 nM d'insuline, l'analyse de l'expression des *DEFA1-3* a montré que l'ajout de l'insuline a un effet inverse par rapport à celui du glucose sur l'expression des *DEFA1-3* dans les neutrophiles HL-60. Nous avons observé une augmentation d'environ 2 fois dans l'expression des ARNm des DEFA1-3 dans les cellules cultivées en présence d'insuline par comparaison aux cellules cultivées dans les conditions d'hyperglycémie uniquement ($p < 0,05$) (**Figure 48**). Nous démontrons ainsi une régulation *in vitro* des gènes DEFA1-3 par le glucose et l'insuline dans les neutrophiles dérivés des cellules HL-60.

III.1.3. Discussion

Les cellules HL-60 sont des pro-myélocytes leucémiques qui expriment les DEFA1-3 (Daher *et coll.,* 1988). De plus, ces cellules peuvent être spécifiquement différenciées en neutrophiles ou en macrophages matures en les cultivant en présence de composés spécifiques (Fischkoff et Condon*.,* 1985). Contrairement aux lymphocytes B, les neutrophiles et les macrophages sont présents en quantités abondantes dans les lésions d'athérosclérose où ils contribuent aux différents stades de développement des plaques d'athérosclérose. Ces cellules produisent de fortes concentrations de chimiokines, de cytokines pro-inflammatoires, et de nombreuses substances à activité antimicrobienne comme les métallo-protéases et la lipoprotéine-phospholipase A_2 (Libby, 2002 ; Mohler *et coll.,* 2008).

Dans la présente étude, nous avons montré que la différenciation des cellules HL-60 en neutrophiles en utilisant le DMSO ne semble pas affecter l'expression des gènes DEFA1-3. Par ailleurs, la différenciation de ces cellules en macrophages, induite par le PMA, semble inhiber l'expression des DEFA1-3. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Herwig *et coll.* (1996), suggérant que la transcription des défensines est spécifique à la voie de différenciation granulocytaire des pro-myélocytes. Le modèle des neutrophiles dérivés des cellules HL-60 pourrait donc être considéré comme étant le type leucocytaire d'intérêt pour étudier l'éventuelle régulation des gènes DEFA1-3 dans le contexte de l'inflammation et des altérations métaboliques.

Afin de comprendre la relation que nous avons observé entre le taux de glucose circulant et le niveau d'expression des DEFA1-3 dans les PBMCs des sujets de la cohorte STANISLAS, nous avons analysé l'effet de traitement par le glucose sur l'expression des DEFA1-3 dans les neutrophiles dérivés des cellules HL-60 *in vitro*. Les résultats de ces études montrent que le glucose provoque une diminution significative de l'expression des ARNm des DEFA1-3 dans les neutrophiles. Cette diminution est restaurée lorsque l'insuline est ajoutée dans le milieu de culture. L'expression des DEFA1-3 est significativement augmentée par la combinaison du glucose et de l'insuline dans le milieu de culture. Ces observations suggèrent l'existence d'un lien entre l'expression des DEFA1-3 et le métabolisme du glucose et les voies de signalisation d'insuline. Ces résultats confirment bien la corrélation observée entre l'expression des DEFA1-3 et la glycémie auprès des sujets de la cohorte STANISLAS (*étudiés dans la section I*). Nos résultats sont en accord avec deux études réalisées sur les

défensines-β chez des animaux diabétiques. Hiratsuka *et coll.* (2001) ont démontré une diminution de l'expression de la défensine-β1 dans les reins de rongeurs diabétiques. Une étude plus récente a montré que l'expression de la défensine-β1 et d'autres éléments du système immunitaire inné comme le TLR-2 et -4 dans les reins de rats diabétiques était réprimée par une hyperglycémie, mais cette répression peut être inversée par un traitement à l'insuline (Froy *et coll.,* 2007). Cependant, des résultats contradictoires ont été rapportés récemment par ces mêmes auteurs (Barnea *et coll.,* 2008) et par Malik et Al-Kafaji (2007), montrant une induction de l'expression des transcrits de la défensine-β1 par le glucose dans des cellules rénales humaines et murines, contrairement à ce qui a été observé *in vivo*. Toutefois, l'ensemble de ces études s'accorde avec la nôtre sur le fait que l'insuline, en présence de taux anormalement élevés de glucose, induit l'expression des défensines aussi bien *in vivo* que *in vitro* et laisse postuler que la signalisation par l'insuline modulerait l'expression des défensines.

Bien qu'un effet du glucose et d'insuline sur l'expression de la défensine-β1 soit largement documenté dans des cellules rénales, nos études préliminaires montrent pour la première fois que le glucose ou/et l'insuline pourrait réguler l'expression des défensines-α dans les neutrophiles. Nos résultats sont confortés par l'étude de Walrand *et coll.* (2004) qui ont mis en évidence le rôle de l'insuline dans la régulation des fonctions des neutrophiles *in vivo*. Ces auteurs ont montré que l'insuline amplifie l'activité chimiotactique, la phagocytose et les capacités bactéricides des neutrophiles chez des hommes supposés sains. Par ailleurs, le mécanisme par lequel les voies de signalisation de glucose et d'insuline affecteraient l'expression des défensines reste à déterminer.

III.2. Etude de la régulation de l'expression de la cathélicidine de souris (CRAMP) dans la lignée de cellules 3T3-L1

III.2.1. Etablissement d'un modèle cellulaire

L'adiposité constitue un facteur de risque qui prédispose fortement au développement du syndrome métabolique et des maladies cardiovasculaires. En plus des perturbations de l'homéostasie lipidique, l'obésité est caractérisée par une inflammation chronique. Cette inflammation est due en particulier à l'infiltration du tissu adipeux par les cellules immuno-inflammatoires, notamment les monocytes, les macrophages et les lymphocytes. En plus de leur contribution à la production des cytokines inflammatoires, les cellules immuno-inflammatoires infiltrantes aux tissus adipeux activent les adipocytes pour secréter de nombreux médiateurs, notamment les adipocytokines qui participent à l'entretien des états inflammatoires. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude de l'effet des interactions *in vitro* entre cellules immuno-inflammatoires et adipocytes sur l'expression des cathélicidines, en tant qu'effecteurs immuno-inflammatoires. Nous avons également analysé l'effet du glucose ou/et d'insuline sur l'expression de la cathélicidine de souris dans la lignée 3T3-L1.

III.2.1.1. Analyse de l'expression des cathélicidines dans les lignées de cellules U-937 et 3T3-L1

Afin d'établir un modèle *in vitro* permettant d'étudier la régulation et l'effet de l'interaction entre cellules immuno-inflammatoires et adipocytes sur l'expression des cathélicidines, nous avons utilisé la lignée U-937 de monocytes humains et une lignée de pré-adipocytes fibroblastiques murine, 3T3-L1. Les pré-adipocytes 3T3-L1 sont fréquemment utilisés dans les études des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation du métabolisme, notamment l'adipogenèse (Cornelius *et coll.,* 1994).

Nous avons analysé l'expression des cathélicidines CRAMP (homologue de LL-37 chez la souris) et LL-37, respectivement dans les cellules 3T3-L1 murines et les cellules U-937 humaines en culture. Nous avons procédé à l'extraction des ARN totaux des cellules U-937 et 3T3-L1 en culture confluente suivie de RT-PCR semi-quantitative. Comme attendu, nous avons détecté l'expression des ARNm de LL-37 dans les cellules U-937. Curieusement,

nous avons observé une expression du gène de la cathélicidine CRAMP dans les pré-adipocytes 3T3-L1. A notre connaissance, cette étude est la première à mettre en évidence l'expression d'une cathélicidine dans une lignée de pré-adipocytes.

Etant donné que les cathélicidines sont exprimées dans les cellules U-937 et 3T3-L1, et que l'interaction *in vivo* entre macrophages et adipocytes contribue à l'entretien des états inflammatoires associés au tissu adipeux, nous avons procédé à la différenciation des cellules U-937 et 3T3-L1 respectivement en macrophages et en adipocytes afin d'étudier l'effet de l'interaction de ces cellules *in vitro* sur l'expression des cathélicidines.

III.2.1.2. Différenciation des cellules 3T3-L1 en adipocytes

L'utilisation des cellules 3T3-L1 pour des études de régulation du métabolisme est due en partie à son potentiel de différenciation en adipocytes relativement stable (Chae et Kwak, 2003). Les cellules 3T3-L1 ont été diférenciées en adipocytes suivant le protocole publié par Choi *et coll.* (2006) avec quelques adaptations. La différenciation des cellules 3T3-L1 est suivie par microscopie en évaluant les changements morphologiques des cellules. Les cellules 3T3-L1 ont atteint leur différenciation maximale à 7 jours après induction. Par comparaison aux cellules non traitées avec le milieu de différenciation, les cellules traitées perdent leur forme fibroblastique allongée au profit d'une forme ronde. Ces cellules deviennent de grande taille et remplies de petites vacuoles réfringentes constituées de lipides accumulés (Gao *et coll.,* 2008). Pour s'assurer de la différenciation adipocytaire, nous avons examiné par microscopie les cellules après coloration *Oil red O*. Contrairement aux cellules non traitées, l'examen microscopique montre qu'après rinçage les cellules différenciées restent colorées en rouge et réfringentes. Cela est du à la rétention du colorant par les lipides, notamment les lipides neutres accumulés dans ces cellules (Gao *et coll.,* 2008), grâce aux propriétés lipophiles du colorant (**Figure 49).**

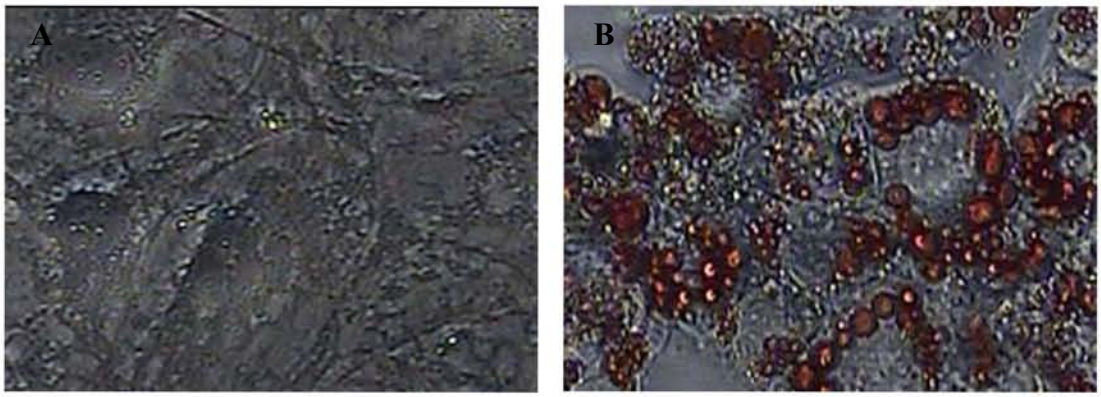


Figure 49 : ***Coloration Oil red O des lipides dans les cellules 3T3-L1 en culture non différenciées (A) et après 7 jours de différenciation en adipocytes (B).***

III.2.1.3. Différenciation des cellules U-937 en macrophages

Afin d'établir un modèle cellulaire de macrophages, nous avons induit la différenciation des cellules U-937 en cellules qui ressemblent à des macrophages selon le protocole décrit par Angst *et coll.* (2008). Les cellules U-937 différenciées avec le PMA sont largement utilisées comme modèle de macrophages *in vitro* (Larrick *et coll.,* 1980 ; Shin *et coll.,* 2007).

La différenciation en macrophages a été évaluée par le suivi en microscopie des changements morphologiques des cellules et de leur adhérence. Après 48 h de culture en présence de 10 nM de PMA, les cellules deviennent adhérentes, larges et avec une surface d'apparence rugueuse.

III.2.2. Régulation de l'expression du gène de la cathélicidine CRAMP dans les adipocytes dérivés des cellules 3T3-L1

III.2.2.1. La différenciation adipocytaire induit l'expression de CRAMP dans les cellules 3T3-L1

Nous avons étudié les effets de la différenciation adipocytaire ainsi que des molécules adipogéniques, utilisées pour induire la différenciation adipocytaire, sur l'expression du gène de la cathélicidine CRAMP. Les ARNm de CRAMP ont été quantifiés dans les cellules 3T3-L1 avant et après différenciation. Nous avons montré une augmentation significative (2 fois ; p = 0,004) de l'expression des ARNm de CRAMP dans les adipocytes comparé aux cellules 3T3-L1 non différenciées (**Figure 50**).

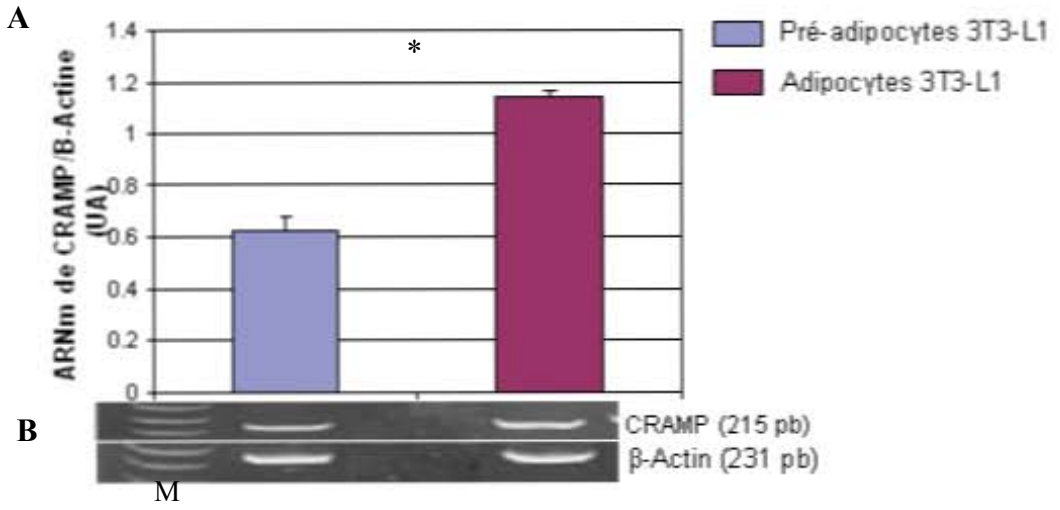


Figure 50 : ***Effet de la différenciation adipocytaire sur l'expression du gène de CRAMP dans les cellules 3T3-L1. Les cellules 3T3-L1 ont été différenciées en adipocytes pendant 7 jours. L'expression des ARNm de CRAMP est quantifiée par RT-PCR semi-quantitative et présentée en moyenne de deux expériences. A) Les résultats d'expression sont exprimés en rapport d'ARNm CRAMP/β-actine (moyenne ± écart type). B) migration des produits de PCR sur gel de plyacrylamide 10%. M : marqueur de taille. *p = 0,004 ; Test t Student pour la différence d'expression de CRAMP entre pré-adipocytes et adipocytes 3T3-L1.***

III.2.2.2. Régulation du gène *CRAMP* par le glucose et l'insuline

Il est admis que le processus d'adipogénèse est étroitement associé au métabolisme du glucose. Après avoir montré une induction de l'expression du gène de CRAMP dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes, nous avons testé l'effet du glucose sur l'expression de *CRAMP* dans ces adipocytes. Les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes ont été traitées avec les concentrations de 5 mM et 10 mM de glucose pendant 6 h. L'expression des ARNm de CRAMP a été déterminée par RT-PCR semi-quantitative et normalisée sur l'expression des ARNm de β-actine (ARNm CRAMP/β-actine).

Nous avons montré que l'expression des ARNm de CRAMP a diminué de 55% dans les adipocytes traités avec 5 mM de glucose comparé aux adipocytes non traités (**Figure 51**), tandis que le traitement des adipocytes avec 10 mM de glucose ne semble pas affecter l'expression de CRAMP (**Figure 51**). Nous avons ensuite testé l'effet du glucose sur l'expression de *CRAMP* en présence d'insuline. Nous avons ajouté de l'insuline (100 ou 150 nM) dans le milieu de culture des adipocytes contenant 5 mM de glucose.

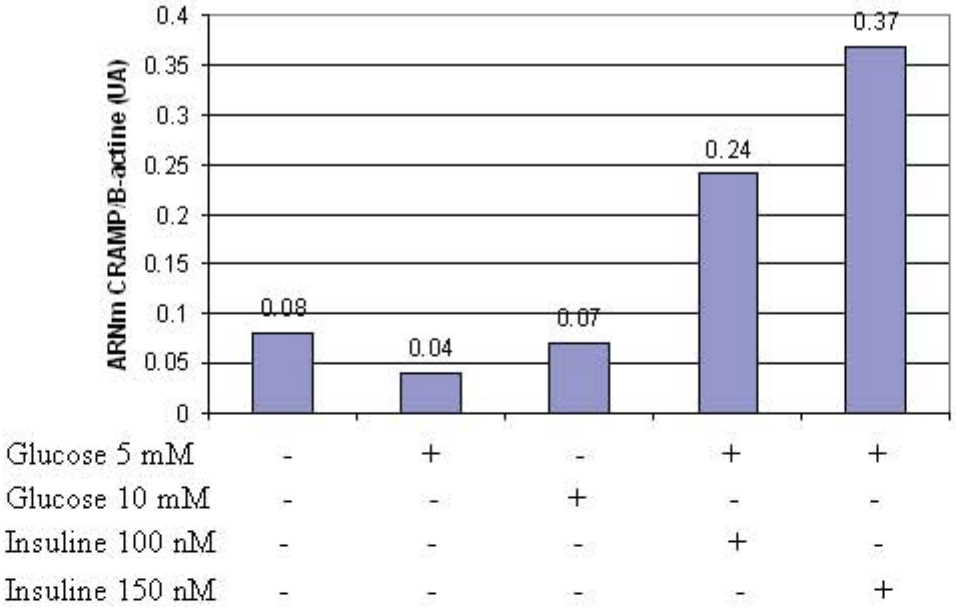


Figure 51 : ***Régulation de l'expression des ARNm de CRAMP dans les adipocytes 3T3-L1 par le glucose ou/et l'insuline. Les adipocytes 3T3-L1 traités pendant 6 h avec le glucose et/ou insuline aux concentrations indiquées. Les ARNm de CRAMP sont quantifiés par RT-PCR semi-quantitative et les résultats sont sous forme de rapport ARNm CRAMP/ARNm β-actine.***

Nos résultats montrent que l'insuline a un effet inverse à celui du glucose sur l'expression des ARNm de CRAMP dans les adipocytes. Nous avons observé une augmentation de l'expression de CRAMP dans les adipocytes de manière proportionnelle à la concentration d'insuline. Le taux relatif d'ARNm de CRAMP est 6 fois et 9 fois plus élevé dans les adipocytes traités respectivement avec 100 et 150 nM d'insuline par comparaison aux adipocytes traités uniquement avec 5 mM de glucose (**Figure 51**). Bien que ces expériences soient réalisées une seule fois, l'ensemble de ces résultats préliminaires suggère que le glucose et l'insuline régulent l'expression du gène de la cathélicidine CRAMP dans les adipocytes *in vitro*.

III.2.2.3. Les interactions cellulaires entre les adipocytes 3T3-L1 et les macrophages U-937 affectent l'expression de *CRAMP*

Afin d'étudier les interactions entre les adipocytes 3T3-L1 et les macrophages U-937 et leurs effets sur l'expression de la cathélicidine CRAMP, nous avons utilisé deux approches ; la première consiste en la culture des adipocytes 3T3-L1 dans le milieu conditionné pendant 24 h par les macrophages U-937 ; la seconde approche est basée sur la co-culture des deux types cellulaires en utilisant le système *transwell* (BD Bioscience, France) (*voir section matériel et méthodes*). Ce système permet la culture des deux types cellulaires en bi-couches séparées par une membrane poreuse (0,4 µm) permettant le passage et la diffusion des sécrétions provenant des cellules de la monocouche supérieure sur les cellules de la monocouche inférieure. Dans notre cas, les adipocytes 3T3-L1 constituent la monocouche inférieure. Les ARN totaux ont été extraits des cellules 3T3-L1 et l'expression des ARNm de CRAMP dans ces cellules a été quantifiée par RT-PCR semi-quantitative et exprimée sous forme de rapport ARNm CRAMP/ARNm β-actine.

Nous avons constaté que le milieu de culture conditionné dans les macrophages U-937 induit l'expression des ARNm de CRAMP dans les adipocytes 3T3-L1. Le taux d'expression des ARNm de CRAMP est 45% plus élevé dans les adipocytes cultivés pendant 24 h en présence du milieu conditionné des macrophages U-937 par rapport au contrôle (**Figure 52**). Nous avons également montré que le taux d'ARNm de CRAMP est 6 fois plus élevé dans les adipocytes 3T3-L1 co-cultivés avec les macrophages U-937 pendant 48 h par comparaison aux cellules 3T3-L1 cultivés séparemment (**Figure 53**). Ces résultats préliminaires suggèrent que des signaux paracrines et des interactions entre adipocytes et macrophages peuvent

réguler l'expression de la cathélicidine CRAMP dans les adipocytes. Il est particulièrement intéressant de déterminer aussi l'effet de telles interactions sur l'expression de LL-37 dans les macrophages et les adipocytes humains.

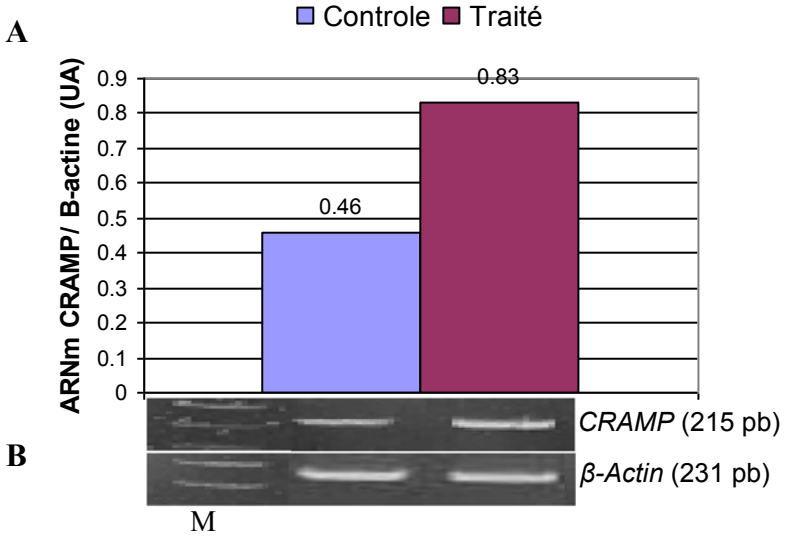


Figure 52 : ***Expression de CRAMP dans les adipocytes 3T3-L1 traités ou non avec le milieu de culture conditionné par les macrophages U-937. Les adipocytes ont été traités pendant 24 h avec le milieu conditionné pendant 24 h par les macrophages U-937 en culture. A) L'expression de CRAMP a été quantifiée par RT-PCR semi-quantitative et exprimée sous forme de rapport ARNm CRAMP/β-actine. B) migration des produits de PCR sur gel de plyacrylamide 10%. M : marqueur de taille.***

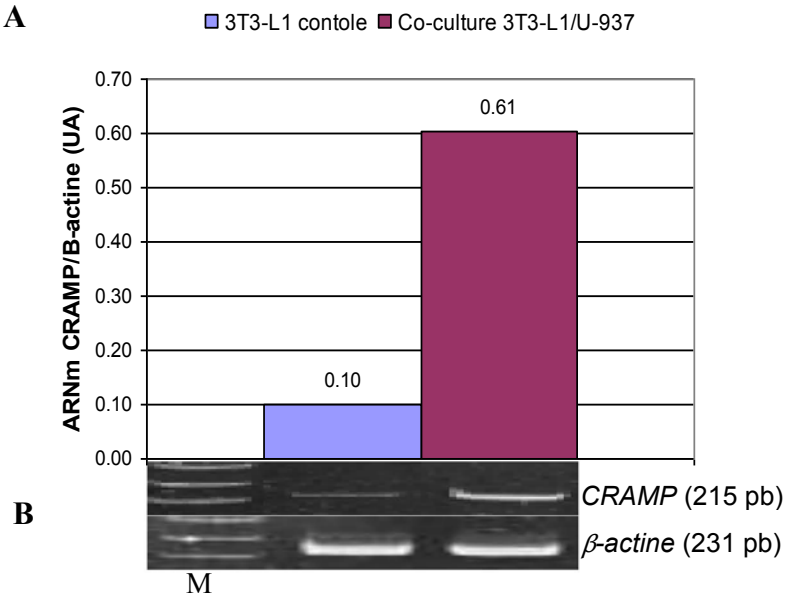


Figure 53 : ***Expression de CRAMP dans les adipocytes 3T3-L1 en co-culture avec les macrophages U-937 ou cultivés séparémment. Co-culture en bi-couches séparées par une membrane poreuse (0,4 µm). Les adipoytes 3T3-L1 constituent la monocouche inférieure. A) L'expression de CRAMP a été quantifiée par RT-PCR semi-quantitaive et exprimée sous forme de rapport ARNm CRAMP/β-actine. B) migration des produits de PCR sur gel de plyacrylamide 10%. M : marqueur de taille.***

III.2.3. Discussion

La lignée cellulaire 3T3-L1 murine est largement utilisée comme modèle pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation hormonale et métabolique, notamment les mécanismes d'adipogénèse (Kasturi et Joshi, 1982 ; Cornelius *et coll.,* 1994). Contrairement aux adipocytes humains, les pré-adipocytes 3T3-L1 d'origine murine sont plus facilement cultivables et surtout ont un pouvoir de différenciation adipocytaire stable (Chae et Kwak, 2003). D'autre part, la cathélicidine murine CRAMP ressemble fortement à la cathélicidine humaine LL-37 (Murakami *et coll.,* 2002). Les domaines antimicrobiens des peptides CRAMP et LL-37 présentent de fortes homologies structurales et des profils d'expression identiques dans certains tissus (Dorschner *et coll.,* 2001). Pour l'ensemble de ces raisons, nous nous sommes intéressés à l'étude d'expression du gène de CRAMP dans les cellules 3T3-L1 afin de mieux comprendre le lien entre l'expression de la cathélicidine LL-37 et les indices d'adiposité (IMC, tour de taille, lipides circulants…), obtenu dans nos études épidémiologiques.

Dans la présente étude, nous avons détecté l'expression des transcrits de la cathélicidine CRAMP dans les pré-adipocytes 3T3-L1 en culture. L'expression de CRAMP a été détectée dans différents tissus notamment dans les cellules immunes et les cellules de l'épithélium intestinal (Gallo *et coll.,* 1997), mais aussi dans des lignées de cellules myéloïdes et de kératinocytes. A notre connaissance, notre étude est la première à mettre en évidence l'expression du gène de CRAMP dans les pré-adipocytes 3T3-L1, suggérant que CRAMP peut avoir de nouvelles fonctions biologiques.

En plus de leur rôle comme site de stockage d'énergie sous forme notamment de triglycérides, les adipocytes sont maintenant reconnus comme un organe endocrine capable de secréter de nombreuses hormones et autres (poly)-peptides actifs dotés de diverses fonctions biologiques (Zhang *et coll.,* 1994 ; Pelleymounter *et coll.,* 1995 ; Goralski *et coll.,* 2007). Néanmoins, des altérations des niveaux d'expression des gènes et de la sécrétion des molécules dérivées des adipocytes, notamment des cytokines inflammatoires, ont été associées au degré d'adiposité *in vivo* (Boden *et coll.,* 1996 ; Cianflone *et coll.,* 2005 ; Roytblat *et coll.,* 2000). Ces altérations constituent probablement un lien entre l'obésité, le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires athérosclérotiques (Wellen et Hotamisligil, 2005 ; Steppan *et coll.,* 2001 ; Xu *et coll.,* 2003). Dans ce contexte, nous avons montré que

l'expression des transcrits de CRAMP est significativement augmentée dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes par comparaison aux cellules 3T3-L1 non différenciées. Ce résultat suggère un effet de l'adipogénèse sur l'expression des cathélicidines. Le processus de conversion des cellules 3T3-L1 en adipocytes s'accompagne de transformations coordonnées dans le métabolisme cellulaire, notamment une augmentation de la synthèse des acides gras et de triglycérides (Kasturi et Joshi, 1982). Il est donc possible de penser que de telles transformations métaboliques pourraient affecter l'expression de CRAMP. En accord avec cette hypothèse, Schauber *et coll.* (2003) ont rapporté l'existence d'une induction de l'expression de la cathélicidine LL-37 par des acides gras à courtes chaînes dans des cellules en culture. De plus, l'induction du gène de CRAMP dans les adipocytes *in vitro* va dans le même sens que nos résultats *in vivo* montrant des corrélations positives entre l'expression des gènes de LL-37 et DEFA1-3 et les indicateurs de l'obésité ainsi que le taux de triglycérides circulants auprès des sujets de la cohorte STANISLAS. Nos résultats sont également en accord avec ceux obtenus par Bekri *et coll.* (2006) qui ont montré que l'expression du polypeptide antimicrobien hepcidine est augmentée au niveau des ARNm et des protéines dans le tissu adipeux des sujets obèses. Nos études, *in vivo* et *in vitro*, suggèrent ainsi de nouveaux mécanismes de régulation des cathélicidines qui pourraient constituer un lien entre l'expression de ces peptides et l'adiposité. La cathélicidine CRAMP pourrait donc être une nouvelle adipokine qui jouerait un rôle dans les fonctions biologiques des tissus adipeux.

De nombreux travaux récents ont montré que des mécanismes de signalisation de l'immunité innée, comme la voie du récepteur TLR-4, constituent un lien entre l'obésité, l'insulino-résistance et l'inflammation vasculaire (Shi *et coll.,* 2006 ; Kim *et coll.,* 2007). Cela suggère l'implication des éléments de l'immunité innée dans le développement du diabète de type 2 et des pathologies vasculaires. Dans ce contexte, nous avons analysé l'éventuel effet du glucose sur l'expression du gène de CRAMP dans les adipocytes 3T3-L1. Nous avons montré une répression de l'expression des ARNm de CRAMP dans les adipocytes 3T3-L1 traités par du glucose. Toutefois, cette diminution d'expression a été restaurée lorsque de l'insuline est ajoutée dans le milieu de culture des adipocytes. En utilisant deux concentrations d'insuline, nous avons observé une augmentation de l'expression des ARNm de CRAMP de manière proportionnelle à la concentration d'insuline. Comme pour les défensines-α dans les neutrophiles HL-60, ces résultats montrent une régulation de l'expression du gène de la cathélicidine CRAMP par le glucose et l'insuline dans les adipocytes, et suggèrent un effet de la signalisation de l'insuline sur l'expression des peptides antimicrobiens. Cependant, à ce

stade nous ne pouvons pas expliquer le mécanisme par lequel le glucose affecterait l'expression de gènes de peptides antimicrobiens et comment l'insuline peut influencer son action.

L'inflammation systémique est associée à l'obésité et à l'insulino-résistance. Les cellules immunes, notamment les macrophages, sont intégrées dans les tissus adipeux et interagissent avec les adipocytes (Weisberg *et coll.,* 2003 ; Curat *et coll.,* 2004). Ces cellules infiltrantes contribuent à l'exacerbation des états inflammatoires associés aux tissus adipeux, la résistance à l'insuline et les complications vasculaires (Xu *et coll.,* 2003). Nous nous sommes donc proposé d'étudier, en plus de la régulation par le glucose et l'insuline, l'effet des interactions entre les cellules immunes (macrophages dérivés des monocytes U-937) et les adipocytes 3T3-L1 sur l'expression des cathélicidines *in vitro*. Nous montrons que le traitement avec le milieu conditionné par les macrophages U-937 provoque une augmentation de l'expression des ARNm de CRAMP dans les adipocytes 3T3-L1. De la même manière, l'expression des ARNm de CRAMP est significativement induite dans les adipocytes 3T3-L1 cultivés en co-culture avec les macrophages U-937 (en utilisant la technique des *transwells*). Bien que les cellules utilisées ne proviennent pas de la même espèce, nos résultats suggèrent que des signaux paracrines et des interactions cellulaires participent à la communication entre les cellules immunes et les adipocytes et conduisent à la régulation de l'expression du gène de la cathélicidine CRAMP. Compte tenu du rôle des cathélicidines dans l'inflammation, ces résultats suggèrent que la cathélicidine CRAMP pourrait participer au processus inflammatoire associé à l'adiposité. En résumé, nos résultats préliminaires permettent de détecter pour la première fois l'expression des cathélicidines dans une lignée d'adipocytes. De plus, nous montrons que cette expression est significativement altérée par des signaux provenant des macrophages U-937. Toutefois, il reste à identifier les signaux et les mécanismes moléculaires responsables de la régulation des cathélicidines dans les adipocytes 3T3-L1. Il est également important de déterminer l'effet de ces interactions cellulaires et des signaux provenant des adipocytes 3T3-L1 sur l'expression de la cathélicidine humaine dans les macrophages U-937 afin d'évaluer le pool des cathélicidines exprimé dans ce système.

Pour conclure, l'ensemble de ces résultats suggère que l'utilisation d'un tel modèle *in vitro* permettrait de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la relation entre les altérations métaboliques et immuno-inflammatoires dans le contexte de l'obésité et ses complications métaboliques cardiovasculaires.

IV. Synthèse

Les peptides antimicrobiens (PAMs), ou peptides cationiques du fait de leurs charges positives, représentent une grande variété de molécules de petite taille qui sont codées par des gènes. Selon leur structure et leur composition en acides aminés, les PAMs peuvent être classés en plusieurs catégories. Deux familles majeures de ces peptides ont été bien caractérisées chez l'Homme : **les défensines et les cathélicidines**. La production de ces peptides dans les cellules épithéliales et leucocytaires augmente en réponse à différents stimuli exogènes (produits microbiens, agressions, …) et/ou endogènes (cytokines pro-inflammatoires : IL-1, IL-8, TNF-α, …).

Les PAMs jouent un rôle clé dans les mécanismes de la première ligne de défense contre les infections, mais aussi dans l'activation des voies de l'immunité adaptative et la modulation des réponses inflammatoires, d'où leur qualification comme des effecteurs multifonctionnels. L'immunité et l'inflammation sont deux processus qui semblent jouer un rôle primordial dans le processus conduisant à l'athérosclérose. Cela suscite l'intérêt majeur de comprendre les fonctions de ces peptides endogènes dans le contexte de la pathologie cardiovasculaire et de vérifier l'hypothèse selon laquelle les PAMs, notamment les défensines et les cathélicidines seraient impliquées dans le développement de l'athérosclérose et pourraient être considérées comme des marqueurs de cette pathologie.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes fixés comme objectifs d'étudier l'expression des gènes des cathélicidines et défensines-α et leurs associations éventuelles avec les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires. Nous avons également utilisé un modèle cellulaire dans une tentative de compréhension du mécanisme par lequel l'expression de ces gènes serait modulée en réponse à des stimuli athérogènes.

Dans la première partie de notre travail, nous avons étudié le profil d'expression quantitative des ARNm des gènes de LL-37 et des défensines-α DEFA1-3 dans les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) par RT-PCR en temps réel. Les PBMCs provenaient de 178 sujets adultes de la cohorte STANISLAS. Nous avons ensuite réalisé des analyses de corrélation entre le niveau d'expression des ARNm de LL-37 et des DEFA1-3 et

les valeurs des indicateurs de l'obésité, la pression artérielle, les taux circulants des lipides et lipoprotéines, du taux de glucose et des indices de l'inflammation.

Nous avons montré que les ARNm de LL-37 sont exprimés dans les PBMCs et que leur taux d'expression est significativement augmenté chez les femmes ayant un IMC > 30 kg/m^2 et considérées obèses. L'expression des ARNm de LL-37 est significativement corrélée avec l'IMC et le tour de taille chez les femmes, et avec le rapport tour de taille/hanches chez les hommes. De plus, le taux d'ARNm de LL-37 est corrélé significativement avec les facteurs de risque cardiovasculaire et du syndrome métabolique indépendamment de l'IMC et le tour de taille chez les hommes uniquement. Ces facteurs incluent la PAS, l'hypo-HDL-C, le taux circulant de glucose, l'activité de l'enzyme TGP et le taux de leucocytes. Nous avons également montré que le taux d'expression des ARNm des DEFA1-3 dans les PBMCs est corrélé significativement avec les indicateurs de l'obésité (IMC, tour de taille et rapport tour de taille/hanches), mais également avec la PAS, le taux de triglycérides, l'hypo-HDL-C et le taux de leucocytes de manière indépendante de l'IMC et du tour de taille dans l'échatillon total.

Une analyse plus approfondie a montré que l'expression des ARNm de LL-37 et de DEFA1-3 est significativement augmentée chez les sujets présentant un diagnostic positif du syndrome métabolique comparés à ceux qui en sont exempts selon les définitions de la NCEP ATPIII et l'IDF. L'ensemble de ces associations laisse suggérer que ces peptides pourraient être impliqués dans les maladies cardiovasculaires et dont le niveau d'expression pourrait différencier entre les sujets avec ou sans syndrome métabolique.

Afin de comprendre le mécanisme par lequel les gènes de LL-37 et des DEFA1-3 seraient impliqués dans les altérations de l'homéostasie métabolique et immuno-inflammatoire qui augmentent le risque du syndrome métabolique et le risque cardiovasculaire, nous avons étudié la relation éventuelle entre l'expression des gènes de LL-37 et des DEFA1-3 et celle du gène du récepteur FPR (*FPR1*) dans les PBMCs des sujets de la cohorte STANISLAS. FPR est un récepteur chimiotactique, qui joue un rôle clé dans les réponses immunes et inflammatoires par la médiation de nombreuses fonctions cellulaires. Il a été montré que les peptides LL-37 et défensines exercent leur fonction chimiotactique *via* des récepteurs de la famille FPRs. Notre étude a montré que l'expression des ARNm de LL-37 et DEFA1-3 est significativement corrélée avec l'expression des ARNm de *FPR1* dans les PBMCs des sujets étudiés. De même, le taux des ARNm du récepteur FPR est également

corrélé positivement avec l'activité de l'enzyme hépatique TGO et la concentration en monocytes.

Des variations génétiques au niveau du gène *FPR1* ont été associées à des altérations fonctionnelles des cellules inflammatoires caractéristiques de pathologies inflammatoires ou infectieuses. Nous avons donc étudié les relations éventuelles entre le polymorphisme *FPR1* c.32C>T/p.I11T et les taux circulants d'un nombre de molécules d'inflammation et d'adhésion cellulaire et testé l'effet éventuel de ce polymorphisme sur l'expression transcriptionnelle des gènes du récepteur FPR et de la cathélicidine LL-37 dans les PBMCs. Nous avons montré que le génotype homozygote rare (TT) du polymorphisme *FPR1 c.32C>T/ p.I11T* est significativement associé à une diminution (68%) du taux circulant de E-sélectine en comparaison avec les sujets porteurs des génotypes hétérozygote (CT) ou homozygote fréquent (CC). Cependant, ce polymorphisme ne semble pas affecter les niveaux d'expression transcriptionnelle ni de FPR ni de LL-37 dans les PBMCs.

Ces résultats suggèrent que les défensines-α et les cathélicidines pourraient être impliquées dans les affections vasculaires *via* le récepteur FPR. Toutefois, d'autres investigations seront nécessaires pour confirmer ces résultats préliminaires.

Dans la troisième partie de ce travail de thèse, et afin de déterminer la nature de la relation entre l'expression des gènes de LL-37 et des DEFA1-3 et les changements des taux circulants des paramètres métaboliques (triglycérides, HDL-C, glucose) et la variabilité des facteurs de risque cardiovasculaire, nous avons procédé à l'étude de la régulation des gènes des défensines-α et des cathélicidines dans des modèles cellulaires. Nous avons testé l'effet de différents stimuli comme l'adipogenèse, les interactions cellulaires entre macrophages et adipocytes, ou les traitements avec le glucose ou/et l'insuline sur l'expression de ces gènes.

Après avoir montré que les ARNm des DEFA1-3 sont exprimés dans les pro-myéloblastes HL-60 différenciées en neutrophiles, nous avons montré que le glucose provoque une diminution significative de l'expression des ARNm des DEFA1-3 dans ces cellules et que cette diminution est restaurée par l'ajout d'insuline dans le milieu de culture. Le traitement des neutrophiles HL-60 par le glucose en présence d'insuline a augmenté significativement l'expression des DEFA1-3 comparé aux cellules cultivées en absence d'insuline. Ces résultats confirment bien la corrélation observée entre l'expression des ARNm des DEFA1-3 dans les PBMCs et la glycémie chez les sujets de la cohorte STANISLAS.

Nous avons mis en évidence pour la première fois l'expression de la cathélicidine CRAMP, l'homologue de la cathélicidine humaine chez la souris, dans une lignée de pré-adipocytes murine 3T3-L1. L'expression des transcrits de CRAMP est significativement induite dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes, suggérant un effet de l'adipogénèse et l'accumulation intracellulaire des lipides sur l'expression des cathélicidines. Nous avons également montré que le glucose provoque une diminution de l'expression des ARNm de CRAMP dans les adipocytes 3T3-L1 et que cette diminution est restaurée par l'ajout d'insuline dans le milieu de culture. De plus, nous avons démontré que l'augmentation de l'expression des ARNm de CRAMP dans les adipocytes 3T3-L1 est proportionnelle à la concentration d'insuline.

Enfin, nous avons testé l'effet de l'interaction entre cellules immunes et adipocytes sur l'expression du gène de CRAMP afin de simuler ce qui se passe *in vivo*. Nous avons montré que le traitement des adipocytes 3T3-L1 avec le milieu conditionné par les macrophages U-937 provoque une augmentation significative de l'expression du gène de CRAMP. De la même manière, l'expression des ARNm de CRAMP est significativement induite dans les adipocytes 3T3-L1 cultivés en co-culture avec les macrophages U-937.

Nos études s'inscrivent dans la recherche d'une meilleure compréhension des fonctions biologiques des peptides antimicrobiens naturels dans le contexte des pathologies multifactorielles à caractère inflammatoire, comme les maladies cardiovasculaires athérosclérotiques. Nos travaux visent également une meilleure compréhension de la physiopathologie des maladies cardiovasculaires et la recherche de nouvelles voies pouvant aboutir à l'identification de nouveaux biomarqueurs ou cibles thérapeutiques.

Une étude bibliographique sur les avancées en génomique et sur les stratégies de thérapies existantes ou émergentes, notamment celles qui visent l'utilisation de molécules naturelles (peptides, protéines,…), pour les maladies cardiovasculaires a donné lieu à une publication (**revue**).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

I. Conclusions

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse montre bien l'existence de nouveaux liens entre le système immunitaire inné et le risque du syndrome métabolique et des maladies cardiovasculaires. Nous montrons également l'intérêt de la combinaison de l'approche épidémiologique et l'approche mécanistique pour la compréhension des mécanismes à l'origine du développement du syndrome métabolique et des maladies cardiovasculaires.

Les études épidémiologiques réalisées sur la cohorte STANISLAS nous ont permis de mettre en évidence des liens potentiels entre l'expression des gènes des LL-37 et des DEFA1-3 (effecteurs multifonctionnels du système immuno-inflammatoire) et les indicateurs et facteurs de risque du syndrome métabolique et de risque cardiovasculaire. Ces études ont également montré l'existence d'une forte corrélation entre l'expression des gènes de LL-37 et des DEFA1-3 et celle du récepteur immuno-inflammatoire FPR. Cela suggère que le récepteur FPR serait un lien entre LL-37 et DEFA1-3 et les facteurs de risque du syndrome métabolique et de maladies cardiovasculaires. De plus, le polymorphisme *FPR1* c32C>T pourrait être associé à la fonction endothéliale vasculaire.

Les résultats préliminaires obtenus des études *in vitro* en utilisant des modèles cellulaires corroborent les associations observées dans la cohorte STANISLAS entre l'expression des gènes de LL-37 et des DEFA1-3 et les facteurs de risque du syndrome métabolique et de maladies cardiovasculaires. Ces résultats suggèrent que l'expression des gènes des défensines-α DEFA1-3 et de la cathélicidine CRAMP est régulée par le glucose et la voie de signalisation d'insuline *in vitro*. Une des originalités de ce travail (*in vitro*) a été la mise en évidence de l'expression du gène de la cathélicidine CRAMP dans une lignée d'adipocytes murins, et de réaliser des co-cultures entre adipocytes et macrophages. Nos résultats suggèrent que l'adipogenèse peut induire l'expression de CRAMP et que des signaux paracrines résultant de l'interaction entre les adipocytes et les cellules inflammatoires pourraient contribuer à la régulation de ce gène. Sur le contexte physiologique, ces interactions pourraient jouer un rôle dans les altérations immuno-inflammatoires et métaboliques de l'obésité et ses complications cardiovasculaires. Nos résultats suggèrent que l'utilisation de tels modèles *in vitro* permettrait de mieux comprendre les interactions métaboliques, endocrines, paracrines et immuno-inflammatoires impliquées dans les mécanismes de la physiopathologie cardiovasculaire.

L'ensemble des données obtenues jusqu'à présent nous encourage désormais à prêter attention aux peptides naturels comme des éventuels marqueurs de certains aspects de l'inflammation et à ouvrir de nouvelles voies de recherche qui permettraient de mieux comprendre les mécanismes du réseau inflammation-métabolisme-athérosclérose. D'autres études seront nécessaires pour confirmer le rôle anti- ou pro-athérogène des peptides antimicrobiens.

II. Perspectives

Dans la continuité de ce travail, plusieurs études peuvent être envisagées :

- N'ayant pas pu réaliser d'études protéomiques dans la population étudiée, il serait intéressant de reproduire les études d'association entre l'expression protéique (dans les PBMCs et dans la circulation) des défensines-α DEFA1-3 et de la cathélicidine LL-37 et les indicateurs et facteurs de risque du syndrome métabolique et des maladies cardiovasculaires dans une population de sujets adultes.

- Reproduire les études d'association entre l'expression transcriptionnelle et protéique de DEFA1-3 et LL-37 et la variabilité des indicateurs et facteurs de risque du syndrome métabolique et cardiovasculaire auprès de populations à risque cardiovasculaire élevé, afin d'évaluer le potentiel prédicteur de ces peptides dans le risque cardiovasculaire.

- Du fait qu'une association ne signifie pas une relation de cause à effet, il est important d'approfondir ces études afin de clarifier la nature de la relation entre les gènes des défensines-α DEFA1-3 et de la cathélicidine LL-37 et le risque du syndrome métabolique et le risque cardiovasculaire. Dans cette optique, il serait intéressant d'approfondir l'étude de la régulation des gènes de LL-37 et DEFA1-3 et les conséquences d'une surexpression de ces gènes :

    i. Etant donné que la cathélicidine de souris est exprimée dans la lignée d'adipocytes 3T3-L1, il est important de vérifier l'expression des gènes de LL-37 et DEFA1-3 dans les adipocytes humains.

    ii. Etudier l'effet des lipides/lipoprotéines sur l'expression de LL-37 et DEFA1-3.

    iii. Etudier la voie de signalisation d'insuline et le métabolisme du glucose sur l'expression de LL-37 et DEFA1-3.

    iv. Etudier l'effet de la surexpression des gènes de LL-37 et DEFA1-3 dans un modèle animal sur les taux circulants de triglycérides, lipoprotéines, glucose et des marqueurs d'inflammation.

- Des polymorphismes des gènes des défensines-β ont été associés au risque d'infection chez des patients diabétiques. Les gènes DEFA1-3 sont également polymorphes. Il serait donc intéressant d'explorer l'effet éventuel des variations génétiques des DEFA1-3 sur l'expression de ces gènes et d'évaluer l'éventuelle relation avec la variabilité des facteurs de risque du syndrome métabolique et des maladies cardiovasculaires.

- Approfondir le lien entre les récepteurs FPRs et les DEFA1-3 et LL-37. L'activation des récepteurs FPRs conduit à la production de médiateurs inflammatoires et des espèces réactives de l'oxygène. Les mécanismes d'oxydo-réduction pourraient être une explication pour l'association des DEFA1-3 et LL-37 avec les facteurs de risque cardiovasculaire (triglycérides, HDL-C, PAS,…).

- Enfin, étudier l'impact des variations génétiques du récepteur FPR sur les fonctions vasculaires, notamment la pression artérielle.

La réalisation de ces études permettrait de mieux comprendre le rôle des éléments du système immunitaire inné, les défensines-α et les cathélicidines, dans les processus biologiques contribuant au développement des maladies cardiovasculaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aarbiou J, Tjabringa GS, Verhoosel RM, Ninaber DK, White SR, Peltenburg LT, Rabe KF, Hiemstra PS. Mechanisms of cell death induced by the neutrophil antimicrobial peptides alpha-defensins and LL-37. Inflamm Res, 2006, 55:119-27

Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, Kogner P, Boman HG, Gudmundsson GH. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92:195-9.

Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, Kiessling R, Jörnvall H, Wigzell H, Gudmundsson GH. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. Blood, 2000 96:3086-93.

Albert NM. Inflammation and infection in acute coronary syndrome. J Cardiovasc Nurs, 2000, 15:13-26.

Alberti KG, Zimmet P, Shaw J; IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. Lancet, 2005, 366:1059-62.

ANAES, Méthode d'évaluation du risque cardio-vasculaire global. 2004, Paris : Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé. 1-102.

Angst E, Reber HA, Hines OJ, Eibl G. Mononuclear cell-derived interleukin-1 beta confers chemoresistance in pancreatic cancer cells by upregulation of cyclooxygenase-2. Surgery, 2008, 144:57-65.

Armitage GC. Periodontal infections and cardiovascular disease--how strong is the association? Oral Dis, 2000, 6:335-50.

Arsenault BJ, Lachance D, Lemieux I, Alméras N, Tremblay A, Bouchard C, Pérusse L, Després JP. Visceral adipose tissue accumulation, cardiorespiratory fitness, and features of the metabolic syndrome. Arch Intern Med, 2007, 167:1518-25.

Arslan E, Atilgan H, Yavaşoğlu I. The prevalence of Helicobacter pylori in obese subjects. Eur J Intern Med, 2009, 20:695-7.

Ayabe T, Wulff H, Darmoul D, Cahalan MD, Chandy KG, Ouellette AJ. Modulation of mouse Paneth cell alpha-defensin secretion by mIKCa1, a Ca2+-activated, intermediate conductance potassium channel. J Biol Chem, 2002, 277:3793-800.

Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. Nat Immunol, 2000, 1:113-8.

Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95:9541-6.

Bandholtz L, Ekman GJ, Vilhelmsson M, Buentke E, Agerberth B, Scheynius A, Gudmundsson GH. Antimicrobial peptide LL-37 internalized by immature human dendritic cells alters their phenotype. Scand J Immunol, 2006, 63:410-9.

Bao L, Gerard NP, Eddy RL Jr, Shows TB, Gerard C. Mapping of genes for the human C5a receptor (C5AR), human FMLP receptor (FPR), and two FMLP receptor homologue orphan receptors (FPRH1, FPRH2) to chromosome 19. Genomics, 1992, 13:437-40.

Barlow PG, Li Y, Wilkinson TS, Bowdish DM, Lau YE, Cosseau C, Haslett C, Simpson AJ, Hancock RE, Davidson DJ. The human cationic host defense peptide LL-37 mediates contrasting effects on apoptotic pathways in different primary cells of the innate immune system. J Leukoc Biol, 2006, 80:509-20.

Barnathan ES, Raghunath PN, Tomaszewski JE, Ganz T, Cines DB, Higazi A al-R. Immunohistochemical localization of defensin in human coronary vessels. Am J Pathol, 1997, 150:1009-20.

Barnea M, Madar Z, Froy O. Glucose and insulin are needed for optimal defensin expression in human cell lines. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 367:452-6.

Baroni A, Donnarumma G, Paoletti I, Longanesi-Cattani I, Bifulco K, Tufano MA, Carriero MV. Antimicrobial human beta-defensin-2 stimulates migration, proliferation and tube formation of human umbilical vein endothelial cells. Peptides, 2009, 30:267-72.

Bdeir K, Cane W, Canziani G, Chaiken I, Weisel J, Koschinsky ML, Lawn RM, Bannerman PG, Sachais BS, Kuo A, Hancock MA, Tomaszewski J, Raghunath PN, Ganz T, Higazi AA, Cines DB. Defensin promotes the binding of lipoprotein(a) to vascular matrix. Blood, 1999, 94:2007-19.

Bechinger B, Zasloff M, Opella S. J. Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. Protein Sci, 1993, 2: 2077-84.

Becker EL, Forouhar FA, Grunnet ML, Boulay F, Tardif M, Bormann BJ, Sodja D, Ye RD, Woska JR Jr, Murphy PM. Broad immunocytochemical localization of the formylpeptide receptor in human organs, tissues, and cells. Cell Tissue Res, 1998, 292:129-35.

Bekri S, Gual P, Anty R, Luciani N, Dahman M, Ramesh B, Iannelli A, Staccini-Myx A, Casanova D, Ben Amor I, Saint-Paul MC, Huet PM, Sadoul JL, Gugenheim J, Srai SK, Tran A, Le Marchand-Brustel Y. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. Gastroenterology, 2006, 131:788-96.

Benachour H, Zaiou M, Samara A, Herbeth B, Pfister M, Lambert D, Siest G, Visvikis-Siest S. Association of human cathelicidin (hCAP-18/LL-37) gene expression with cardiovascular disease risk factors. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2009, 19:720-8.

Berkestedt I, Nelson A, Bodelsson M. Endogenous antimicrobial peptide LL-37 induces human vasodilatation. Br J Anaesth, 2008, 100:803-9.

Bernard C, Merval R, Esposito B, Tedgui A. Resistance to endotoxin shock in spontaneously hypertensive rats. Hypertension, 1998, 31:1350-6.

Betten A, Bylund J, Christophe T, Boulay F, Romero A, Hellstrand K, Dahlgren C. A proinflammatory peptide from Helicobacter pylori activates monocytes to induce lymphocyte dysfunction and apoptosis. J Clin Invest, 2001, 108:1221-8.

Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. J Clin Invest, 1993, 91:379-87.

Bevins CL. The Paneth cell and the innate immune response. Curr Opin Gastroenterol, 2004, 20:572-80.

Bhattacharya M, Wang J, Ribeiro FM, Dixon SJ, Feldman RD, Hegele RA, Ferguson SS. Analysis of a missense variant of the human N-formyl peptide receptor that is associated with agonist-independent beta-arrestin association and indices of inflammation. Pharmacogenomics J, 2007, 7:190-9.

Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. J Clin Endocrinol Metab, 1996, 81:3419-23.

Boman HG. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. J Intern Med, 2003, 254:197-215.

Boulay F, Tardif M, Brouchon L, Vignais P. The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. Biochemistry, 1990a, 29:11123-33.

Boulay F, Tardif M, Brouchon L, Vignais P. Synthesis and use of a novel N-formyl peptide derivative to isolate a human N-formyl peptide receptor cDNA. Biochem Biophys Res Commun, 1990b, 168:1103-9.

Bowdish DM, Davidson DJ, Scott MG, Hancock RE. Immunomodulatory activities of small host defense peptides. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49:1727-32.

Bowdish DM, Davidson DJ, Speert DP, Hancock RE. The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes. J Immunol, 2004, 172:3758-65.

Braff MH, Bardan A, Nizet V, Gallo RL. Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. J Invest Dermatol, 2005, 125:9-13.

Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nat Rev Microbiol, 2005, 3:238-50.

Bulet P, Stöcklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. Immunol Rev, 2004, 198:169-84.

Bullard RS, Gibson W, Bose SK, Belgrave JK, Eaddy AC, Wright CJ, Hazen-Martin DJ, Lage JM, Keane TE, Ganz TA, Donald CD. Functional analysis of the host defense peptide Human Beta Defensin-1: new insight into its potential role in cancer. Mol Immunol, 2008, 45:839-48.

Bylund J, Christophe T, Boulay F, Nyström T, Karlsson A, Dahlgren C. Proinflammatory activity of a cecropin-like antibacterial peptide from Helicobacter pylori. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45:1700-4.

Cameron AJ, Boyko EJ, Sicree RA, Zimmet PZ, Söderberg S, Alberti KG, Tuomilehto J, Chitson P, Shaw JE. Central obesity as a precursor to the metabolic syndrome in the AusDiab study and Mauritius. Obesity (Silver Spring), 2008, 16:2707-16.

Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. Blood, 1994, 84:2068-101.

Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. Nat Med, 2003, 9:653-60.

Carretero M, Escámez MJ, García M, Duarte B, Holguín A, Retamosa L, Jorcano JL, Río MD, Larcher F. In vitro and in vivo wound healing-promoting activities of human cathelicidin LL-37. J Invest Dermatol, 2008, 128:223-36.

Cederberg A, Enerbäck S. Insulin resistance and type 2 diabetes--an adipocentric view. Curr Mol Med, 2003, 3:107-25.

Chae GN, Kwak SJ. NF-kappaB is involved in the TNF-alpha induced inhibition of the differentiation of 3T3-L1 cells by reducing PPARgamma expression. Exp Mol Med, 2003, 35:431-7.

Chalifour A, Jeannin P, Gauchat JF, Blaecke A, Malissard M, N'Guyen T, Thieblemont N, Delneste Y. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. Blood, 2004, 104:1778-83.

Chaly YV, Paleolog EM, Kolesnikova TS, Tikhonov II, Petratchenko EV, Voitenok NN. Neutrophil alpha-defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells. Eur Cytokine Netw, 2000, 11:257-66.

Chavakis T, Cines DB, Rhee JS, Liang OD, Schubert U, Hammes HP, Higazi AA, Nawroth PP, Preissner KT, Bdeir K. Regulation of neovascularization by human neutrophil peptides (alpha-defensins): a link between inflammation and angiogenesis. FASEB J, 2004, 18:1306-8.

Chen H, Xu Z, Peng L, Fang X, Yin X, Xu N, Cen P. Recent advances in the research and development of human defensins. Peptides, 2006, 27:931-40.

Chertov O, Michiel DF, Xu L, Wang JM, Tani K, Murphy WJ, Longo DL, Taub DD, Oppenheim JJ. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. J Biol Chem, 1996, 271:2935-40.

Choi BH, Ahn IS, Kim YH, Park JW, Lee SY, Hyun CK, Do MS. Berberine reduces the expression of adipogenic enzymes and inflammatory molecules of 3T3-L1 adipocyte. Exp Mol Med, 2006, 38:599-605.

Christophe T, Karlsson A, Dugave C, Rabiet MJ, Boulay F, Dahlgren C. The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH2 specifically activates neutrophils through FPRL1/lipoxin A4 receptors and is an agonist for the orphan monocyte-expressed chemoattractant receptor FPRL2. J Biol Chem, 2001, 276:21585-93.

Cianflone K, Lu H, Smith J, Yu W, Wang H. Adiponectin, acylation stimulating protein and complement C3 are altered in obesity in very young children. Clin Endocrinol (Oxf), 2005, 62:567-72.

Ciornei CD, Tapper H, Bjartell A, Sternby NH, Bodelsson M. Human antimicrobial peptide LL-37 is present in atherosclerotic plaques and induces death of vascular smooth muscle cells: a laboratory study. BMC Cardiovasc Disord, 2006, 6:49.

Ciornei CD, Egesten A, Bodelsson M. Effects of human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release from rat aorta in vitro. Acta Anaesthesiol Scand, 2003, 47:213-20.

Coburn RF, Labelle EF, Baron CB. Polyamines, PI(4,5)P2, and actin polymerization. J Cell Physiol, 2006, 209:405-12.

Coffelt SB, Tomchuck SL, Zwezdaryk KJ, Danka ES, Scandurro AB. Leucine leucine-37 uses formyl peptide receptor-like 1 to activate signal transduction pathways, stimulate oncogenic gene expression, and enhance the invasiveness of ovarian cancer cells. Mol Cancer Res, 2009a, 7:907-15.

Coffelt SB, Marini FC, Watson K, Zwezdaryk KJ, Dembinski JL, LaMarca HL, Tomchuck SL, Honer zu Bentrup K, Danka ES, Henkle SL, Scandurro AB. The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009b, 106:3806-11.

Coffelt SB, Waterman RS, Florez L, Höner zu Bentrup K, Zwezdaryk KJ, Tomchuck SL, LaMarca HL, Danka ES, Morris CA, Scandurro AB. Ovarian cancers overexpress the antimicrobial protein hCAP-18 and its derivative LL-37 increases ovarian cancer cell proliferation and invasion. Int J Cancer, 2008, 122:1030-9.

Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A, Manson JE. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. Ann Intern Med, 1995, 122:481-6.

Cole AM, Hong T, Boo LM, Nguyen T, Zhao C, Bristol G, Zack JA, Waring AJ, Yang OO, Lehrer RI. Retrocyclin: a primate peptide that protects cells from infection by T- and M-tropic strains of HIV-1. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99:1813-8.

Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978, 75:2458-62.

Combet C, Blanchet C, Geourjon C, Deléage G. NPS@: network protein sequence analysis. Trends Biochem Sci, 2000, 25:147-50.

Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD. Regulation of adipocyte development. Annu Rev Nutr, 1994,14:99-129.

Cowland JB, Johnsen AH, Borregaard N. hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. FEBS Lett, 1995, 368:173-6.

Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher M, Da Silva NF, Khanolkar M, Evans M, Harte AL, Kumar S. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007, 292:E740-7.

Cui Y, Le Y, Yazawa H, Gong W, Wang JM. Potential role of the formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) in inflammatory aspects of Alzheimer's disease. J Leukoc Biol, 2002, 72:628-35.

Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, Bouloumié A. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. Diabetes, 2004, 53:1285-92.

Daher KA, Lehrer RI, Ganz T, Kronenberg M. Isolation and characterization of human defensin cDNA clones. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988, 85:7327-31.

De Smet K, Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. Biotechnol Lett, 2005, 27:1337-47.

De Yang, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ, Chertov O. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. J Exp Med, 2000, 192:1069-74.

Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. Nature, 2006, 444:881-7.

Després JP. Dyslipidaemia and obesity. Baillieres Clin Endocrinol Metab, 1994, 8:629-60.

Després JP, Moorjani S, Ferland M, Tremblay A, Lupien PJ, Nadeau A, Pinault S, Thériault G, Bouchard C. Adipose tissue distribution and plasma lipoprotein levels in obese women. Importance of intra-abdominal fat. Arteriosclerosis, 1989, 9:203-10.

Dixit VD. Adipose-immune interactions during obesity and caloric restriction: reciprocal mechanisms regulating immunity and health span. J Leukoc Biol, 2008, 84:882-92.

Dixon JB, O'Brien PE. Obesity and the white blood cell count: changes with sustained weight loss. Obes Surg, 2006, 16:251-7.

Donald CD, Sun CQ, Lim SD, Macoska J, Cohen C, Amin MB, Young AN, Ganz TA, Marshall FF, Petros JA. Cancer-specific loss of beta-defensin 1 in renal and prostatic carcinomas. Lab Invest, 2003, 83:501-5.

Dorschner RA, Pestonjamasp VK, Tamakuwala S, Ohtake T, Rudisill J, Nizet V, Agerberth B, Gudmundsson GH, Gallo RL. Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A Streptococcus. J Invest Dermatol, 2001, 117:91-7.

Duits LA, Ravensbergen B, Rademaker M, Hiemstra PS, Nibbering PH. Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. Immunology, 2002, 106:517-25.

Dzielak DJ. The immune system and hypertension. Hypertension, 1992, 19:I36-44.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. Lancet, 2005, 365:1415-28.

Edfeldt K, Agerberth B, Rottenberg ME, Gudmundsson GH, Wang XB, Mandal K, Xu Q, Yan ZQ. Involvement of the antimicrobial peptide LL-37 in human atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26:1551-7.

Edgerton M, Koshlukova SE, Lo TE, Chrzan BG, Straubinger RM, Raj PA. Candidacidal activity of salivary histatins. Identification of a histatin 5-binding protein on Candida albicans. J Biol Chem, 1998, 273:20438-47.

Elloumi HZ, Holland SM. Complex regulation of human cathelicidin gene expression: novel splice variants and 5'UTR negative regulatory element. Mol Immunol, 2008, 45:204-17.

Elssner A, Duncan M, Gavrilin M, Wewers MD. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. J Immunol, 2004, 172:4987-94.

Engström G, Hedblad B, Stavenow L, Lind P, Janzon L, Lindgärde F. Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with future weight gain. Diabetes, 2003, 52:2097-101.

Epand RM, Vogel HJ. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. Biochim Biophys Acta, 1999, 1462:11-28.

Erdag G, Morgan JR. Interleukin-1alpha and interleukin-6 enhance the antibacterial properties of cultured composite keratinocyte grafts. Ann Surg, 2002, 235:113-24.

Fang XM, Shu Q, Chen QX, Book M, Sahl HG, Hoeft A, Stuber F. Differential expression of alpha- and beta-defensins in human peripheral blood. Eur J Clin Invest, 2003, 33:82-7.

Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, Schmalzl H, Wehkamp J, Bevins CL, Reinisch W, Teml A, Schwab M, Lichter P, Radlwimmer B, Stange EF. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. Am J Hum Genet, 2006, 79:439-48.

Fernández-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. Endocr Rev, 2003, 24:278-301.

Festa A, D'Agostino R Jr, Howard G, Mykkänen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). Circulation, 2000, 102:42-7.

Fiore S, Maddox JF, Perez HD, Serhan CN. Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor. J Exp Med, 1994, 180:253-60.

Fischkoff SA, Condon ME. Switch in differentiative response to maturation inducers of human promyelocytic leukemia cells by prior exposure to alkaline conditions. Cancer Res, 1985, 45:2065-9.

Fontana L, Eagon JC, Colonna M, Klein S. Impaired mononuclear cell immune function in extreme obesity is corrected by weight loss. Rejuvenation Res, 2007, 10:41-6.

Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Stâhle-Bäckdahl M, Lidén S, Wigzell H, Gudmundsson GH. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. J Biol Chem, 1997, 272:15258-63.

Froidevaux R, Krier F, Nedjar-Arroume N, Vercaigne-Marko D, Kosciarz E, Ruckebusch C, Dhulster P, Guillochon D. Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. FEBS Lett, 2001, 491:159-63.

Froy O, Hananel A, Chapnik N, Madar Z. Differential effect of insulin treatment on decreased levels of beta-defensins and Toll-like receptors in diabetic rats. Mol Immunol, 2007, 44:796-802.

Gallo RL, Kim KJ, Bernfield M, Kozak CA, Zanetti M, Merluzzi L, Gennaro R. Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. J Biol Chem, 1997, 272:13088-93.

Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nat Rev Immunol, 2003, 3:710-20.

Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI. Defensins. Eur J Haematol, 1990, 44:1-8.

Gao JL, Lee EJ, Murphy PM. Impaired antibacterial host defense in mice lacking the N-formylpeptide receptor. J Exp Med, 1999, 189:657-62.

Gao Y, Zhou Y, Xu A, Wu D. Effects of an AMP-activated protein kinase inhibitor, compound C, on adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. Biol Pharm Bull, 2008, 31:1716-22.

Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. Circulation, 2004, 110:1564-71.

Ghosh D, Porter E, Shen B, Lee SK, Wilk D, Drazba J, Yadav SP, Crabb JW, Ganz T, Bevins CL. Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. Nat Immunol, 2002, 3:583-90.

Girolomoni G, Gisondi P. Psoriasis and systemic inflammation: underdiagnosed enthesopathy. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2009, 23 Suppl 1:3-8.

Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, Muruganandan S, Sinal CJ. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. J Biol Chem, 2007, 282:28175-88.

Gough M, Hancock RE, Kelly NM. Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. Infect Immun, 1996, 64:4922-7.

Goumon Y, Lugardon K, Kieffer B, Lefevre J. F, Van Dorsselaer A, Aunis D, Metz-Boutigue M. H. Characterization of antibacterial COOH-terminal proenkephalin-Aderived peptides (PEAP) in infectious fluids. Importance of enkelytin, the antibacterial PEAP209-237 secreted by stimulated chromaffin cells. J Biol Chem, 1998, 273: 29847-56

Greaves DR, Channon KM. Inflammation and immune responses in atherosclerosis. Trends Immunol, 2002, 23:535-41.

Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. Cell, 1975, 5:19-27.

Grigat J, Soruri A, Forssmann U, Riggert J, Zwirner J. Chemoattraction of macrophages, T lymphocytes, and mast cells is evolutionarily conserved within the human alpha-defensin family. J Immunol, 2007, 179:3958-65.

Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. Circulation, 2004, 109:433-8.

Gubern C, López-Bermejo A, Biarnés J, Vendrell J, Ricart W, Fernández-Real JM. Natural antibiotics and insulin sensitivity: the role of bactericidal/permeability-increasing protein. Diabetes, 2006, 55:216-24.

Gudmundsson GH and Agerberth B. Biology and expression of the human cathelicidin LL-37. In Mammalian Antimicrobial Peptides ed Devine DA and Hancock REW. Cambridge, Cambridge University Press, 2004: 139-160

Gudmundsson GH, Agerberth B. Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. J Immunol Methods, 1999, 232:45-54.

Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. Eur J Biochem, 1996, 238:325-32.

Gwinn MR, Sharma A, De Nardin E. Single nucleotide polymorphisms of the N-formyl peptide receptor in localized juvenile periodontitis. J Periodontol, 1999, 70:1194-201.

Haffner S, Taegtmeyer H. Epidemic obesity and the metabolic syndrome. Circulation, 2003, 108:1541-5.

Hak AE, Pols HA, Stehouwer CD, Meijer J, Kiliaan AJ, Hofman A, Breteler MM, Witteman JC. Markers of inflammation and cellular adhesion molecules in relation to insulin resistance in nondiabetic elderly: the Rotterdam study. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86:4398-405.

Hall JE. The kidney, hypertension, and obesity. Hypertension, 2003, 41:625-33.

Hancock RE. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. Lancet Infect Dis, 2001, 1:156-64.

Hancock RE, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. Trends Microbiol, 2000, 8:402-10.

Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. Nat Rev Immunol, 2006a, 6:508-19.

Hansson GK, Robertson AK, Söderberg-Nauclér C. Inflammation and atherosclerosis. Annu Rev Pathol, 2006b, 1:297-329.

Hansson GK, Jonasson L, Seifert PS, Stemme S. Immune mechanisms in atherosclerosis. Arteriosclerosis, 1989, 9:567-78

Harder J, Meyer-Hoffert U, Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schröder JM. Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. J Invest Dermatol, 2004, 123:522-9.

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta - defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. J Biol Chem, 2001, 276:5707-13.

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. A peptide antibiotic from human skin. Nature, 1997, 387:861.

Heilborn JD, Nilsson MF, Jimenez CI, Sandstedt B, Borregaard N, Tham E, Sørensen OE, Weber G, Ståhle M. Antimicrobial protein hCAP18/LL-37 is highly expressed in breast cancer and is a putative growth factor for epithelial cells. Int J Cancer, 2005, 114:713-9.

Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, Weber G, Sørensen O, Borregaard N, Ståhle-Bäckdahl M. The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. J Invest Dermatol, 2003, 120:379-89.

Hellström L, Wahrenberg H, Hruska K, Reynisdottir S, Arner P. Mechanisms behind gender differences in circulating leptin levels. J Intern Med, 2000, 247:457-62.

Herwig S, Su Q, Zhang W, Ma Y, Tempst P. Distinct temporal patterns of defensin mRNA regulation during drug-induced differentiation of human myeloid leukemia cells. Blood, 1996, 87:350-64.

Higazi AA, Nassar T, Ganz T, Rader DJ, Udassin R, Bdeir K, Hiss E, Sachais BS, Williams KJ, Leitersdorf E, Cines DB. The alpha-defensins stimulate proteoglycan-dependent catabolism of low-density lipoprotein by vascular cells: a new class of inflammatory apolipoprotein and a possible contributor to atherogenesis. Blood, 2000, 96:1393-8.

Higazi AA, Lavi E, Bdeir K, Ulrich AM, Jamieson DG, Rader DJ, Usher DC, Kane W, Ganz T, Cines DB. Defensin stimulates the binding of lipoprotein (a) to human vascular endothelial and smooth muscle cells. Blood, 1997, 89:4290-8.

Higazi AA, Ganz T, Kariko K, Cines DB. Defensin modulates tissue-type plasminogen activator and plasminogen binding to fibrin and endothelial cells. J Biol Chem, 1996, 271:17650-5.

Hill LV, Tan MH, Pereira LH, Embil JA. Association of oral candidiasis with diabetic control. J Clin Pathol, 1989, 42:502-5.

Hingorani AD, Cross J, Kharbanda RK, Mullen MJ, Bhagat K, Taylor M, Donald AE, Palacios M, Griffin GE, Deanfield JE, MacAllister RJ, Vallance P. Acute systemic inflammation impairs endothelium-dependent dilatation in humans. Circulation, 2000, 102:994-9.

Hiratsuka T, Nakazato M, Date Y, Mukae H, Matsukura S. Nucleotide sequence and expression of rat beta-defensin-1: its significance in diabetic rodent models. Nephron, 2001, 88:65-70.

Hoffman M, Blum A, Baruch R, Kaplan E, Benjamin M. Leukocytes and coronary heart disease. Atherosclerosis, 2004, 172:1-6.

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science, 1999, 284:1313-8.

Horne BD, Anderson JL, John JM, Weaver A, Bair TL, Jensen KR, Renlund DG, Muhlestein JB; Intermountain Heart Collaborative Study Group. Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk? J Am Coll Cardiol, 2005, 45:1638-43.

Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. Nature, 2006, 444:860-7.

Howell MD, Novak N, Bieber T, Pastore S, Girolomoni G, Boguniewicz M, Streib J, Wong C, Gallo RL, Leung DY. Interleukin-10 downregulates anti-microbial peptide expression in atopic dermatitis. J Invest Dermatol. 2005 Oct;125(4):738-45. Erratum in: J Invest Dermatol, 2005, 125:1320.

Hung J, McQuillan BM, Chapman CM, Thompson PL, Beilby JP. Elevated interleukin-18 levels are associated with the metabolic syndrome independent of obesity and insulin resistance. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25:1268-73.

Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. Int J Cancer, 2007, 121:2373-80.

Iaccio A, Cattaneo F, Mauro M, Ammendola R. FPRL1-mediated induction of superoxide in LL-37-stimulated IMR90 human fibroblast. Arch Biochem Biophys, 2009, 481:94-100.

Illouz F, Roulier V, Rod A, Gallois Y, Pellé CP, Aubé C, Rohmer V, Ritz P, Ducluzeau PH. Distribution of adipose tissue: quantification and relationship with hepatic steatosis and vascular profiles of type 2 diabetic patients with metabolic syndrome. Diabetes Metab, 2008, 34:68-74.

International Diabetes Federation. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. Brussels: IDF, 2005. http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Metasyndrome_definition.pdf

Iribarren P, Zhou Y, Hu J, Le Y, Wang JM. Role of formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1/FPR2) in mononuclear phagocyte responses in Alzheimer disease. Immunol Res, 2005, 31:165-76.

Izadpanah A, Gallo RL. Antimicrobial peptides. J Am Acad Dermatol, 2005, 52:381-90, quiz 391-2.

Jonard L, Banh L, Pressac M, Just J, Bahuaua M. Defensins in human health and disease. Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, 2006, 21:342-347

Jones BE, Miettinen HM, Jesaitis AJ, Mills JS. Mutations of F110 and C126 of the formyl peptide receptor interfere with G-protein coupling and chemotaxis. J Periodontol, 2003, 74:475-84.

Jones DE, Bevins CL. Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. FEBS Lett, 1993, 315:187-92.

Jones DE, Bevins CL. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. J Biol Chem, 1992, 267:23216-25.

Joseph G, Tarnow L, Astrup AS, Hansen TK, Parving HH, Flyvbjerg A, Frystyk J. Plasma alpha-defensin is associated with cardiovascular morbidity and mortality in type 1 diabetic patients. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93:1470-5.

Jurevic RJ, Bai M, Chadwick RB, White TC, Dale BA. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in human beta-defensin 1: high-throughput SNP assays and association with Candida carriage in type I diabetics and nondiabetic controls. J Clin Microbiol, 2003, 41:90-6.

Kai-Larsen Y, Agerberth B. The role of the multifunctional peptide LL-37 in host defense. Front Biosci, 2008, 13:3760-7.

Kasturi R, Joshi VC. Hormonal regulation of stearoyl coenzyme A desaturase activity and lipogenesis during adipose conversion of 3T3-L1 cells. J Biol Chem, 1982, 257:12224-30.

Khraibi AA. Association between disturbances in the immune system and hypertension. Am J Hypertens, 1991, 4:635-41.

Kim HH, Sik Bang S, Seok Choi J, Han H, Kim IH. Involvement of PKC and ROS in the cytotoxic mechanism of anti-leukemic decursin and its derivatives and their structure-activity relationship in human K562 erythroleukemia and U937 myeloleukemia cells. Cancer Lett, 2005, 223:191-201.

Kim F, Pham M, Luttrell I, Bannerman DD, Tupper J, Thaler J, Hawn TR, Raines EW, Schwartz MW. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. Circ Res, 2007, 100:1589-96.

Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P, Barth TF, Dragun D, Skurk T, Hauner H, Blüher M, Unger T, Wolf AM, Knippschild U, Hombach V, Marx N. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28:1304-10.

Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G, Flavell RA. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. Science, 2005, 307:731-4.

Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krötz F, Zahler S, Gloe T, Issbrücker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Karl A, Raake P, Pfosser A, Boekstegers P, Welsch U, Hiemstra PS, Vogelmeier C, Gallo RL, Clauss M, Bals R. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. J Clin Invest, 2003, 111:1665-72.

Kolls JK, McCray PB Jr, Chan YR. Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. Nat Rev Immunol, 2008, 8:829-35.

Kougias P, Chai H, Lin PH, Yao Q, Lumsden AB, Chen C. Neutrophil antimicrobial peptide alpha-defensin causes endothelial dysfunction in porcine coronary arteries. J Vasc Surg, 2006, 43:357-63.

Kougias P, Chai H, Lin PH, Yao Q, Lumsden AB, Chen C. Defensins and cathelicidins: neutrophil peptides with roles in inflammation, hyperlipidemia and atherosclerosis. J Cell Mol Med, 2005, 9:3-10.

Kurosaka K, Chen Q, Yarovinsky F, Oppenheim JJ, Yang D. Mouse cathelin-related antimicrobial peptide chemoattracts leukocytes using formyl peptide receptor-like 1/mouse formyl peptide receptor-like 2 as the receptor and acts as an immune adjuvant. J Immunol, 2005, 174:6257-65.

Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. Trends Immunol, 2009, 30:131-41.

Larrick JW, Fischer DG, Anderson SJ, Koren HS. Characterization of a human macrophage-like cell line stimulated in vitro: a model of macrophage functions. J Immunol, 1980, 125:6-12.

Lau YE, Bowdish DM, Cosseau C, Hancock RE, Davidson DJ. Apoptosis of airway epithelial cells: human serum sensitive induction by the cathelicidin LL-37. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006, 34:399-409.

Le Y, Yang Y, Cui Y, Yazawa H, Gong W, Qiu C, Wang JM. Receptors for chemotactic formyl peptides as pharmacological targets. Int Immunopharmacol, 2002, 2:1-13.

Le Y, Gong W, Tiffany HL, Tumanov A, Nedospasov S, Shen W, Dunlop NM, Gao JL, Murphy PM, Oppenheim JJ, Wang JM. Amyloid (beta)42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1. J Neurosci, 2001, 21:RC123.

Ley K, Allietta M, Bullard DC, Morgan S. Importance of E-selectin for firm leukocyte adhesion in vivo. Circ Res, 1998, 83:287-94.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Nature, 2002, 420:868-74.

Linder K, Arner P, Flores-Morales A, Tollet-Egnell P, Norstedt G. Differentially expressed genes in visceral or subcutaneous adipose tissue of obese men and women. J Lipid Res, 2004, 45:148-54.

Linzmeier R, Michaelson D, Liu L, Ganz T. The structure of neutrophil defensin genes. FEBS Lett, 1993, 321:267-73. Erratum in: FEBS Lett, 1993, 326:299-300.

Linzmeier RM, Ganz T. Human defensin gene copy number polymorphisms: comprehensive analysis of independent variation in alpha- and beta-defensin regions at 8p22-p23. Genomics, 2005, 86:423-30.

Liu L, Roberts AA, Ganz T. By IL-1 signaling, monocyte-derived cells dramatically enhance the epidermal antimicrobial response to lipopolysaccharide. J Immunol, 2003, 170:575-80.

López-Bermejo A, Chico-Julià B, Castro A, Recasens M, Esteve E, Biarnés J, Casamitjana R, Ricart W, Fernández-Real JM. Alpha defensins 1, 2, and 3: potential roles in dyslipidemia and vascular dysfunction in humans. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27:1166-71.

Malik AN, Al-Kafaji G. Glucose regulation of beta-defensin-1 mRNA in human renal cells. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 353:318-23.

Malm J, Sørensen O, Persson T, Frohm-Nilsson M, Johansson B, Bjartell A, Lilja H, Ståhle-Bäckdahl M, Borregaard N, Egesten A. The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. Infect Immun, 2000, 68:4297-302.

Manco M, Fernandez-Real JM, Equitani F, Vendrell J, Valera Mora ME, Nanni G, Tondolo V, Calvani M, Ricart W, Castagneto M, Mingrone G. Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92:483-90.

Mars WM, Patmasiriwat P, Maity T, Huff V, Weil MM, Saunders GF. Inheritance of unequal numbers of the genes encoding the human neutrophil defensins HP-1 and HP-3. J Biol Chem, 1995, 270:30371-6.

Marteau JB, Mohr S, Pfister M, Visvikis-Siest S. Collection and storage of human blood cells for mRNA expression profiling: a 15-month stability study. Clin Chem, 2005, 51:1250-2.

Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. Biochim Biophys Acta, 1999, 1462:1-10.

McCoy R, Haviland DL, Molmenti EP, Ziambaras T, Wetsel RA, Perlmutter DH. N-formylpeptide and complement C5a receptors are expressed in liver cells and mediate hepatic acute phase gene regulation. J Exp Med, 1995, 182:207-17.

McDonald V, Pollok RC, Dhaliwal W, Naik S, Farthing MJ, Bajaj-Elliott M. A potential role for interleukin-18 in inhibition of the development of Cryptosporidium parvum. Clin Exp Immunol, 2006, 145:555-62.

McMeekin SR, Dransfield I, Rossi AG, Haslett C, Walker TR. E-selectin permits communication between PAF receptors and TRPC channels in human neutrophils. Blood, 2006, 107:4938-45.

Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. Immunol Rev, 2000, 173:89-97.

Mehta JL, Saldeen TG, Rand K. Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease. J Am Coll Cardiol, 1998, 31:1217-25.

Migeotte I, Communi D, Parmentier M. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. Cytokine Growth Factor Rev, 2006, 17:501-19.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res, 1988 , 16:1215.

Mohler ER, Sarov-Blat L, Shi Y, Hamamdzic D, Zalewski A, Macphee C, Llano R, Pelchovitz D, Mainigi SK, Osman H, Hallman T, Steplewski K, Gertz Z, Lu MM, Wilensky RL. Site-specific atherogenic gene expression correlates with subsequent variable lesion development in coronary and peripheral vasculature. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28:850-5.

Mohri Y, Mohri T, Wei W, Qi YJ, Martin A, Miki C, Kusunoki M, Ward DG, Johnson PJ. Identification of macrophage migration inhibitory factor and human neutrophil peptides 1-3 as potential biomarkers for gastric cancer. Br J Cancer, 2009, 101:295-302.

Mohàcsi A, Kozlovszky B, Kiss I, Seres I, Fülöp T Jr. Neutrophils obtained from obliterative atherosclerotic patients exhibit enhanced resting respiratory burst and increased degranulation in response to various stimuli. Biochim Biophys Acta, 1996, 1316:210-6.

Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DM, Doria S, Falsafi R, Hokamp K, Roche FM, Mu R, Doho GH, Pistolic J, Powers JP, Bryan J, Brinkman FS, Hancock RE. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. J Immunol, 2006, 176:2455-64.

Moreno PR, Purushothaman KR, Sirol M, Levy AP, Fuster V. Neovascularization in human atherosclerosis. Circulation, 2006, 113:2245-52.

Murakami M, Lopez-Garcia B, Braff M, Dorschner RA, Gallo RL. Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense. J Immunol, 2004, 172:3070-7.

Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, Gallo RL. Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. J Dent Res, 2002, 81:845-50.

Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. Annu Rev Immunol, 1994, 12:593-633.

Murphy PM, Ozçelik T, Kenney RT, Tiffany HL, McDermott D, Francke U. A structural homologue of the N-formyl peptide receptor. Characterization and chromosome mapping of a peptide chemoattractant receptor family. J Biol Chem, 1992, 267:7637-43.

Müller CA, Markovic-Lipkovski J, Klatt T, Gamper J, Schwarz G, Beck H, Deeg M, Kalbacher H, Widmann S, Wessels JT, Becker V, Müller GA, Flad T. Human alpha-defensins HNPs-1, -2, and -3 in renal cell carcinoma: influences on tumor cell proliferation. Am J Pathol, 2002, 160:1311-24.

Nagaoka I, Niyonsaba F, Tsutsumi-Ishii Y, Tamura H, Hirata M. Evaluation of the effect of human beta-defensins on neutrophil apoptosis. Int Immunol, 2008, 20:543-53.

Nagaoka I, Tamura H, Hirata M. An antimicrobial cathelicidin peptide, human CAP18/LL-37, suppresses neutrophil apoptosis via the activation of formyl-peptide receptor-like 1 and P2X7. J Immunol, 2006, 176:3044-52.

Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. J Clin Invest, 1997, 100:2680-90.

Nassar H, Lavi E, Akkawi S, Bdeir K, Heyman SN, Raghunath PN, Tomaszewski J, Higazi AA. alpha-Defensin: link between inflammation and atherosclerosis. Atherosclerosis, 2007, 194:452-7.

Nassar T, Akkawi S, Shina A, Haj-Yehia A, Bdeir K, Tarshis M, Heyman SN, Higazi AA. In vitro and in vivo effects of tPA and PAI-1 on blood vessel tone. Blood, 2004, 103:897-902.

Nassar T, Akkawi S, Bar-Shavit R, Haj-Yehia A, Bdeir K, Al-Mehdi AB, Tarshis M, Higazi AA. Human alpha-defensin regulates smooth muscle cell contraction: a role for low-density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. Blood, 2002, 100:4026-32.

National Institute of Health: Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterl in Adults (Adult Treatment Panel III). Executive summary. Bethesda, MD, National Institute of Health, National Heart, Lung and Blood Institute, 2001 (NIH pub1.n°.01-3670).

Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. Nat Rev Immunol, 2009, 9:679-91

Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, Ng W, Sayama K, Hashimoto K, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H. Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. J Invest Dermatol, 2007, 127:594-604.

Niyonsaba F, Ushio H, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H. The human beta-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes. J Immunol, 2005, 175:1776-84.

Niyonsaba F, Iwabuchi K, Matsuda H, Ogawa H, Nagaoka I. Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. Int Immunol, 2002, 14:421-6.

Niyonsaba F, Someya A, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. Eur J Immunol, 2001, 31:1066-75.

Nomura I, Goleva E, Howell MD, Hamid QA, Ong PY, Hall CF, Darst MA, Gao B, Boguniewicz M, Travers JB, Leung DY. Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. J Immunol, 2003, 171:3262-9.

Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DY. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. N Engl J Med, 2002, 347:1151-60.

Orchard TJ, Chang YF, Ferrell RE, Petro N, Ellis DE. Nephropathy in type 1 diabetes: a manifestation of insulin resistance and multiple genetic susceptibilities? Further evidence from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complication Study. Kidney Int, 2002, 62:963-70.

Papa A, Emdin M, Passino C, Michelassi C, Battaglia D, Cocci F. Predictive value of elevated neutrophil-lymphocyte ratio on cardiac mortality in patients with stable coronary artery disease. Clin Chim Acta, 2008, 395:27-31.

Park CB, Kim HS, Kim SC. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 244:253-7.

Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. Microbes Infect, 2004, 6:1382-7.

Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO 3rd, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC Jr, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F; Centers for Disease Control and Prevention; American Heart Association. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. Circulation, 2003, 107:499-511.

Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. Science,1995, 269:540-3.

Pesonen E, El-Segaier M, Persson K, Puolakkainen M, Sarna S, Ohlin H, Pussinen PJ. Infections as a stimulus for coronary occlusion, obstruction, or acute coronary syndromes. Ther Adv Cardiovasc Dis, 2009 Sep 22.

Pickup JC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. Diabetes Care, 2004, 27:813-23.

Pistolic J, Cosseau C, Lia Y, Yu J, Filewod NC, Gellatly S, Rehaume LM, Bowdish DM., Hancock RE. Host Defence Peptide LL-37 Induces IL-6 Expression in Human Bronchial Epithelial Cells by Activation of the NF-kappaB Signaling Pathway. J Innate Immun, 2009,1:254-267

Poulter N. Coronary heart disease is a multifactorial disease. Am J Hypertens, 1999, 12:92S-95S.

Powers JP, Hancock RE. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. Peptides, 2003, 24:1681-91

Prodanovich S, Kirsner RS, Kravetz JD, Ma F, Martinez L, Federman DG. Association of psoriasis with coronary artery, cerebrovascular, and peripheral vascular diseases and mortality. Arch Dermatol, 2009, 145:700-3.

Rahmouni K, Correia ML, Haynes WG, Mark AL. Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms. Hypertension, 2005, 45:9-14.

Ramasundara M, Leach ST, Lemberg DA, Day AS. Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease. J Gastroenterol Hepatol, 2009, 24:202-8.

Rescher U, Danielczyk A, Markoff A, Gerke V. Functional activation of the formyl peptide receptor by a new endogenous ligand in human lung A549 cells. J Immunol, 2002, 169:1500-4.

Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. Circulation, 2003, 107:391-7.

Rodríguez-Martínez S, Cancino-Diaz JC, Vargas-Zuñiga LM, Cancino-Diaz ME. LL-37 regulates the overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and c-IAP-2 in human keratinocytes. Int J Dermatol, 2008, 47:457-62.

Romeo D, Skerlavaj B, Bolognesi M, Gennaro R. Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. J Biol Chem, 1988, 263:9573-5.

Rosenfeld Y, Papo N, Shai Y. Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action. J Biol Chem, 2006, 281:1636-43.

Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med, 1999, 340:115-26.

Roytblat L, Rachinsky M, Fisher A, Greemberg L, Shapira Y, Douvdevani A, Gelman S. Raised interleukin-6 levels in obese patients. Obes Res, 2000, 8:673-5.

Ruchaud-Sparagano MH, Walker TR, Rossi AG, Haslett C, Dransfield I. Soluble E-selectin acts in synergy with platelet-activating factor to activate neutrophil beta 2-integrins. Role of tyrosine kinases and Ca2+ mobilization. J Biol Chem, 2000, 275:15758-64.

Sahagun-Ruiz A, Colla JS, Juhn J, Gao JL, Murphy PM, McDermott DH. Contrasting evolution of the human leukocyte N-formylpeptide receptor subtypes FPR and FPRL1R. Genes Immun, 2001, 2:335-42.

Saraheimo M, Forsblom C, Pettersson-Fernholm K, Flyvbjerg A, Groop PH, Frystyk J; FinnDiane Study Group. Increased levels of alpha-defensin (-1, -2 and -3) in type 1 diabetic patients with nephropathy. Nephrol Dial Transplant, 2008, 23:914-8.

Saraheimo M, Teppo AM, Forsblom C, Fagerudd J, Groop PH. Diabetic nephropathy is associated with low-grade inflammation in Type 1 diabetic patients. Diabetologia, 2003, 46:1402-7.

Sattar N. Inflammation and endothelial dysfunction: intimate companions in the pathogenesis of vascular disease? Clin Sci (Lond), 2004, 106:443-5.

Schauber J, Gallo RL. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. J Allergy Clin Immunol, 2008, 122:261-6

Schauber J, Dorschner RA, Coda AB, Büchau AS, Liu PT, Kiken D, Helfrich YR, Kang S, Elalieh HZ, Steinmeyer A, Zügel U, Bikle DD, Modlin RL, Gallo RL. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. J Clin Invest, 2007, 117:803-11.

Schauber J, Svanholm C, Termén S, Iffland K, Menzel T, Scheppach W, Melcher R, Agerberth B, Lührs H, Gudmundsson GH. Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. Gut, 2003, 52:735-41.

Schmidt MI, Duncan BB, Sharrett AR, Lindberg G, Savage PJ, Offenbacher S, Azambuja MI, Tracy RP, Heiss G. Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. Lancet, 1999, 353:1649-52.

Segaert S. Vitamin D regulation of cathelicidin in the skin: toward a renaissance of vitamin D in dermatology? J Invest Dermatol, 2008, 128:773-5.

Seifert R, Wenzel-Seifert K. Defective Gi protein coupling in two formyl peptide receptor mutants associated with localized juvenile periodontitis. J Biol Chem, 2001, 276:42043-9.

Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. Nat Immunol, 2005, 6:551-7.

Selsted ME, Harwig SS, Ganz T, Schilling JW, Lehrer RI. Primary structures of three human neutrophil defensins. J Clin Invest, 1985, 76:1436-9.

Shah PK. Innate immune pathway links obesity to insulin resistance. Circ Res, 2007, 100:1531-3.

Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. Biochim Biophys Acta, 1999, 1462:55-70.

Shaykhiev R, Beisswenger C, Kändler K, Senske J, Püchner A, Damm T, Behr J, Bals R. Human endogenous antibiotic LL-37 stimulates airway epithelial cell proliferation and wound closure. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 289:L842-8.

Sheetz MJ, King GL. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. JAMA, 2002, 288:2579-88.

Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. J Clin Invest, 2006, 116:3015-25.

Shin YH, Lee GW, Son KN, Lee SM, Kang CJ, Kwon BS, Kim J. Promoter analysis of human CC chemokine CCL23 gene in U937 monocytoid cells. Biochim Biophys Acta, 2007, 1769:204-8.

Shiohara M, Gombart AF, Sekiguchi Y, Hidaka E, Ito S, Yamazaki T, Koeffler HP, Komiyama A. Phenotypic and functional alterations of peripheral blood monocytes in neutrophil-specific granule deficiency. J Leukoc Biol, 2004, 75:190-7.

Showell HJ, Freer RJ, Zigmond SH, Schiffmann E, Aswanikumar S, Corcoran B, Becker EL. The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal secretion for neutrophils. J Exp Med, 1976, 143:1154-69.

Siest G, Visvikis S, Herbeth B, Gueguen R, Vincent-Viry M, Sass C, Beaud B, Lecomte E, Steinmetz J, Locuty J, Chevrier P. Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal cohort for studying gene-environment interactions in the field of cardiovascular risk: the Stanislas cohort. Clin Chem Lab Med, 1998, 36:35-42.

Sironi AM, Gastaldelli A, Mari A, Ciociaro D, Positano V, Buzzigoli E, Ghione S, Turchi S, Lombardi M, Ferrannini E. Visceral fat in hypertension: influence on insulin resistance and beta-cell function. Hypertension, 2004, 44:127-33.

Soehnlein O, Kai-Larsen Y, Frithiof R, Sorensen OE, Kenne E, Scharffetter-Kochanek K, Eriksson EE, Herwald H, Agerberth B, Lindbom L. Neutrophil primary granule proteins HBP and HNP1-3 boost bacterial phagocytosis by human and murine macrophages. J Clin Invest, 2008, 118:3491-502.

Sorensen OE, Borregaard N. Cathelicidins--nature's attempt at combinatorial chemistry. Comb Chem High Throughput Screen, 2005, 8:273-80

Sparkes RS, Kronenberg M, Heinzmann C, Daher KA, Klisak I, Ganz T, Mohandas T. Assignment of defensin gene(s) to human chromosome 8p23. Genomics, 1989, 5:240-4.

Srivastava MD, Thomas A, Srivastava BI, Check JH. Expression and modulation of progesterone induced blocking factor (PIBF) and innate immune factors in human leukemia cell lines by progesterone and mifepristone. Leuk Lymphoma, 2007, 48:1610-7.

Stallone DD. The influence of obesity and its treatment on the immune system. Nutr Rev, 1994, 52:37-50.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. Nature, 2001, 409:307-12.

Su SB, Gong WH, Gao JL, Shen WP, Grimm MC, Deng X, Murphy PM, Oppenheim JJ, Wang JM. T20/DP178, an ectodomain peptide of human immunodeficiency virus type 1 gp41, is an activator of human phagocyte N-formyl peptide receptor. Blood, 1999a, 93:3885-92.

Su SB, Gong W, Gao JL, Shen W, Murphy PM, Oppenheim JJ, Wang JM. A seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, FPRL1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells. J Exp Med, 1999b, 189:395-402.

Sun R, Iribarren P, Zhang N, Zhou Y, Gong W, Cho EH, Lockett S, Chertov O, Bednar F, Rogers TJ, Oppenheim JJ, Wang JM. Identification of neutrophil granule protein cathepsin G as a novel chemotactic agonist for the G protein-coupled formyl peptide receptor. J Immunol, 2004, 173:428-36.

Sundström C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). Int J Cancer, 1976, 17:565-77.

Sørensen O, Bratt T, Johnsen AH, Madsen MT, Borregaard N. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is bound to lipoproteins in plasma. J Biol Chem, 1999, 274:22445-51.

Sørensen O, Arnljots K, Cowland JB, Bainton DF, Borregaard N. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. Blood, 1997b, 90:2796-803.

Sørensen O, Cowland JB, Askaa J, Borregaard N. An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma. J Immunol Methods, 1997a, 206:53-9.

Tamhane UU, Aneja S, Montgomery D, Rogers EK, Eagle KA, Gurm HS. Association between admission neutrophil to lymphocyte ratio and outcomes in patients with acute coronary syndrome. Am J Cardiol, 2008, 102:653-7.

Tang YQ, Yuan J, Osapay G, Osapay K, Tran D, Miller CJ, Ouellette AJ, Selsted ME. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. Science, 1999, 286:498-502.

Tavor S, Vuong PT, Park DJ, Gombart AF, Cohen AH, Koeffler HP. Macrophage functional maturation and cytokine production are impaired in C/EBP epsilon-deficient mice. Blood, 2002, 99:1794-801.

Territo MC, Ganz T, Selsted ME, Lehrer R. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. J Clin Invest, 1989, 84:2017-20.

Thomas GN, McGhee SM, Schooling M, Ho SY, Lam KS, Janus ED, Lam TH; for the Hong Kong Cardiovascular Risk Factor Prevalence Study Steering Committee. Impact of sex-specific body composition on cardiovascular risk factors: the Hong Kong Cardiovascular Risk Factor Study. Metabolism, 2006, 55:563-9.

Tien AH, Xu L, Helgason CD. Altered immunity accompanies disease progression in a mouse model of prostate dysplasia. Cancer Res, 2005, 65:2947-55.

Tjabringa GS, Ninaber DK, Drijfhout JW, Rabe KF, Hiemstra PS. Human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors. Int Arch Allergy Immunol, 2006, 140:103-12.

Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. Biopolymers, 2000, 55: 4-30.

Valore EV, Ganz T. Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells. Blood, 1992, 79:1538-44.

Van Eijk LT, Dorresteijn MJ, Smits P, van der Hoeven JG, Netea MG, Pickkers P. Gender differences in the innate immune response and vascular reactivity following the administration of endotoxin to human volunteers. Crit Care Med, 2007, 35:1464-9.

Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. Nature, 2006, 444:875-80.

Van Wetering S, Mannesse-Lazeroms SP, Dijkman JH, Hiemstra PS. Effect of neutrophil serine proteinases and defensins on lung epithelial cells: modulation of cytotoxicity and IL-8 production. J Leukoc Biol, 1997a, 62:217-26.

Van Wetering S, Mannesse-Lazeroms SP, Van Sterkenburg MA, Daha MR, Dijkman JH, Hiemstra PS. Effect of defensins on interleukin-8 synthesis in airway epithelial cells. Am J Physiol, 1997b, 272:L888-96.

Visvikis-Siest S, Siest G. The STANISLAS Cohort: a 10-year follow-up of supposed healthy families. Gene-environment interactions, reference values and evaluation of biomarkers in prevention of cardiovascular diseases. Clin Chem Lab Med, 2008, 46:733-47.

Voisey J, Imbeault P, Hutley L, Prins JB, van Daal A. Body mass index-related human adipocyte agouti expression is sex-specific but not depot-specific. Obes Res, 2002, 10:447-52.

Von Haussen J, Koczulla R, Shaykhiev R, Herr C, Pinkenburg O, Reimer D, Wiewrodt R, Biesterfeld S, Aigner A, Czubayko F, Bals R. The host defence peptide LL-37/hCAP-18 is a growth factor for lung cancer cells. Lung Cancer, 2008, 59:12-23.

Walrand S, Guillet C, Boirie Y, Vasson MP. In vivo evidences that insulin regulates human polymorphonuclear neutrophil functions. J Leukoc Biol, 2004, 76:1104-10.

Wang CP, Chung FM, Shin SJ, Lee YJ. Congenital and environmental factors associated with adipocyte dysregulation as defects of insulin resistance. Rev Diabet Stud, 2007, 4:77-84.

Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, Tavera-Mendoza L, Lin R, Hanrahan JW, Mader S, White JH. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. J Immunol, 2004, 173:2909-12.

Wang Y, Agerberth B, Löthgren A, Almstedt A, Johansson J. Apolipoprotein A-I binds and inhibits the human antibacterial/cytotoxic peptide LL-37. J Biol Chem, 1998, 273:33115-8.

Weber G, Chamorro CI, Granath F, Liljegren A, Zreika S, Saidak Z, Sandstedt B, Rotstein S, Mentaverri R, Sánchez F, Pivarcsi A, Ståhle M. Human antimicrobial protein hCAP18/LL-37 promotes a metastatic phenotype in breast cancer. Breast Cancer Res, 2009, 11:R6.

Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schröder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. Gut, 2004, 53:1658-64.

Weijenberg MP, Feskens EJ, Kromhout D. White blood cell count and the risk of coronary heart disease and all-cause mortality in elderly men. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996, 16:499-503.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest, 2003, 112:1796-808.

Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. J Clin Invest, 2005, 115:1111-9.

Wenghoefer M, Pantelis A, Dommisch H, Götz W, Reich R, Bergé S, Martini M, Allam JP, Jepsen S, Merkelbach-Bruse S, Fischer HP, Novak N, Winter J. Nuclear hBD-1 accumulation in malignant salivary gland tumours. BMC Cancer, 2008, 8:290.

Wu Z, Prahl A, Powell R, Ericksen B, Lubkowski J, Lu W. From pro defensins to defensins: synthesis and characterization of human neutrophil pro alpha-defensin-1 and its mature domain. J Pept Res, 2003, 62:53-62

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J Clin Invest, 2003, 112:1821-30.

Xu M, Scott JE, Liu KZ, Bishop HR, Renaud DE, Palmer RM, Soussi-Gounni A, Scott DA. The influence of nicotine on granulocytic differentiation - inhibition of the oxidative burst and bacterial killing and increased matrix metalloproteinase-9 release. BMC Cell Biol, 2008, 9:19.

Yamaguchi N, Isomoto H, Mukae H, Ishimoto H, Ohnita K, Shikuwa S, Mizuta Y, Nakazato M, Kohno S. Concentrations of alpha- and beta-defensins in plasma of patients with inflammatory bowel disease. Inflamm Res, 2009, 58:192-7.

Yamasaki K, Schauber J, Coda A, Lin H, Dorschner RA, Schechter NM, Bonnart C, Descargues P, Hovnanian A, Gallo RL. Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. FASEB J, 2006, 20:2068-80.

Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. Annu Rev Immunol, 2004, 22:181-215.

Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. Trends Immunol, 2002, 23:291-6.

Yang D, Chertov O, Oppenheim JJ. The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. Cell Mol Life Sci, 2001a, 58:978-89.

Yang D, Chertov O, Oppenheim JJ. Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). J Leukoc Biol, 2001b, 69:691-7.

Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. Science, 1999, 286:525-8.

Yang L, Weiss TM, Lehrer RI, Huang HW. Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. Biophys J, 2000, 79:2002-9.

Ye RD, Boulay F, Wang JM, Dahlgren C, Gerard C, Parmentier M, Serhan CN, Murphy PM. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. Pharmacol Rev, 2009, 61:119-61.

Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacol Rev, 2003, 55:27-55.

Yeboah J, Klein K, Brosnihan B, Reboussin D, Herrington DM. Effects of hormone therapy on soluble cell adhesion molecules in postmenopausal women with coronary artery disease. Menopause, 2008, 15:1060-4.

Yu J, Mookherjee N, Wee K, Bowdish DM, Pistolic J, Li Y, Rehaume L, Hancock RE. Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1beta, augments immune responses by multiple pathways. J Immunol, 2007, 179:7684-91.

Yudkin JS. Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. Int J Obes Relat Metab Disord, 2003, 27 :S25-8.

Zaiou M. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. J Mol Med, 2007, 85:317-29.

Zaiou M, Gallo RL. Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics. J Mol Med, 2002, 80:549-61.

Zalokar JB, Richard JL, Claude JR. Leukocyte count, smoking, and myocardial infarction. N Engl J Med, 1981, 304:465-8.

Zanetti M. The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. Curr Issues Mol Biol, 2005, 7:179-96.

Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. J Leukoc Biol, 2004, 75:39-48.

Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature, 2002, 415:389-95.

Zhang Y, Syed R, Uygar C, Pallos D, Gorry MC, Firatli E, Cortelli JR, VanDyke TE, Hart PS, Feingold E, Hart TC. Evaluation of human leukocyte N-formylpeptide receptor (FPR1) SNPs in aggressive periodontitis patients. Genes Immun, 2003, 4:22-9.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature, 1994, 372:425-32.

PUBLICATIONS ET CONFERENCES

LISTE DES PUBLICATIONS ET CONFERENCES

Articles :

1) **Benachour H**, Zaiou M, Samara A, Herbeth B, Pfister M, Lambert D, Siest G, Visvikis-Siest S. Association of human cathelicidin (hCAP-18/LL-37) gene expression with cardiovascular disease risk factors. *Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2009, 19:720-8.*

2) **Benachour H,** Zaiou M, Herbeth B, Lambert D, Lamont JV, Pfister M, Siest G, Tiret L, Blankenberg S, Fitzgerald PS, Visvikis-Siest S. Human formyl peptide receptor 1 (FPR1) c.32C>T SNP is associated with decreased soluble E-selectin levels. *Pharmacogenomics, 2009, 10:951-9.*

3) Zaiou M*, **Benachour H***, Herbeth B, Pfister M, Siest G, Visvikis-Siest S. Association of human α-defensins (DEFA1-3) gene expression with cardiovascular and metabolic syndrome risk factors. *Soumis à publication "Obesity"*

4) El Shamieh S, Herbeth B, **Benachour H**, Azimi-Nezhad M, Ghayour-Mobarhan M, Pfister M, Zaiou M, Marteau JB, Visvikis-Siest S. Human formyl peptide receptor 1 c.32C>T SNP is associated with increased blood pressure levels. *A soumettre à "Journal of Hypertension"*

5) **Benachour H**, Zaiou M et *al*. Atherogenic stimuli modulate antimicrobial peptides, defensins and cathelicidins, gene expression *in vitro*. *En préparation*

Revue :

Zaiou M, **Benachour H**, Marteau J.B, Visvikis-Siest S, Siest G. Genomics and the prospects of existing and emerging therapeutics for cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des. 2009, 15:3193-206.*

Rédactions didactiques :

1) Siest G, Bastien B, **Benachour H**, Herbeth B, Jeannesson E, Lambert D, Samara A, Visvikis-Siest S. From human genetic variations to prediction of risks and responses to drugs and the environment. Personalized Medicine, 2007, 4:95-104.
Meeting report on the third "Biologie Prospective" Santorini Conference, September 29-October 2, 2006, Santorini Island, Greece.

2) Siest G, **Benachour H**, Lambert D, Marteau J.B, Masson C, Ndiaye N.C, Visvikis-Siest S. Functional genomics towards personalized healthcare. Personalized Medicine, 2009, 1:19-32. ***Meeting report on the fourth "Biologie Prospective" Santorini Conference, September 21-23, 2008, Santorini Island, Greece***.

Communications orales :

1) **Benachour H**. Peptides antimicrobiens : implication dans l'immunopathologie de l'obésité et des maladies cardiovasculaires. *Journée Pharma-Recherche de la Faculté de Pharmacie de Nancy. 20 Mars 2008, Nancy-France.*

2) **Benachour H**. ***(Lauréat de la bourse « Obésité abdominale et risque cardiovasculaire » de la Société Française de Cardiologie, dotée par les laboratoires Sanofi-Aventis France).***
Peptides antimicrobiens : rôle potentiel dans l'obésité et les maladies cardiovasculaires. *Sous invitation aux XIIXèmes Journées Européennes de la Société Française de Cardiologie. 16-19 Janvier 2008, Palais des congrès, Paris- France.*

3) **Benachour H**. Implication des peptides naturels (cathélicidines) et de leur récepteur potentiel dans le processus inflammatoire de l'athérosclérose. *Journée Pharma-Recherche de la Faculté de Pharmacie de Nancy. 29 Mars 2007, Nancy-France.*

Communications affichées :

1) **Benachour H**, Zaiou M, Herbeth B, Pfister M, Lamont JV, Fitzgerald FS, Visvikis-Siest S. Human formyl peptide receptor 1 c.32C>T mutation is associated with inflammatory indices in healthy subjects selected from the STANISLAS Cohort. ***Fourth "Biologie Prospective" Santorini Conference, September 21-23, 2008, Santorini Island, Greece***.
Published in Clinical Chemistry & Laboratory Medicine. 2008, 46:A124.

2) Zaiou M, **Benachour H**, Samara A, Herbeth B, Pfister M, Siest G, Visvikis-Siest S. Association of human cathelicidin (hCAP18/LL-37) gene expression with cardiovascular diseases risk factors. ***Fourth "Biologie Prospective" Santorini Conference, September 21-23, 2008, Santorini Island, Greece***.
Published in Clinical Chemistry & Laboratory Medicine. 2008, 46:A145.

3) **Benachour H,** Zaiou M, Herbeth B Visvikis-Siest S. Implication des peptides antimicrobiens dans le risque des maladies cardiovasculaires. *Séminaire des Doctoriales de Lorraine, 23-30 Mai 2008, Ventron-Vosges, France.*