

G-CSF : une nouvelle adipokine ? Rôle potentiel dans le tissu adipeux au cours de l'obésité humaine

Myriam Georges

▶ **To cite this version:**

Myriam Georges. G-CSF : une nouvelle adipokine ? Rôle potentiel dans le tissu adipeux au cours de l'obésité humaine. Biotechnologies. 2012. dumas-01157565

HAL Id: dumas-01157565

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01157565

Submitted on 28 May 2015

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.

CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET METIERS
PARIS

Mémoire
présenté en vue de l'obtention du
DIPLOME d'INGENIEUR CNAM

Spécialité : Sciences et techniques du vivant
Option : Génie biologique

par
Myriam GEORGES

G-CSF : une nouvelle adipokine ? Rôle potentiel dans le tissu adipeux au cours de l'obésité humaine.

Soutenu le 17 octobre 2012

Devant le jury composé de :

PRESIDENT :

Monsieur le Professeur Ali SAIB (Responsable de la Chaire de Biologie du CNAM)

MEMBRES :

Madame le Docteur Danièle LACASA (Chargée de Recherche INSERM, encadrante)

Monsieur le Docteur Fabien MAGNE (Maître de Conférences du CNAM, tuteur CNAM)

Madame le Docteur Véronique BEREZIAT (Maître de Conférences UPMC, examinatrice)

Madame le Docteur Florence MASSIERA (Directrice de Recherche chez Kot, examinatrice)

CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET METIERS
PARIS

Mémoire
présenté en vue de l'obtention du
DIPLOME d'INGENIEUR CNAM

Spécialité : Sciences et techniques du vivant
Option : Génie biologique

par
Myriam GEORGES

G-CSF : une nouvelle adipokine ? Rôle potentiel dans le tissu adipeux au cours de l'obésité.

Soutenu le 17 octobre 2012

Devant le jury composé de :

PRESIDENT :

Monsieur le Professeur Ali SAIB (Responsable de la Chaire de Biologie du CNAM)

MEMBRES :

Madame le Docteur Danièle LACASA (Chargée de Recherche INSERM, encadrante)

Monsieur le Docteur Fabien MAGNE (Maître de Conférences du CNAM, tuteur CNAM)

Madame le Docteur Véronique BEREZIAT (Maître de Conférences UPMC, examinatrice)

Madame le Docteur Florence MASSIERA (Directrice de Recherche chez Kot, examinatrice)

Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur Karine CLEMENT de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir donné les moyens d'y réaliser ce stage dans de très bonnes conditions.

Je souhaite témoigner ma profonde gratitude à mon encadrante, le Docteur Danièle LACASA, qui a su se rendre disponible pour me faire profiter au mieux de son expérience professionnelle ! Merci également d'avoir pris de ton temps précieux pour la relecture de ce manuscrit.

Je voudrais aussi remercier Christine ROUAULT de m'avoir fait profiter de son expertise technique et notamment pour les techniques de PCR en temps réel et les dosages Elisa. Merci pour tous tes conseils !

Et bien sûr une place particulière s'impose pour Vanessa PELLEGRINELLI. Merci de m'avoir accueillie et introduite au labo et aussi de m'avoir fait partager ton enthousiasme pour ton sujet de thèse auquel j'aurais un peu contribué pendant ce stage.

Merci à Patricia ANCEL et Jean-François BEDEL pour m'avoir fourni les tubes de sang nécessaires à la réalisation de mes expériences de culture cellulaire ! Merci à Nicolas VEYRIE et à l'ensemble de l'équipe de chirurgie digestive du Professeur Jean-Luc BOUILLOT pour les prélèvements de tissu adipeux, souvent réalisés dans des conditions très difficiles (j'ai pu m'en rendre compte par moi-même !), sans lesquels nous ne pourrions travailler et mener à bien nos recherches ! Et un grand MERCI général à l'ensemble des membres du laboratoire pour leur accueil et leur gentillesse tout au long de ce stage.

Je remercie le Professeur Ali SAIB, Professeur responsable de la chaire de biologie du CNAM, d'avoir accepté de présider ce jury. Je tiens à remercier les Docteurs Véronique BEREZIAT et Florence MASSIERA d'avoir accepté de participer à ce jury. Je voudrais remercier très chaleureusement mon tuteur du CNAM, le Docteur Fabien MAGNE, pour avoir toujours répondu présent, m'avoir rassurée et avoir répondu à mes questions tout au long de cette formation.

Je voudrais aussi ici remercier le Docteur Noélie THEBAUD pour ses conseils avisés pour la culture des progéniteurs des cellules endothéliales et pour m'avoir très gentiment transmis des publications à ce sujet. Je souhaite aussi remercier mes charmants collègues

pasteuriens, et notamment Christine HARMANT et Jérémy MANRY, pour m'avoir fourni les publications auxquelles je n'avais pas accès.

Je voudrais également remercier très sincèrement et très chaleureusement mes collègues du Museum pour m'avoir accompagnée tout au long de cette démarche de formation ! Plus particulièrement, je voudrais remercier mes responsables, les Professeurs Serge BAHUCHET et Evelyne HEYER, d'avoir accepté de m'accorder mon congé de formation afin de réaliser ce stage dans un laboratoire extérieur pour acquérir de nouvelles technologies. Un merci tout particulier à ma charmante collègue de bureau, le Docteur Priscille TOURAILLE, pour m'avoir soutenue lors de la rédaction de ce manuscrit.

Et pour conclure, un grand MERCI à mes copines du CNAM qui ont contribué à rendre ces années de formation bien plus sympathiques et enrichissantes. Merci à Laure et Myosotis qui sont parties vers d'autres horizons professionnels, et à Sandrine, May et Aude !!! Plein de bonnes choses à vous toutes pour la suite !!

Myriam GEORGES
49 Rue Bourgelat
94700 MAISONS ALFORT
34 ans

tél : 06-63-71-39-85
mail : georges@mnhn.fr

INGENIEUR en Génie Biologique

EXPERIENCE PROFESSIONNELLE

Janvier 2011-octobre 2011 — **Ingénieur en génie biologique**
Stage dans le laboratoire du Dr K.Clément, Nutrition et Obésité (équipe 7), Centre de Recherche des Cordeliers – PARIS
Sujet de stage : G-CSF : une nouvelle adipokine ? Rôle potentiel dans le tissu adipeux au cours de l'obésité.
Culture cellulaire (adaptation, au laboratoire, d'un protocole de culture des progéniteurs des cellules endothéliales)
Extraction d'ARN
Biologie moléculaire (RT, PCR en temps réel)
Immunofluorescence
Dosages par ELISA
Expériences de prolifération et de migration cellulaire

Depuis janvier 2006 — **Assistant ingénieur CNRS**
Responsable du laboratoire de biologie moléculaire de l'équipe de Génétique des Populations Humaines de l'UMR 7206 – MNHN PARIS
Extraction d'ADN (sang, salive, selles)
Biologie moléculaire (PCR, RFLP, séquençage/génotypage)
Utilisation de logiciels de bioinformatique : Genalys pour alignement des séquences, GeneMarker pour analyse des microsatellites
Gestion des stocks et commandes

Décembre 2001-décembre 2005 — **Assistant ingénieur CNRS**
Responsable technique de la plateforme « transgenèse » de l'Institut Jacques Monod - PARIS
Obtention de souris transgéniques par microinjection d'ADN
Génotypage des animaux produits, par PCR, et suivi des lignées
Gestion des stocks, commandes et facturation des prestations réalisées
Encadrement d'une technicienne

FORMATION

Depuis sept 2005 — Préparation d'un diplôme d'ingénieur en sciences et techniques du vivant (option Génie biologique) au CNAM de Paris

1998 — DUT Génie Biologique
Option analyses biologiques et biochimiques - IUT de QUIMPER

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

Obtention de l'autorisation d'expérimenter de niveau I et du niveau chirurgie (2002)
Participation à des actions de valorisation scientifique : fête de la Science, exposition, documentaire

Résumé

G-CSF : une nouvelle adipokine ? Rôle potentiel dans le tissu adipeux au cours de l'obésité humaine.

Le tissu adipeux blanc humain joue un rôle central dans la physiopathologie de l'obésité. Il subit des altérations de son métabolisme et de sa fonction endocrine. A l'exception de l'adiponectine, les sécrétions des adipokines sont augmentées et, notamment, celles à caractères inflammatoires et angiogéniques. Parmi ces nombreux médiateurs inflammatoires figure le facteur de croissance granulocytaire (G-CSF) dont le rôle dans le tissu adipeux blanc hypertrophique reste encore à préciser. Des travaux de notre équipe ont montré, par une approche transcriptomique, que G-CSF était le gène le plus surexprimé par les pré-adipocytes inflammatoires. Après l'avoir caractérisé au sein du tissu adipeux blanc humain (PCR en temps réel, dosages ELISA), je proposerai un rôle potentiel de G-CSF comme médiateur de la mobilisation des progéniteurs des cellules endothéliales (PCEs) eux-mêmes impliqués dans la néoangiogenèse. G-CSF et son récepteur sont principalement exprimés par les macrophages isolés du tissu adipeux de patients obèses. Au niveau tissulaire, G-CSF est plus sécrété par le tissu adipeux viscéral que par le tissu sous cutané chez les patientes obèses. De plus, les macrophages inflammatoires sécrètent du G-CSF. Des résultats préliminaires montrent que, même si G-CSF ne semble pas avoir d'effet direct sur la prolifération des PCEs, le milieu de sécrétion du tissu adipeux viscéral de patients obèses montre un effet prolifératif et attractant sur ces PCEs. G-CSF peut donc être considéré comme une nouvelle adipokine et pourrait participer, par la mobilisation des PCEs, à la réparation vasculaire du tissu adipeux blanc humain au cours de l'obésité.

Mots clefs : tissu adipeux blanc humain, obésité, adipokines, G-CSF, PCEs, néoangiogenèse.

G-CSF: a new adipokine? Potential implication in adipose tissue during humaun obesity.

White adipose tissue (WAT) in humans plays a central role in the physiopathology of obesity with altered metabolic and endocrine functions. The secretions of the adipokines, except adiponectin, are increased and particularly those of the inflammatory and angiogenic adipokines as the granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). There is currently few data about the role of G-CSF in human WAT biology. By a transcriptomic approach, our team has shown that G-CSF was the most over-expressed gene in the inflammatory preadipocytes. First, I have characterized G-CSF secretion and expression in human WAT (by real-time PCR and ELISA tests), and I suggested a potential role in the mobilization of endothelial progenitor cells (ECPs) involved in neoangiogenesis. G-CSF and its receptor are mainly expressed by macrophages isolated from WAT of obese patients. Moreover, G-CSF is more secreted by visceral than subcutaneous WAT of obese patients. In addition, inflammatory macrophages secrete abundantly G-CSF. Preliminary results show that although G-CSF does not seem to have a direct effect on the proliferation of ECPs, the secretory media of obese visceral WAT show a proliferative and attractive effect on ECPs. Thus, G-CSF can be considered a new adipokine, and may participate, by the mobilization of ECPs, in the vascular repair of WAT during human obesity.

Keywords : human white adipose tissue, obesity, adipokines, G-CSF, EPCs, neoangiogenesis.

Sommaire

Sommaire……...8

Liste des abréviations……..12

Table des illustrations…….17

Introduction générale…….20

Introduction bibliographique……22

I/ L'obésité……... 22

I-1/ Définitions de l'obésité…….. 22

I-2/ Origine multifactorielle des obésités……..24

I-3/ Complications associées à l'obésité……...25

I-4/ Approches thérapeutiques……..27

II/ Le tissu adipeux blanc humain…….29

II-1/ Localisation anatomique du tissu adipeux blanc……...29

II-2/ Hétérogénéité cellulaire du tissu adipeux blanc……31

II-3/ Les fonctions biologiques du tissu adipeux blanc…….33

II-4/ Les altérations du tissu adipeux blanc au cours de l'obésité…….35

III/ Le facteur de croissance des colonies de granulocytes……...38

III-1/ Découverte……...38

III-2/ Du gène à la protéine……...39

III-3/ Le récepteur du facteur de croissance des colonies de granulocytes……...40

III-4/ Voies de transduction du signal……...42

III-5/ Activités biologiques du facteur de croissance des colonies de granulocytes….44

IV/ Les progéniteurs des cellules endothéliales……46

IV-1/ Origine et différenciation des progéniteurs des cellules endothéliales……46

IV-2/ Isolement et mise en culture des progéniteurs des cellules endothéliales……...47
IV-3/ Caractérisation des progéniteurs des cellules endothéliales……49
IV-3-1/ Caractérisation phénotypique……...49
IV-3-2/ Caractérisation fonctionnelle……51
IV-4/ Physiologie des progéniteurs des cellules endothéliales…….53

V/ La néovascularisation au sein du tissu adipeux……...54
V-1/ Définitions et mécanismes impliqués lors de la néovascularisation…….54
V-2/ Relation entre l'adipogenèse et la néovascularisation……..57
V-3/ Pouvoir angiogénique du facteur de croissance des colonies de granulocytes ?..58
V-4/ Rôle potentiel des progéniteurs des cellules endothéliales dans la néovascularisation…….59

Hypothèse de travail……...61

Matériels et méthodes…….62

I/ Culture cellulaire……...62
I-1/ Mise en culture des biopsies de tissu adipeux……62
I-2/ Isolement des différents types cellulaires à partir des biopsies de tissu adipeux...62
I-3/ Isolement et mise en culture des cellules sanguines……...64
I-3-1/ Le gradient de Ficoll®……...65
I-3-1-a/ Principe…….65
I-3-1-b/ Protocole expérimental…….65
I-3-2/ Isolement des monocytes et différenciation *in vitro* en macrophages…...66
I-3-3/ Isolement et mise en culture des progéniteurs des cellules endothéliales. 67

II/ Etude de l'expression de G-CSF et de son récepteur……...69
II-1/ Extraction des ARN totaux……...69
II-1-1/ Principe……69
II-1-2/ Protocole expérimental……69
II-2/ Rétro-transcription des ARN……70
II-2-1/ Principe……70
II-2-2/ Protocole expérimental……71

II-3/ PCR en temps réel……71
II-3-1/ Principe……71
II-3-2/ Protocole expérimental……74
II-3-2-a/ Choix du système de détection……74
II-3-2-b/ Choix des gènes de ménage……74
II-3-2-c/ Choix des amorces……..75
II-3-2-d/ Protocole de PCR.....76

III/ Etude de la sécrétion de G-CSF……..76
III-1/ Etude de la sécrétion de G-CSF au niveau cellulaire……...77
III-1-1/ Principe……77
III-1-2/ Protocole expérimental……77
III-2/ Etude de la sécrétion de G-CSF au niveau tissulaire……...77
III-3/ Dosage ELISA……78
III-3-1/ Principe……78
III-3-2/ Protocole expérimental……78

IV/ Caractérisation des progéniteurs des cellules endothéliales par immunofluorescence…...79
IV-1/ Principe……79
IV-2/ Protocole expérimental……79
IV-2-1/ Ensemencement des cellules sur lamelles……...80
IV-2-2/ Fixation des cellules……80
IV-2-3/ Perméabilisation des cellules……..80
IV-2-4/ Immunodétection des protéines……..80
IV-2-5/ Montage et observation du marquage……....81

V/ Etude la prolifération cellulaire des progéniteurs des cellules endothéliales……...81
V-1/ Principe……81
V-2/ Protocole expérimental……82

VI/ Test de migration cellulaire des progéniteurs des cellules endothéliales……..82
VI-1/ Principe……82
VI-2/ Protocole expérimental……83

VII/ Analyse statistique des données……84

Résultats.....85

I/ G-CSF et le tissu adipeux blanc humain……..85

I-1/Etude de l'expression de G-CSF par les adipocytes: influence du statut pondéral.85

I-2/ Etude de l'expression de G-CSF et de son récepteur dans les principaux types cellulaires du tissu adipeux……...86

I-3/ Effet de la pravastatine sur la sécrétion de G-CSF par les macrophages……..88

I-4/ Etude de la sécrétion de G-CSF par le tissu adipeux : influence de la localisation anatomique……89

I-5/ Relations entre les sécrétions du facteur de croissance des colonies de granulocytes, l'interleukine IL-8 et l'adiponectine dans le tissu adipeux sous-cutané……92

II/ Les progéniteurs des cellules endothéliales……..94

II-1/ Validation du protocole d'isolement et de mise en culture des progéniteurs des cellules endothéliales……94

II-2/ Caractérisation phénotypique des progéniteurs des cellules endothéliales…….....96

II-3/ Etude de l'effet du facteur de croissance des colonies de granulocytes sur la prolifération des progéniteurs des cellules endothéliales…….....97

II-4/ Etude de l'effet mobilisateur du facteur de croissance des colonies de granulocytes sur la migration des progéniteurs des cellules endothéliales…….....99

Discussion……...100

Conclusion et perspectives……104

Evaluation du coût du stage……109

Bibliographie……112

Liste des abréviations

A

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messager

B

Bad : « Bcl-Associated Death »

C

C : cystéine

CD : « Cluster of Differentiation » : cluster de différenciation

(domaine) CHR : « Cytokine Homology Receptor » : (domaine) homologue aux récepteurs de cytokines

CO2 : dioxyde de carbone

CSF-3 : « Colony Stimulating Factor 3 » : facteur (numéro 3) de croissance des colonies

Ct : « Cycle threshold » : cycle seuil

CXCR4 : « C-X-C Chemokine Receptor type 4 » : récepteur au chimiokine de type 4

D

DAPI : 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride : 4',6'-diaminodino-2-phénylindole

DMEM : «Dulbecco's Minimum essential Medium » : milieu de culture de Dulbecco

DEXA : « Dual Energy X-ray absorptiometry » : absorption bi-photonique aux rayons X

E

ECBM : « Endothelial Cell Basal Medium » : milieu de culture de base des cellules endothéliales

ECGM : « Endothelial Cell Growth Medium » : milieu de culture de croissance des cellules endothéliales

EDTA : « EthyleneDiamineTetraacetic Acid » : acide éthylène diaminetétraacétique

egr-1 : «Early growth response factor 1 » : facteur numéro 1 de réponse à la croissance précoce

ELISA : « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay » : « dosage d'immunoabsorption par enzyme liée »

eNOS : « endothelial Nitric Oxide Synthase » : oxyde nitrique synthase endothéliale

ERK : « Extracellular signal Regulated Kinase »

F

(domaine) FN III : (domaine) homologue à la fibronectine de type III

FRET : « Fluorescence resonance energy transfer » : transfert d'énergie de fluorescence de type Förster

FSV : Fraction Stroma Vasculaire

G

G-CSF : « Granulocyte-Colony Stimulating Factor » : facteur de croissance des colonies de granulocytes

GDP : Guanosine DiPhosphate

GM-CSF : « Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor » : facteur de croissance des colonies de granulocytes et de macrophages

Grb2 : « Growth factor Receptor Bound protein 2 »

GTP : Guanosine TriPhosphate

H

H : heure

HAM56 : « Human Alveolar Macrophage » : marquage/coloration des macrophages

HDL : « High Density Lipoprotein » : lipoprotéine de haute densité

HIF-1α : « Hypoxia Inducible Factor-1 α » : facteur alpha-1 inductible par l'hypoxie

HRP : « HorseRadish-Peroxydase » : péroxydase de raifort

I

(domaine) Ig : (domaine) homologue aux immunoglobulines

IL-3 : interleukine 3

IL-6 : interleukine 6

IL-8 : interleukine 8

IMC : Indice de Masse Corporelle

INSERM : Institut National Scientifique d'Etudes et de Recherches Médicales

IRF-1 : « Interferon regulatory factor 1 » : interféron de type 1

J

JAK : Janus Kinase

JKN : « c-Jun N-terminal Kinase »

K

K2HPO4 : Potassium hydrogénophosphate
kb : kilobase
kDa : kilodalton
KDR : « Kinase Domain Receptor » : récepteur “à domaine kinase”
kg/m² : kilogramme par mètre carré

L

LDL : « Low Density Lipoprotein » : lipoprotéine de basse densité
LPS : LipoPolySaccharide

M

MAPK : « Mitogen-Activated Protein Kinase » : protéine kinase activant la voie mitogénique
MCP-1 : « Monocyte chimoattractant protein 1 » : chimiokine attractive des monocytes
MEK : « Mitogen-activated and Extracellular regulated Kinase » :
mg/mL : milligramme par millilitre
min : minute
mL : milliLitre
mM : millimolaire
M-CSF : « Macrophage- Colony Stimulating Factor » : facteur de croissance des colonies de macrophages
M-MLV : « Moloney-Murine Leukemia Virus » : virus de la leucémie murine de Moloney
MTT : 3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide

N

NH4Cl : chlorure d’ammonium
ng : nanogramme
ng/mL : nanogramme par millilitre
nm : nanomètre

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P

PAF : PAraFormaldéhyde
pb : paire de bases
PBS : « Phosphate Buffer Saline » : tampon phosphate salin
PCEs : Progéniteurs des Cellules Endothéliales
PKB : protéine kinase B ou Akt

PDK : « phosphoinositide dependent protein kinase »

pg/mL : picogramme par milliLitre

PI3K : « PhosphatIdylinositol 3' Kinase »

pM : picomolaire

pvalue : la valeur p

Q

qsp : quantité suffisante pour

R

rh : « Recombinant human » : (forme) recombinante humaine

RPL0 : « Ribosomal Protein L-0 » : protéine ribosomale de la grande sous unité

RPMI : « Roswell Park Memorial Institute medium » : milieu de culture

S

S : sérine

SAS : Syndrome d'Apnée du Sommeil

SDF-1 : « stromal cell-derived factor-1 » : facteur numéro 1 dérivé des cellules stromales

sem : « standart error of mean » : erreur standart de la moyenne

SH2 : « Src Homology 2 »

Shc : : protéine adaptatrice des voies de signalisation intracellulaire

SHIP : « Src Homology 2 domain containing Inositol 5' Phosphatase-2 »

SOCS3 : « Suppressor Of Cytokine Signalling-3 »

SOFRES : SOciété FRançaise d'Enquêtes par Sondages

SOS : « Son Of Sevenless »

STAT : « Signal Transducer and Activator of Transcription » : facteur de transcription

SVF : Sérum de Veau Foetal

T

TNFα : « Tumor Necrosis Factor α » : facteur de nécrose tumorale alpha

TASC : Tissu Adipeux Sous-Cutané

TAV : Tissu Adipeux Viscéral

Tm : « annealing temperature » : température de fusion

t/min : tour par minute

U

µg/mL : microgramme par millilitre

µL : microlitre

µM : micromolaire

V

VEGF : « Vascular Endothelial Growth Factor » : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VEGF-R2 : « Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor2 » : récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

vWF : « von Willebrand Factor » : facteur de von Willebrand

W

W : tryptophane

X

X : acide aminé

Y

Y : tyrosine

Table des illustrations

Table des tableaux

Tableau I: Classification des différents « états » en fonction de l'indice de masse corporelle.22
Tableau II : Principales différences entre le tissu adipeux sous-cutané et viscéral chez le patient obèse massif……..31
Tableau III : Principales caractéristiques des adipokines étudiées……...34
Tableau IV : Principales caractéristiques des deux types de progéniteurs des cellules endothéliales……..52
Tableau V : Réactifs utilisés pour la réaction de rétro transcription…….71
Tableau VI : Programme de la réaction de rétro transcription……..71
Tableau VII : Séquences des amorces utilisées pour les réactions de PCR……..75
Tableau VIII : Réactifs utilisés pour les réactions de PCR……...76
Tableau IX : Programme de PCR…….76
Tableau X : Anticorps utilisés pour les expériences d'immunofluorescence……...81
Tableau XI : Conditions de culture des progéniteurs des cellules endothéliales……..95

Table des figures

Figure 1 : Répartition du tissu adipeux dans l'obésité androïde et gynoïde…….23
Figure 2 : L'obésité commune, une maladie multifactorielle……...24
Figure 3 : Schéma « d'un court-circuit » gastrique……...28
Figure 4 : Les différents dépôts de tissu adipeux chez l'Homme…….29
Figure 5 : Photographie en microscopie électronique de tissu adipeux de souris…….32
Figure 6 : Schéma des principales cellules du tissu adipeux blanc humain……..32
Figure 7 : Schéma des principales fonctions des éléments structuraux essentiels du tissu adipeux……..34
Figure 8 : Altérations du tissu adipeux au cours de l'obésité……...35
Figure 9 : Photographies de coupes de tissu adipeux sous-cutané de sujet mince et de sujet obèse……..36
Figure 10:Photographie de coupes de tissu adipeux sous-cutané et viscéral d'un sujet obèse 37
Figure 11 : Du gène à la structure secondaire du facteur de croissance des colonies de granulocytes …….39

Figure 12 : Schéma de la structure du récepteur du facteur de croissance des colonies de granulocytes……..41
Figure 13 : Principales voies de signalisation mises en jeu lors de l'activation du facteur de croissance des colonies de granulocytes……...43
Figure 14 : Les différentes classes de cellules souches…….46
Figure 15 : Origine potentielle des progéniteurs des cellules endothéliales……47
Figure 16 : Isolement et mise en culture des progéniteurs des cellules endothéliales……..49
Figure 17 : Schéma de lignage potentiel des progéniteurs des cellules endothéliales……..50
Figure 18 : Photographie de l'incorporation des LDL oxydés par les cellules endothéliales dérivées des progéniteurs des cellules endothéliales……51
Figure 19 : Photographie de la formation d'un réseau de tubes vasculaires dans le Matrigel® par les cellules endothéliales dérivées des progéniteurs des cellules endothéliales……..52
Figure 20 : Evolution du concept de néovascularisation chez l'adulte…….55
Figure 21 : Mécanismes impliqués dans la néovascularisation……56
Figure 22 : Schéma simplifié de la régulation de l'angiogenèse au sein du tissu adipeux…...58
Figure 23 : Rôle hypothétique des deux types de progéniteurs des cellules endothéliales…...60
Figure 24 : Isolement des différents types cellulaires du tissu adipeux……64
Figure 25 : Principe du gradient de Ficoll®……..65
Figure 26 : Principe de l'immunosélection……...67
Figure 27 : Exemple de résultat de PCR en temps et calcul du cycle seuil……..72
Figure 28 : Principe de la technologie SybrGreen……73
Figure 29 : Principe de la technologie Taqman……73
Figure 30 : Protocole schématisé d'un dosage ELISA « en sandwich »……...79
Figure 31 : Principe de l'expérience de migration cellulaire……83
Figure 32 : Influence du statut pondéral sur l'expression du facteur de croissance des granulocytes……..85
Figure 33 : Expression de G-CSF et de son récepteur dans les principaux types cellulaires du tissu adipeux de patients obèses massifs……...87
Figure 34 : Effet de la pravastatine sur la sécrétion du facteur de croissance des colonies de granulocytes par les macrophages…….89
Figure 35 : Influence de la localisation anatomique sur la sécrétion d'adiponectine et de leptine……90
Figure 36 : Influence de la localisation anatomique sur la sécrétion du facteur de croissance des colonies de granulocytes et des interleukines IL-6 et IL-8…….91

Figure 37 : Corrélations entre les taux de sécrétion du facteur de croissance des colonies de granulocytes et les taux de sécrétion de l'interleukine IL-8 et entre les taux de sécrétion du facteur de croissance des colonies de granulocytes et les taux de sécrétion de l'adiponectine dans le tissu adipeux sous-cutané……..93
Figure 38 : Photographie en microscopie à contraste de phase des progéniteurs des cellules endothéliales après 25 jours de culture…….95
Figure 39 : Photographies en microscopie confocale des progéniteurs des cellules endothéliales……..96
Figure 40 : Test de prolifération cellulaire sur les progéniteurs des cellules endothéliales…..98
Figure 41 : Migration des progéniteurs des cellules endothéliales……...99
Figure 42 : Mécanisme d'action du facteur de croissance des colonies de granulocytes dans la mobilisation des progéniteurs des cellules endothéliales……106
Figure 43 : Schéma intégratif général…….108

Introduction générale

Autrefois tout ce qui concernait le statut pondéral relevait davantage de considérations esthétiques et sociales que de considérations médicales [Garrow, 1998]. Aujourd'hui l'obésité relève plus que jamais du domaine médical. En effet, les dernières projections estiment qu'en 2030, un à douze milliards de personnes seront obèses à travers le monde [Stephens *et al.*, 2011]. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) l'a d'ailleurs reconnue officiellement comme une maladie dès 1998 (8ème Congrès International sur l'Obésité, Paris). Aujourd'hui, l'obésité est considérée comme un problème de santé publique majeur ; selon l'OMS, on assiste à la montée « d'une véritable épidémie » (http://www.eufic.org/article/fr/artid/obesite-maladie-millenaire/). D'après la dernière étude ObEpi (enquête épidémiologique triennale réalisée par la SOFRES sous la direction de l'INSERM à la demande des laboratoires Roche), réalisée en 2009, 14,5% des français sont obèses et 31,9% sont en surpoids. De plus, la forme massive de l'obésité a augmenté, passant de 0,8% à 1,1% de la population, entre 2006 et 2009 (http://www.roche.fr/gear/newcontents/servlet/staticfilesServlet?type=data&communityId=re719001&id=static/attachedfile/re7300002/re72700003/AttachedFile_10101.pdf).

Selon la théorie du « gène économe » (« thrifty gene theory »), proposée en 1962 par Neel, le diabète et l'obésité observés fréquemment parmi les populations amérindiennes auraient des origines avant tout génétiques [Neel, 1962]. Au temps des chasseurs-cueilleurs, lorsque les ressources alimentaires étaient encore peu abondantes, la sélection naturelle a favorisé les individus dotés des gènes « économes » qui leur permettaient d'absorber, de stocker ou d'utiliser au mieux les nutriments. Lorsque la quête de la nourriture est devenue moins difficile et le mode de vie plus sédentaire, les mêmes gènes ont contribué à la surcharge pondérale et aux pathologies qui peuvent en découler comme le diabète. Bien que sujette à débat, y compris par Neel lui-même [Prentice *et al*., 2008], cette théorie pourrait expliquer la prédisposition génétique à l'obésité dans nos sociétés où les populations ont accès à une nourriture riche et abondante. En effet, la prise de poids puis le surpoids et l'obésité sont en grande partie les conséquences des « maladaptations » aux transformations sociétales d'un monde dit « moderne » ; elles aboutissent à modifier de façon durable, et en grande partie irréversible, le tissu adipeux [Guy-Grand, 2008]. Et ce n'est sans doute pas un hasard si la prévalence de l'obésité est particulièrement importante dans les populations subissant une mutation culturelle et adoptant un style de vie occidental où l'environnement favorise le gain

de poids en raison de l'abondance de nourriture et du manque d'activité physique [Mutch *et* Clément, 2006 ; Basdevant, 2006 ; Lafontan, 2011].

Comme l'explique Brigitte Bout, dans son rapport parlementaire intitulé « L'organisation de la recherche et ses perspectives en matière de prévention et de traitement de l'obésité » [Bout, 2010], l'obésité est non seulement un défi sociétal mais aussi économique puisqu'elle menace à terme notre système de santé. Les attentes vis-à-vis de la recherche sont donc très fortes afin d'orienter correctement les politiques de prévention et de traitement de l'obésité. Dans l'équipe Nutriomique (Nutrition obésité : approche génétique et transcriptomique) où j'ai réalisé ce stage, différents axes de recherche sont développés majoritairement en relation avec l'état inflammatoire chronique qui caractérise le tissu adipeux des sujets obèses.

Mon travail s'inscrit dans ce contexte et a consisté à étudier l'un des nombreux médiateurs de l'inflammation, le facteur de croissance des colonies de granulocytes (G-CSF). L'objectif du travail de recherche qui m'a été confié était, dans un premier temps, de caractériser G-CSF dans le tissu adipeux blanc humain, puis, dans un second temps, d'étudier son rôle potentiel comme médiateur de la mobilisation des progéniteurs des cellules endothéliales (PCEs). Notre hypothèse de travail était que ces PCEs pourraient jouer un rôle dans la néovascularisation réparatrice du tissu adipeux hypertrophique.

Après un premier chapitre introductif sur l'obésité, je poursuivrai par un deuxième chapitre sur la biologie du tissu adipeux blanc humain en m'axant sur les altérations qu'il subit au cours de l'obésité. Ensuite, dans un troisième et quatrième chapitre, je ferai le point sur les connaissances actuelles sur G-CSF et sur les PCEs. Je terminerai par un chapitre sur la néovascularisation en essayant de mettre en avant l'implication potentielle de G-CSF et des PCEs dans ce phénomène.

Introduction bibliographique

I / L'obésité

I-1/ Définitions de l'obésité

L'obésité est définie, par l'OMS, comme une **accumulation anormale ou excessive de tissu adipeux pouvant engendrer des problèmes de santé** (http://www.who.int/topics/obesity/fr). Définir médicalement l'obésité supposerait, en toute rigueur, que l'on soit capable d'évaluer le pourcentage de masse grasse dans l'organisme. Or cela requiert des méthodes sophistiquées, telles que l'absorption bi-photonique aux rayons X (DEXA), qui sont trop coûteuses pour être utilisées au quotidien [Bout, 2010]. Par convention, l'obésité est donc définie par **un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à trente**. L'IMC correspond au rapport du poids sur le carré de la taille ; il est exprimé en kg/m². Les valeurs prises par l'IMC permettent de distinguer différents « états » en fonction des risques statistiques de morbi-mortalité qui leurs sont statistiquement associés (tableau I) [Guy-Grand, 2008].

Tableau I : Classification des différents « états » en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC), établie par un comité d'experts de l'Organisation Mondiale de la Santé [Guy-Grand, 2008].

IMC (en kg/m²)	Etat	Risque de morbi-mortalité
< 18,5	Maigreur	Elevé
18,5-24,9	« Normal »	Moyen
25-29,9	Surpoids	Augmenté
30-34,9	Obésité modérée (classe I)	Modéré
35-39,9	Obésité sévère (classe II)	Sévère
≥ 40	Obésité massive (classe III)	Très sévère

Si elle est pratique et universellement acceptée, cette définition souffre, néanmoins, de plusieurs faiblesses. Ainsi, elle ne reflète pas la distribution du tissu adipeux dans l'organisme. Or le risque de morbi-mortalité des sujets obèses n'est pas seulement lié à l'IMC, il dépend aussi de la distribution du tissu adipeux dans l'organisme [Guy-Grand, 2008]. Deux formes d'obésité peuvent ainsi être distinguées en fonction de la répartition du tissu adipeux dans l'organisme : **l'obésité abdominale dite androïde** et **l'obésité gynoïde**

(figure 1). Dans le premier cas, les amas graisseux sont localisés, dans la partie supérieure du corps, autour des viscères de la cavité abdominale, alors que, dans le deuxième cas, ils sont répartis, plus uniformément et de façon périphérique, avec une accumulation préférentielle dans la région glutéo-fémorale (hanches-cuisses) [Balistreri *et al*., 2010]. Cette répartition est sexuée ; on parle d'obésité masculine androïde et d'obésité féminine gynoïde. Ces différences de distribution du tissu adipeux s'expliqueraient par l'action des hormones sexuelles (testostérone ou oestrogènes) et trouveraient leur origine dans la sélection naturelle. En effet, la femme stockerait plus facilement les graisses au dessous de l'ombilic car c'est à elle que revient la charge de perpétuer l'espèce. De ce fait, elle doit constituer suffisamment de réserves pour pouvoir assumer une grossesse et un allaitement en période de disette [Frisch, 1978].

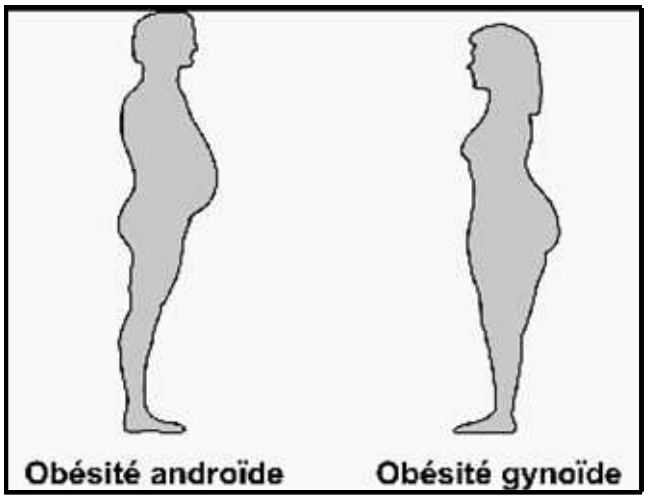


Figure 1 : Répartition du tissu adipeux dans l'obésité androïde et gynoïde

(http://obesite.ulaval.ca/obesite/abdominale/traitement.php).

L'obésité androïde se caractérise par une accumulation de tissu adipeux, dans la partie supérieure du corps, au niveau de la région abdominale, alors que, pour l'obésité gynoïde la répartition du tissu adipeux se caractérise par une répartition plus uniforme et périphérique, avec une accumulation préférentielle dans la région glutéo-fémorale (hanches-cuisses).

De nombreuses études ont démontré que **le risque de morbi-mortalité, associé aux complications résultant de l'obésité, est dépendant de la distribution du tissu adipeux dans l'organisme**. Ainsi, **les patients présentant une obésité androïde ont un risque plus élevé de développer un diabète et des maladies cardiovasculaires**. A l'inverse, l'obésité gynoïde ne représente pas un facteur de risque de complications métaboliques [Ibrahim, 2010] (voir chapitre **I-3/ Complications associées à l'obésité**).

I-2/ Origine multifactorielle des obésités

A première vue, les causes de l'obésité paraissent simples : **l'obésité résulterait d'un déséquilibre de la balance énergétique**. Les apports sont supérieurs aux dépenses ayant pour conséquence une accumulation des graisses dans l'organisme. La relative constance de l'état des réserves énergétiques est assurée par des mécanismes régulateurs (homéostasie énergétique) qui tendent à faire varier en sens contraire entrées et dépenses de façon à compenser les écarts du bilan énergétique. Ces mécanismes régulateurs sont nettement plus efficaces pour lutter contre les déficits que pour compenser les excès car ceux-ci ne présentent pas de conséquence vitale à court terme [Guy-Grand, 2008].

A l'exception de **rares cas d'obésités monogéniques** (syndromes de Prader-Willi, de Bardet-Biedl et d'Alström qui représentent moins de 5% des cas observés), les variants génétiques favorisant **l'obésité polygénique** (dite primaire ou commune) sont des « **gènes de susceptibilité** » agissant en interaction les uns avec les autres et conditionnant un certain degré de vulnérabilité vis-à-vis de l'obésité [Mutch *et* Clément, 2006]. **Les facteurs d'environnement qualifiés « d'obésogènes »** sont multiples, dans les sociétés occidentalisées, et sont les moteurs de « l'épidémie » actuelle d'obésité. Ils peuvent être d'origine alimentaire, environnementale et/ou biologique (figure 2) [Kopelman, 2000 ; Mutch *et* Clément, 2006 ; Guy-Grand, 2008].

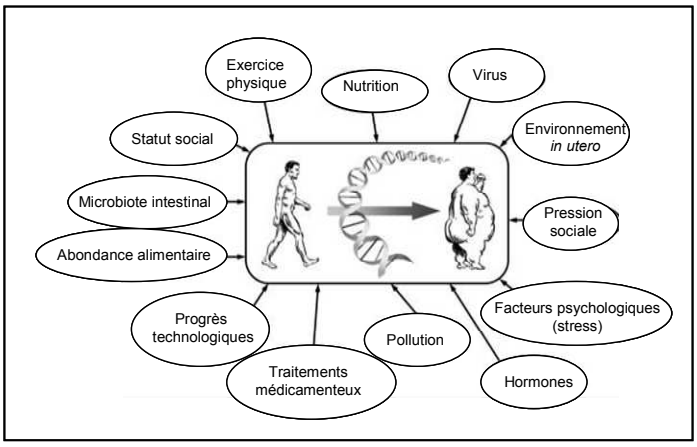


Figure 2 : L'obésité commune, une maladie multifactorielle [Mutch *et* Clément, 2006].
L'obésité est une maladie complexe sous la dépendance de nombreux facteurs : génétiques, sociaux, comportementaux et environnementaux. Elle survient quand un individu, génétiquement prédisposé, se retrouve dans un environnement qui favorise la consommation d'énergie (disponibilité alimentaire) par rapport aux dépenses énergétiques (baisse de l'activité physique liée à la sédentarisation).

La prise de poids, puis l'obésité qui peut à terme en découler, est un processus évolutif qui peut schématiquement être divisé en deux phases. **Une phase dynamique de constitution de l'obésité** où l'individu prend du poids. Celle-ci est souvent interrompue par des événements successifs de perte et de reprise de poids, syndrome du « yoyo » observé lors des régimes hypocaloriques. Au bout d'un certain temps, **le poids se stabilise c'est la phase statique**, le bilan énergétique est à nouveau équilibré [Guy-Grand, 2008].

I-3/ Complications associées à l'obésité

Les complications et les pathologies associées à l'obésité peuvent être classées en quatre catégories auxquelles s'ajoutent les retentissements sociaux sur la vie de l'individu [Kopelman, 2000 ; Basdevant, 2006].

- **Les complications métaboliques** :

Le tissu adipeux viscéral hypertrophique présente une activité lipolytique plus importante que le tissu adipeux sous-cutané et libère les acides gras directement dans la circulation portale, c'est pourquoi l'obésité androïde a un plus mauvais pronostic [Balistreri *et al*., 2010]. Les acides gras ont des effets délétères sur l'action de l'insuline au niveau hépatique et contribuent à **l'augmentation de la néoglucogenèse**. Cela a pour conséquence une production inappropriée de glucose dont la concentration augmente au niveau systémique. Aux premiers stades de l'obésité, le pancréas compense cette augmentation mais **peu à peu une insulinorésistance va se développer**. A terme, **un diabète de type 2 est souvent observé**. L'impact de l'obésité sur le risque de diabète de type 2 est majeur : 75% des patients diabétiques de type 2 sont obèses.

- **Les complications cardiovasculaires** :

Les effets de l'obésité sur la fonction cardiaque sont multiples et complexes. Le développement du tissu adipeux, au cours de l'obésité, s'accompagne d'une augmentation de sa consommation en oxygène ayant pour conséquence une augmentation du volume sanguin circulant. Ceci engendre une augmentation de la pression artérielle ; d'ailleurs, **la prévalence de l'hypertension artérielle est plus élevée chez les sujets obèses**. Le risque de **coronopathie** est d'autant plus élevé que l'obésité est associée au diabète, à une dyslipidémie (augmentation des triglycérides et diminution du cholestérol-HDL) et/ou à une hypertension artérielle. De nombreux travaux s'accordent sur le fait que **l'état inflammatoire chronique,**

observé lors de l'obésité, est la base de la physiopathologie des complications métaboliques et cardiovasculaires [Skurk *et al*., 2007].

- **Les complications respiratoires** :

L'accumulation de graisses autour de la cage thoracique et de l'abdomen restreint les échanges respiratoires et altère donc à terme la fonction respiratoire. Ce phénomène est mécaniquement accentué en position allongée. Les principales complications observées sont le syndrome d'hypoventilation alvéolaire, **le syndrome d'apnée du sommeil (SAS)** et l'hypertension artérielle pulmonaire. La prévalence du syndrome d'apnée du sommeil chez l'obèse pourrait dépasser 40% dans les cas d'obésité massive. Le SAS peut être responsable d'hypertension artérielle systémique, d'hypertension artérielle pulmonaire et de troubles du rythme cardiaque avec risque de mort subite.

- **Autres complications somatiques** :

La surcharge pondérale, en augmentant les contraintes mécaniques des surfaces articulaires, aggrave les malformations de la hanche et des genoux et conduit à l'apparition de **phénomènes d'arthrose**. L'obésité est la première cause d'arthrose du genou chez la femme et la deuxième chez l'homme, après les traumatismes du genou. Ces complications mécaniques, sources de sédentarité et d'impotence, contribuent à entretenir l'obésité en limitant les possibilités d'exercice physique.

L'obésité est associée à **un risque accru de cancer de la prostate et de cancer colorectal** (chez l'homme) **et de cancer de l'endomètre, des voies biliaires, du col de l'utérus, des ovaires et du sein,** après la ménopause (chez la femme). Le dysfonctionnement du tissu adipeux au cours de l'obésité et les diverses modifications qui en résultent, telles que l'insulino-résistance, l'inflammation (...), pourraient expliquer les mécanismes physiopathologiques liant obésité et cancer (pour revue : [van Kruijsdijk *et al*., 2009]).

- **Conséquences psychologiques et sociales** :

La « peur du gras » est devenue un standard culturel renforcé par une médicalisation intempestive. Cette obsession pondérale devient un phénomène de société. La discrimination, la stigmatisation, la culpabilisation dont sont victimes les personnes souffrant d'obésité massive peuvent avoir **des conséquences psychologiques et sociales considérables telles que des difficultés d'intégration pour les enfants et des épisodes de dépression chez l'adulte**.

I-4/ Approches thérapeutiques

Les traitements médicamenteux ne semblent pas avoir d'effet probant à long terme. En effet, l'obésité évolue en plusieurs phases mais une fois qu'elle est constituée (phase statique) il est très difficile de la combattre. Une résistance progressive aux effets des régimes s'installe [Basdevant, 2006]. En effet, plusieurs études ont mis en évidence un remodelage du tissu adipeux au fur et à mesure que l'obésité persiste. Ce tissu devient inflammatoire et se fibrose. Il perd sa capacité à informer le cerveau sur l'état des réserves énergétiques. **L'obésité devient alors une maladie du tissu adipeux**. Cela explique que les régimes amaigrissants hypocaloriques deviennent de moins en moins efficaces. Il faut ajouter que, lors de la répétition des périodes de perte de poids, l'organisme s'adapte en réduisant ses dépenses d'énergie pour éviter la dénutrition : **tout régime rencontre donc une limite « d'efficacité » qui se manifeste par une nouvelle stabilité pondérale** [Guy-Grand, 2008].

A l'heure actuelle, en cas d'obésité massive, **la solution thérapeutique la plus pertinente semble être la chirurgie bariatrique**. L'Institut National de la Santé la préconise pour les patients dont l'IMC est supérieur ou égal à 40 ou pour ceux dont il est supérieur ou égal à 35 et qui souffrent de comorbidités associées (diabète de type 2, hypertension artérielle…), et pour lesquels les autres méthodes non invasives de perte de poids ont échouées [Kopelman, 2005]. Aujourd'hui, la chirurgie bariatrique la plus pratiquée est **la dérivation gastrique** qui associe la réduction du volume de l'estomac et la dérivation du tube digestif afin de diminuer le temps d'absorption intestinale (figure 3). La perte de poids, en moyenne de 15 à 20%, peut dépasser 40 à 50% au bout d'un an. La prévalence des comorbidités et la qualité de vie s'améliorent de façon majeure. L'effet sur l'incidence du diabète est particulièrement marqué [Simon *et al*., 2008]. Malheureusement, il peut aussi y avoir des complications telles qu'une dysphagie (difficulté à avaler), des vomissements, des problèmes de dénutrition qui peuvent être évités par une complémentation en micronutriments [Kopelman, 2005].

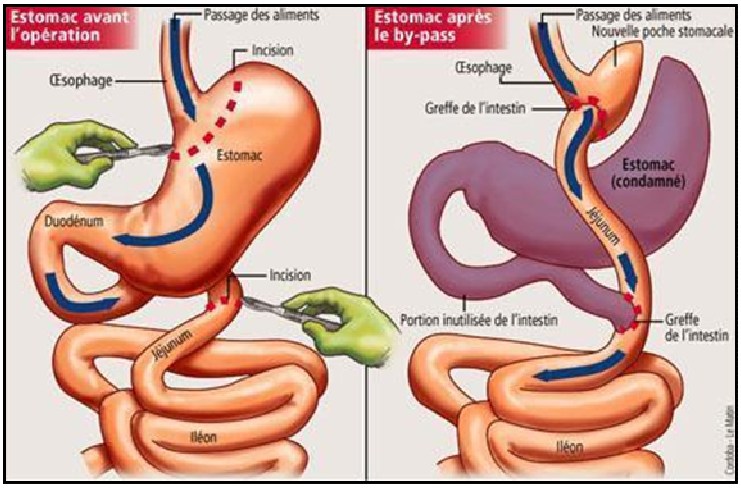


Figure 3 : Schéma "d'un court-circuit" gastrique ("by-pass" gastrique).

(http://fr.dir.groups.yahoo.com/group/Gastric-By-Passers/?v=1&t=directory&ch=web&pub=groups&sec=dir&slk=8)

Cette opération consiste à délimiter une petite poche gastrique (la contenance de l'estomac passe de 2 litres en moyenne à 10-15 millilitres ce qui donne au patient une sensation de satiété précoce) et à « dériver » une partie de l'intestin (ce qui permet de diminuer l'absorption des nutriments).

Le tissu adipeux utilisé dans les expériences est prélevé lors de ces opérations qui sont réalisées sous coelioscopie. La biopsie de tissu sous-cutané est prélevée lors de l'introduction des trocarts et celle de tissu viscéral est prélevée au niveau du tissu adipeux entourant les viscères.

***

Lorsque l'obésité se développe, le tissu adipeux se modifie et devient peu à peu pathologique. Le tissu adipeux est au centre de la pathologie ; il se trouve, en effet, au carrefour de dialogues entre les différents organes (foie, muscle) impliqués dans la régulation de l'homéostasie générale. Le chapitre suivant de cette introduction bibliographique lui est donc consacré. Après l'avoir caractérisé d'un point de vue anatomique et cellulaire, je m'attarderai plus particulièrement sur les modifications qu'il subit au cours de l'obésité.

***

II / Le tissu adipeux blanc humain

Chez l'Homme, le tissu adipeux peut être divisé en deux types de tissus : le tissu adipeux brun et le tissu adipeux blanc. Le tissu adipeux blanc est **le principal réservoir énergétique** de l'organisme et est, également, **un important organe endocrine** qui interagit avec les autres tissus par la sécrétion de molécules bioactives. **La fonction principale du tissu adipeux brun est la régulation de la température corporelle par thermogenèse**.

Bien que plusieurs études aient démontré sa présence chez l'adulte, le tissu adipeux brun a longtemps été considéré comme exclusivement présent chez les jeunes enfants. Sa localisation anatomique (région du cou, de la clavicule, autour des reins et dans le creux de l'aisselle) qui le rend difficile d'accès par des méthodes non invasives a probablement renforcée cette idée. Néanmoins, plusieurs études récentes ont mis en évidence la présence de tissu adipeux brun bioactif chez l'adulte [Svensson, 2011 ; Stephens, 2011]. De façon intéressante, son activité biologique diminue lorsque l'obésité augmente, en faisant une nouvelle cible thérapeutique [Stephens, 2011].

Au laboratoire, nous travaillons uniquement sur le tissu adipeux blanc ; le tissu adipeux brun ne sera donc pas traité dans le chapitre suivant.

II-1/ Localisation anatomique du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux sous-cutané (TASC) et le tissu adipeux profond ou viscéral (TAV) sont les deux dépôts de tissu adipeux blanc les plus étudiés chez l'Homme (figure 4) [Ouchi *et al*., 2011].

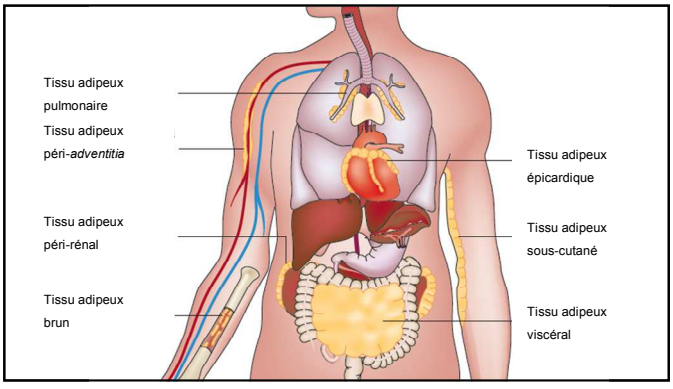


Figure 4 : Les différents dépôts de tissu adipeux chez l'Homme [Ouchi *et al*., 2011].

Le tissu adipeux sous-cutané représente 80% de la masse adipeuse chez un adulte sain. Sa répartition varie en fonction de l'âge et du sexe. Chez l'homme, il se situe surtout dans la partie supérieure du corps (épaule, poitrine, ventre) alors que chez la femme, il se retrouve principalement dans la partie inférieure du corps (fesses, hanches et cuisses) [Ibrahim, 2010]. Il peut lui-même être sous divisé en deux couches physiologiquement différentes (*sub fascia* et *sous fascia*) séparées anatomiquement par le *fascia superficialis* (aponévrose superficielle de l'abdomen) [Kelley *et al*., 2000]. Les travaux étudiant les différences existant entre ces deux dépôts restent assez succincts. Une étude très récente de notre équipe montre que le TASC profond (*sous fascia*) présente un profil (expression augmentée des gènes liés à l'inflammation et présence de macrophages) plus proche du TAV que du TASC superficiel [Tordjman *et al*., 2012]. Dans le cadre de ce mémoire, je me suis seulement intéressée au tissu adipeux sous-cutané superficiel.

Le tissu adipeux profond ou viscéral représente de 10 à 20% de la masse adipeuse chez un adulte de sexe masculin et de 5 à 8% chez une femme non ménopausée. Il est essentiellement de localisation intra-abdominale et correspond au tissu adipeux qui entoure les viscères. Les molécules qu'il sécrète sont déversées directement dans la circulation portale alors que celles sécrétées par le tissu adipeux sous-cutané sont libérées dans la circulation sanguine ; ceci explique en partie le fait que l'hypertrophie du tissu adipeux viscéral ait un plus mauvais pronostic. Il peut lui-même être sous-divisé en deux dépôts : **le tissu adipeux omental**, qui est localisé au niveau du grand omentum ou grand épiploon (structure péritonéale formée par l'accolement de deux feuillets de péritoine qui relient deux viscères entre eux), et **le tissu adipeux mésentérique** qui comme son nom l'indique entoure l'ensemble de l'intestin. La majorité des travaux qui mettent en évidence une causalité entre le tissu adipeux et les comorbidités associées à l'obésité ont été réalisés sur le tissu adipeux omental. Ces deux tissus viscéraux présentent une vascularisation similaire : les molécules, qu'ils sécrètent, passent directement dans la circulation portale. Cependant, le tissu adipeux mésentérique est plus abondant car il recouvre l'ensemble de l'intestin : il mériterait donc d'être plus étudié. Dans le cadre de ce mémoire, pour des raisons de disponibilité des bio-ressources au laboratoire, je me suis seulement intéressée au tissu adipeux omental.

Ces deux dépôts adipeux présentent des différences d'un point de vue morphologique, métabolique et sécrétoire. Les principales différences, montrant un intérêt dans le cadre de notre étude, sont résumées dans le tableau ci-dessous (tableau II).

Tableau II : Principales différences entre le tissu adipeux sous-cutané (TASC) et viscéral (TAV) chez le patient obèse massif [Bruun *et al*., 2004 ; Lafontan , 2008 ; Ibrahim, 2010 ; Fain, 2010 ; Villaret *et al*., 2010 ; Sun *et al*., 2011].

	TASC	**TAV**
Biologie		
Anatomie	Adipocytes de grande taille	Adipocytes de petite taille
Localisation	Périphérique	Abdominale
Fonction	Stockage du surplus énergétique	Métabolique
Facteurs sécrétés		
Adiponectine	–	+
Leptine	+	–
IL-6	–	+
IL-8	–	+
Inflammation		
Infiltration de macrophages	–	+
Vascularisation	–	+

II-2/ Hétérogénéité cellulaire du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc humain renferme des populations cellulaires distinctes qui peuvent être expérimentalement séparées en deux fractions : la **fraction adipocytaire** et la **fraction non adipocytaire** ou **fraction stroma vasculaire** (FSV) [Basdevant, 2006].

Comme son nom l'indique, **la fraction adipocytaire** contient **des adipocytes matures de taille variable et des adipocytes de très petite taille**. Les adipocytes prennent une forme polyédrique et sont séparés par de très nombreux capillaires sanguins dont la perméabilité permet les échanges métaboliques et respiratoires (figure 5) [Basdevant, 2006].

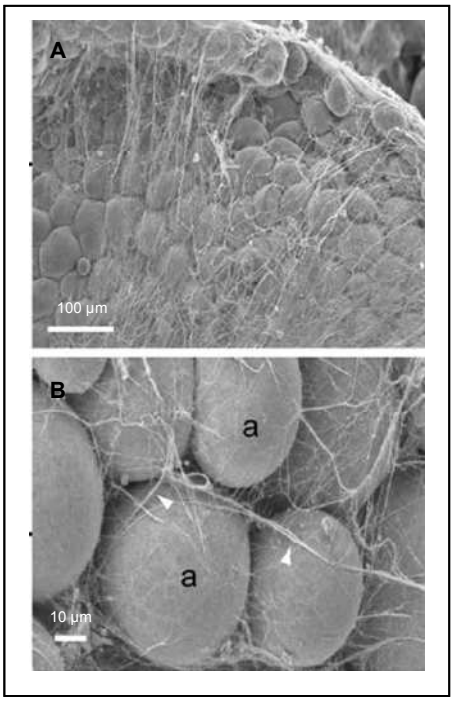


Figure 5 : Photographie en microscopie électronique de tissu adipeux de souris [Chun *et al*., 2006].
A : tissu adipeux ; B : détail d'adipocyte (a) et des fibres de collagène de la matrice extracellulaire (flèche blanche).

La fraction stroma vasculaire est composée d'une population cellulaire très hétérogène renfermant principalement des précurseurs adipocytaires : **les pré-adipocytes**, **des cellules endothéliales microvasculaires**, **des péricytes**, **des macrophages** et autres cellules immunitaires [Basdevant, 2006 ; Mutch *et* Clément, 2006].

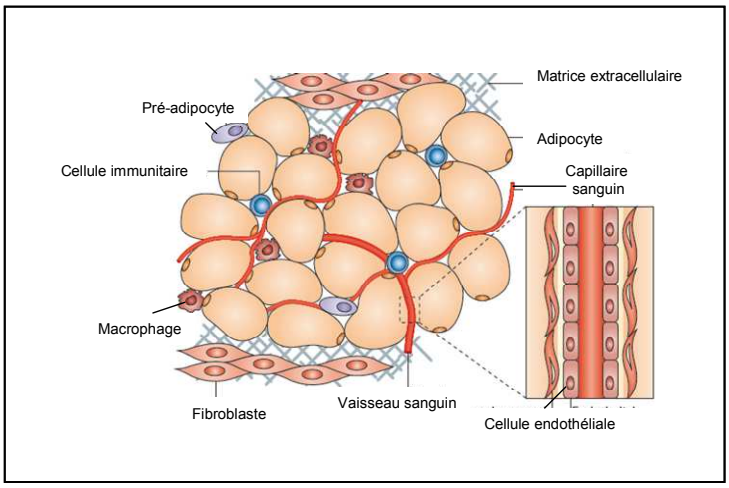


Figure 6 : Schéma des principales cellules du tissu adipeux blanc humain
[Ouchi *et al*., 2011].
Les adipocytes sont les principales cellules composant le tissu adipeux blanc humain. Les autres types cellulaires (pré-adipocytes, cellules endothéliales et cellules immunitaires) constituent la fraction stroma vasculaire.

II-3/ Les fonctions biologiques du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc est le site majeur des réserves énergétiques de l'organisme [Lafontan, 2011]. Les substrats métaboliques (glucose et acides gras en particulier) sont stockés, sous forme de triglycérides, dans la gouttelette lipidique de l'adipocyte. Ils sont obtenus par estérification des trois groupements hydroxyles du glycérol par des acides gras. De plus, « le captage » des acides gras libres est un processus important. En effet, il va ainsi diminuer leur concentration dans le plasma et donc limiter leurs effets délétères sur les autres tissus. Lorsque les capacités de stockage du TASC sont atteintes, les acides gras libres sont stockés dans le TAV.

Jusqu'à la dernière décennie, en dehors de sa fonction d'isolation mécanique et thermique, le tissu adipeux était considéré comme un simple réservoir énergétique [Lafontan, 2008 ; Ouchi *et al*., 2011]. Une étape majeure dans la reconnaissance de son rôle sécréteur a été la mise en évidence de la synthèse, par le tissu adipeux murin, du facteur de nécrose tumoral alpha (TNFα). Cette cytokine est connue pour être impliquée de façon importante dans l'inflammation systémique et dans la réaction de phase aiguë [Hotamisligil *et al*., 1993]. Quelques années plus tard, l'identification et la caractérisation de la leptine au sein du tissu adipeux humain et murin ont considérablement renforcé ce concept [Maffei *et al*., 1995]. **Le tissu adipeux est aujourd'hui reconnu comme un organe endocrine à part entière**.

De nombreuses molécules bioactives ont été reconnues comme étant sécrétées par le tissu adipeux et regroupées sous le terme d'adipokines. Le terme d'adipokine était initialement réservé aux molécules exclusivement sécrétées par l'adipocyte (« adipokine vraie »), puis, par extension, a été attribué à l'ensemble des molécules sécrétées par le tissu adipeux. Effectivement, bien que la leptine et l'adiponectine soient majoritairement sécrétées par les adipocytes, de nombreuses molécules produites par le tissu adipeux ont pour origine la fraction stroma vasculaire du tissu adipeux (80% des sécrétions) [Lafontan, 2008]. Leur diversité structurale et fonctionnelle est importante (tableau III). **Elles peuvent jouer un rôle localement (autocrine ou paracrine) ou à distance (endocrine) plaçant, ainsi, le tissu adipeux au cœur d'un véritable réseau de communication entre les différents organes de l'organisme**.

Tableau III : Principales caractéristiques des adipokines étudiées [Bruun *et al*., 2004 ; Balistreri *et al*., 2010 ; Surmi *et* Hasty, 2010 ; Ouchi *et al*., 2011].

Nom	Source principale	Rôles biologiques
Leptine Hormone	Adipocytes	Contrôle de la prise alimentaire via le système nerveux central (« signal de satiété ») Augmente la sensibilité à l'insuline Action pro-inflammatoire Action pro-angiogénique
Adiponectine Protéine	Adipocytes	Augmente la sensibilité à l'insuline Action anti-inflammatoire
IL-6 Cytokine	Adipocytes et cellules de la fraction stroma vasculaire	Sensibilité à l'insuline (?) Action pro-inflammatoire
IL-8 Chimiokine	Adipocytes et cellules de la fraction stroma vasculaire	Action pro-inflammatoire Chimiotactisme des cellules immunitaires

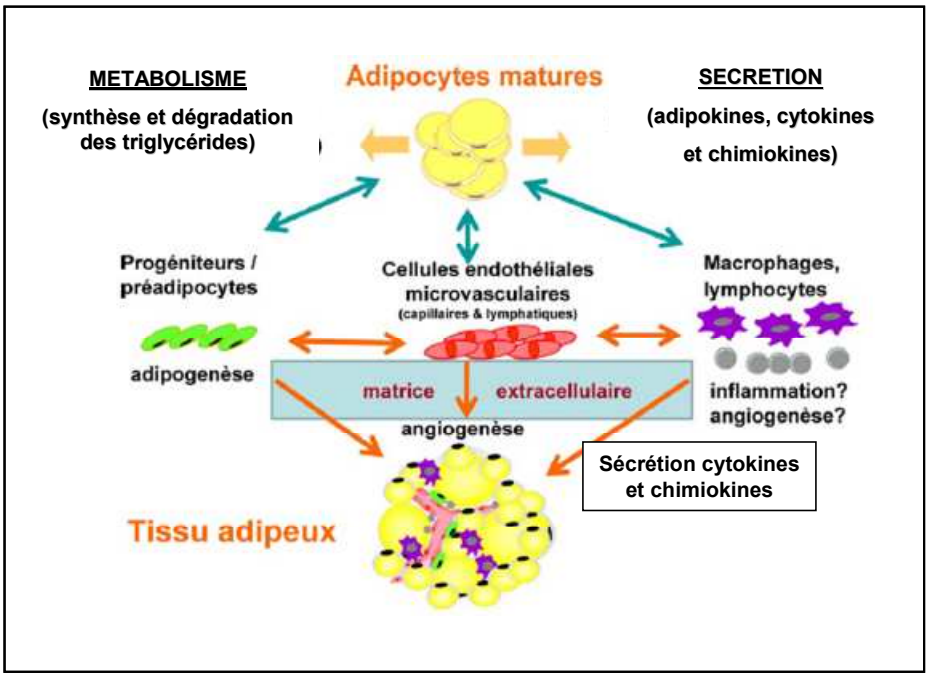


Figure 7 : Schéma des principales fonctions des éléments structuraux essentiels du tissu adipeux [Lafontan, 2011].

Les adipocytes matures assurent des fonctions métaboliques (synthèse et dégradation des triglycérides) et sécrétoires (sécrétion d'adipokines, cytokines et chimiokines). Les pré-adipocytes s'engagent dans l'adipogenèse en se différenciant en adipocytes. Les cellules endothéliales microvasculaires et les péricytes constituent les capillaires dont la perméabilité permet les échanges métaboliques et respiratoires. Les cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes), de part leur fonctions sécrétoires, pourraient participer aux processus d'inflammation et d'angiogenèse caractéristiques du tissu adipeux du sujet obèse.

II-4/ Les altérations du tissu adipeux blanc au cours de l'obésité

Au cours de l'obésité, le tissu adipeux subit de nombreuses transformations aussi bien morphologiques (hypertrophie adipocytaire) que fonctionnelles (altération des fonctions métaboliques, modification des fonctions sécrétoires, infiltration de cellules immunitaires, altération de la vascularisation). Toutes ces modifications conduisent à **un état pathologique du tissu adipeux** (figure 8).

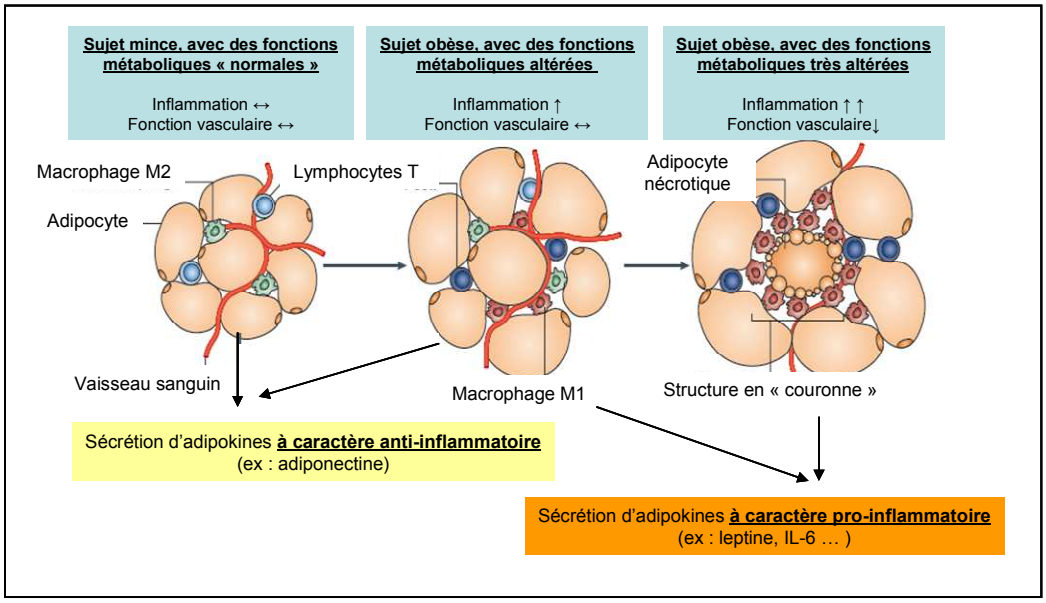


Figure 8 : Altérations du tissu adipeux au cours de l'obésité [Ouchi *et al*., 2011].
Au cours de l'obésité, le tissu adipeux subit de nombreuses transformations : modification des fonctions sécrétoires (diminution de la sécrétion des adipokines à caractère anti-inflammtoire au profit des adipokines à caractère pro-inflammatoire), altération de la fonction vasculaire, infiltration de cellules immunitaires (lymphocytes/macrophages) qui se distribuent en structure en « couronne » autour des adipocytes.

L'hypertrophie (augmentation de la taille des adipocytes, suite à un stockage lipidique accru) **serait le mécanisme majoritairement responsable de l'expansion de la masse adipeuse** [Skurk *et al*., 2007]. L'adipocyte est une cellule d'une grande plasticité et peut multiplier jusqu'à dix fois sa taille initiale [Ledoux *et al*., 2008].

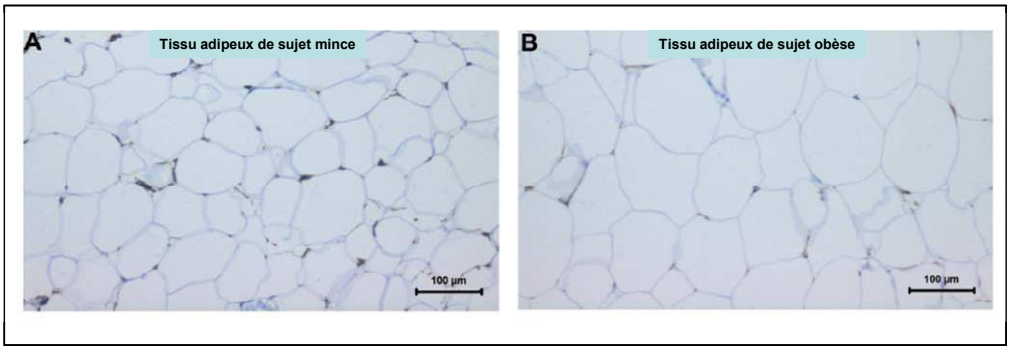


Figure 9 : Photographies de coupes de tissu adipeux sous-cutané de sujet mince et de sujet obèse [Goossens *et al*., 2011].

Coupes histologiques de tissu adipeux sous-cutané de sujet mince (A) et obèse (B) colorées à l'hématoxyline-éosine pour détecter les adipocytes (bleu) et marquées avec des anticorps anti CD31 pour détecter les capillaires (brun).

Les sécrétions du tissu adipeux sont modifiées au cours de l'obésité. **Celles des médiateurs à caractère pro-inflammatoire sont augmentées, à l'inverse, de celle de l'adiponectine (adipokine à caractère anti-inflammatoire) qui est diminuée** [Lafontan, 2011]. L'état inflammatoire du tissu adipeux a été mis en évidence pour la première fois en 1993 dans quatre modèles murins d'obésité [Hotamisligil *et al*., 1993]. Cette étude a montré que l'expression mais aussi la production de facteurs inflammatoires, notamment le TNFα, étaient augmentées dans le tissu adipeux de rongeurs obèses. Depuis, les études se sont multipliées et s'accordent sur le fait que, chez l'Homme comme chez l'animal, l'obésité est caractérisée par une altération majeure de la fonction sécrétoire du tissu adipeux, avec notamment une surproduction de facteurs proinflammatoires. Il est désormais reconnu que **l'obésité est associée à un état inflammatoire chronique, de faible intensité, évoluant à bas bruit** [Fain, 2010 ; Ouchi *et al*., 2011]. Ce concept repose sur l'observation que les sujets obèses présentent une augmentation modérée, mais chronique, des taux circulants de médiateurs de l'inflammation. En effet, des études ont montré une élévation des concentrations circulantes de molécules pro-inflammatoires chez des sujets obèses par rapport à des sujets normopondéraux (IL-6, TNFα). Notre équipe a montré que la perte de poids induite par une restriction calorique diminue l'expression des gènes liés à l'inflammation dans le tissu adipeux sous-cutané de patients obèses [Clément *et al*., 2004].

Chez le sujet obèse, **le tissu adipeux montre une accumulation de macrophages qui est corrélée à l'hypertrophie adipocytaire et à l'IMC**. Notre équipe a montré que les macrophages, probablement dérivés des monocytes circulants, qui infiltrent le tissu adipeux

des sujets obèses, **se distribuent typiquement en « rosettes » ou en « couronne » autour des adipocytes** et, parfois, se fusionnent en cellules géantes (figure 10). Ce phénomène témoigne vraisemblablement d'une activité inflammatoire locale [Cancello *et al*., 2006]. Par ailleurs, une réduction de l'accumulation des macrophages et une redistribution de ces cellules autour des arbres vasculaires ont été observées, en réponse à une perte de poids rapide et importante chez des femmes massivement obèses, soulignant le caractère réversible de cette inflammation [Cancello *et al*., 2005]. **Ces macrophages sécrètent la majorité des cytokines inflammatoires et jouent un rôle important dans l'initiation et la progression des désordres métaboliques en infiltrant la membrane des vaisseaux sanguins** [Surmi *et* Hasty, 2010].

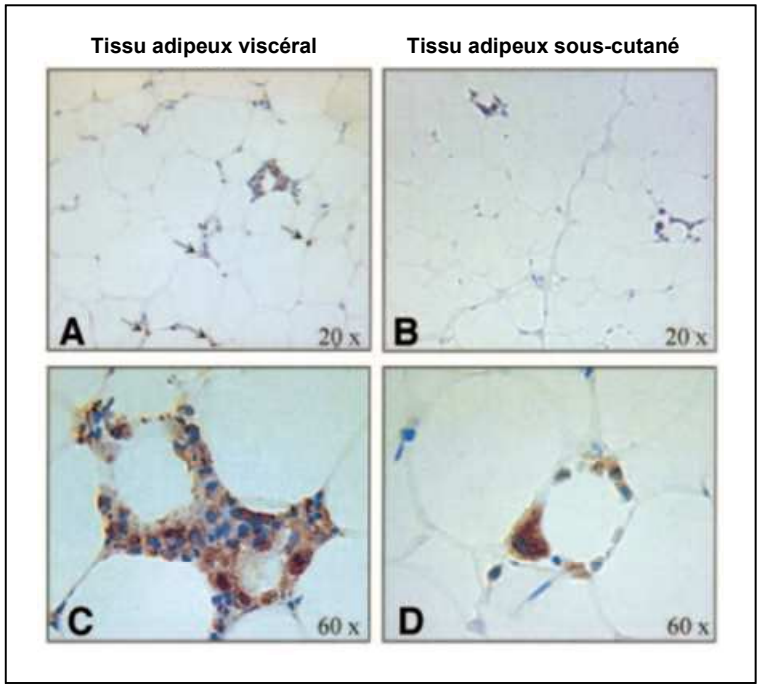


Figure 10 : Photographies de coupes de tissu adipeux sous-cutané et viscéral d'un sujet obèse [Cancello *et al*., 2006].

Coupes histologiques de tissu adipeux sous-cutané (B et D) et viscéral (A et C) d'un sujet obèse. Le marquage HAM56 (brun) permet de visualiser les macrophages. Au grossissement 60, les structures typiques en forme de « rosettes » ou en « couronne » sont visibles.

Un remaniement de la vascularisation peut être observé au cours de l'obésité : **raréfication des capillaires sanguins** et **augmentation des gros vaisseaux**. De plus, les sécrétions diminuées de molécules anti-inflammatoires peuvent conduire à une perméabilisation de l'endothélium vasculaire. En parallèle, les sécrétions augmentées de molécules pro-inflammatoires activent les cellules endothéliales qui expriment des molécules

d'adhésion et sécrètent des facteurs chimioattractants qui accélèrent les processus inflammatoires [Ouchi *et al*., 2011]. De plus, des travaux récents visant à comparer le TASC et le TAV chez l'obèse ont montré que **les cellules endothéliales du TAV montrent un état pro-inflammatoire et angiogénique plus marqué que celles du TASC**, suggérant une contribution des cellules endothéliales du TAV à l'inflammation. Ce phénotype pourrait s'expliquer par l'observation d'**une sénescence prématurée des cellules endothéliales** [Villaret *et al*., 2010].

***

De nombreux médiateurs à caractère inflammatoire et angiogénique sont impliqués dans l'obésité. L'objectif de mon stage est d'étudier le rôle potentiel de l'un d'eux dans le tissu adipeux : le facteur de croissance des colonies de granulocytes. Le chapitre suivant lui est consacré.

***

III / Le facteur de croissance des colonies de granulocytes

III-1/ Découverte

Suite à la découverte de l'érythropoïétine (1949) et de son rôle dans la maturation des précurseurs des hématies, des recherches ont été entreprises afin d'identifier les molécules régulant la leucopoïèse. Jusqu'au milieu des années 60, ces recherches sont restées vaines et il a fallu attendre la mise au point de nouvelles techniques de culture (géloses semi solides d'agar) pour réussir à cultiver des colonies matures de granulocytes et de macrophages à partir de leurs précurseurs médullaires. **L'obtention de ces colonies étant dépendante de la présence de facteurs extérieurs, ceux-ci prirent le nom de « facteur de croissance des colonies »**. Les quatre cytokines hématopoïétiques isolées ont été nommées en fonction du type cellulaire qu'elles stimulaient majoritairement : l'interleukine 3 (IL-3), le facteur de croissance des colonies de macrophages (M-CSF), le facteur de croissance des colonies de macrophages et de granulocytes (GM-CSF) et **le facteur de croissance des colonies de granulocytes (G-CSF)** [Metcalf, 2010].

III-2/ Du gène à la protéine

Le facteur de croissance des colonies de granulocytes, anciennement nommé « facteur de croissance des colonies numéro trois » (CSF-3), est **une cytokine hématopoiétique**. Il a été purifié, en 1983, chez la souris et deux années plus tard chez l'Homme [Metcalf, 2010]. La même année, Nagata et ses collaborateurs ont cloné l'ADN complémentaire de G-CSF chez l'Homme [Nagata *et al*., 1986].

Son gène s'étend sur 2,5 kb et est **localisé sur le chromosome 17** en position 17q11-22 au niveau du point de cassure de la translocation t (15 ; 17) retrouvée dans certaines leucémies. Il est composé de **cinq exons**. Par des mécanismes d'épissage alternatif de l'ARN messager, deux transcrits peuvent être synthétisés [Demetri *et* Griffin, 1991]. Ils sont ensuite **traduits en deux glycoprotéines fonctionnelles, une de 174 acides aminés et l'autre de 177 acides aminés**. La forme la plus courte est celle qui est majoritairement synthétisée et c'est la plus active pour stimuler la prolifération des progéniteurs des granulocytes. Les protéines contiennent chacune deux ponts dissulfures et sont glycosylées au niveau de la thréonine 133 [Demetri *et* Griffin, 1991].

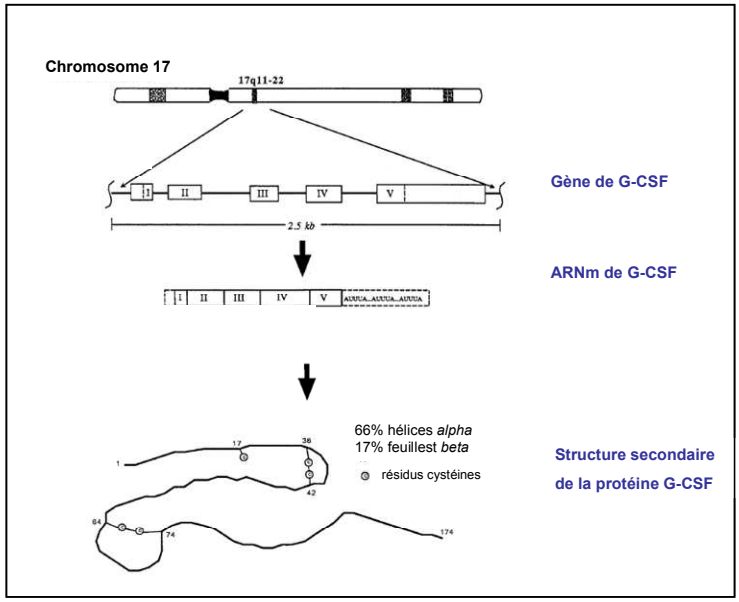


Figure 11 : Du gène à la structure secondaire du facteur de croissance des colonies de granulocytes (G-CSF) [Demetri *et* Griffin, 1991].

Le G-CSF est sécrété majoritairement par les monocytes, les macrophages et les neutrophiles activés mais peut également être produit par les cellules stromales, les fibroblastes et les cellules endothéliales. **Sa production n'est pas constitutive mais induite par de nombreux médiateurs de l'inflammation** (par exemple le LPS, le TNFα). **En condition physiologique, il est quasiment indétectable au niveau systémique** (entre 30 et 163 pg/mL) **mais augmente considérablement lors des épisodes infectieux** (entre 30 et 3199 pg/mL) [Panopoulos *et* Watowich, 2008].

III-3/ Le récepteur du facteur de croissance des colonies de granulocytes

Le récepteur de G-CSF est **une protéine transmembranaire d'environ 150 kDa** qui appartient à la superfamille des récepteurs hématopoïétiques ou cytokines de classe I [Avalos, 1996]. Il a été cloné pour la première fois en 1990 [Layton *et* Hall, 2006].

Il est présent à la surface de nombreuses cellules et est retrouvé, de façon non exhaustive, **à la surface des cellules hématopoïétiques** (granulocytes neutrophiles matures, progéniteurs myéloïdes, cellules souches hématopoïétiques, monocytes et lymphocytes) ainsi **qu'à la surface de cellules non hématopoïétiques telles que les cellules endothéliales**, les cardiomyocytes [Sanganalmath *et al*., 2011], les précurseurs neuronaux et les cellules du tissu placentaire [Liongue *et al*., 2009].

L'expression des récepteurs de G-CSF augmente avec le degré de maturation : parmi les cellules de la lignée granulocytaire, ce sont les neutrophiles qui possèdent le plus grand nombre de récepteurs de G-CSF à leur surface [Panopoulos *et* Watowich, 2008]. Malgré tout **ce nombre reste très faible** : 50 à 500 récepteurs par cellule [Metcalf, 2010], cela pourrait s'expliquer par **la très forte affinité que possède le récepteur activé pour son ligand**. En effet, l'affinité du récepteur activé pour son ligand est de l'ordre de 0,2 à 0,5 pM [Anderlini *et* Champlin, 2008].

Le récepteur de G-CSF est composé de trois régions : **un domaine extracellulaire qui permet la liaison avec son ligand**, **un domaine transmembranaire** et **un domaine intracellulaire qui assure la transmission des signaux** vers les différentes molécules impliquées dans les différentes voies de transduction (figure 12) [Liongue *et al*., 2009].

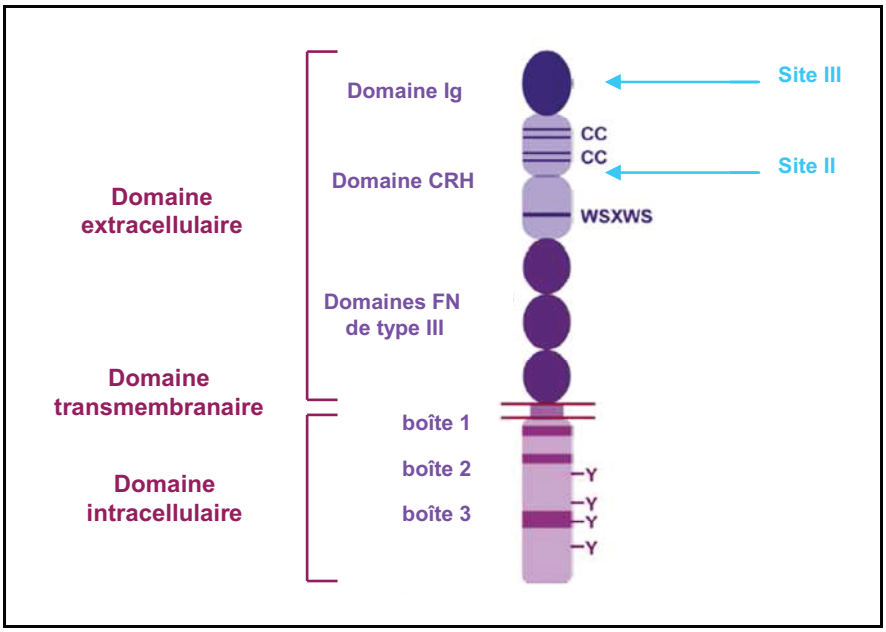


Figure 12 : Schéma de la structure du récepteur du facteur de croissance des colonies de granulocytes [Layton *et* Hall, 2006 ; Liongue *et al*., 2009].

Le récepteur du facteur de croissance des colonies de granulocytes est constitué de trois domaines :

- **un domaine extracellulaire**, lui-même composé : d'un domaine homologue aux immunoglobulines (domaine Ig), d'un domaine homologue aux récepteurs des cytokines (domaine CHR) et de trois domaines homologues à la fibronectine de type III (domaine FN III). Dans la région N-terminale se situent quatre résidus cystéines conservés (C) et dans la région C-terminale se trouve le motif WSXWS commun à tous les récepteurs de cytokines ;
- **un domaine transmembranaire** ;
- **un domaine intracellulaire**, lui-même composé de trois boîtes et de quatre résidus tyrosine (Y) qui une fois activés servent de point d'ancrage aux protéines à domaine SH2.

Il comprend deux sites de liaison (site II et III) pour son ligand, le facteur de croissance des colonies de granulocytes.

Abréviations : C : cystéine; W : tryptophane; S : sérine; X : acide amine ; Y : tyrosine.

La partie extracellulaire contient **un domaine homologue aux immunoglobulines** (domaine Ig), **un domaine homologue aux récepteurs des cytokines** (domaine CHR) et **trois domaines homologues à la fibronectine de type III** (domaine FN III) [Liongue *et al*., 2009]. Dans la région N-terminale se situent **quatre résidus cystéine conservés** (C) et dans la région C-terminale se trouve **le motif WSXWS commun à tous les récepteurs de cytokines**. La région N-terminale est suffisante pour assurer la liaison du ligand mais la région C-terminale est nécessaire pour avoir une liaison de haute affinité et permettre l'oligomérisation du récepteur conduisant à la transduction du signal. Elle renferme **deux sites de liaison pour le ligand G-CSF** : le premier site (nommé III) est localisé au niveau du domaine Ig et le second site (nommé II) se situe entre les deux boîtes du domaine CHR [Layton *et* Hall, 2006].

La partie intracellulaire (ou domaine cytoplasmique) contient **quatre résidus tyrosine conservés** (Y) qui, une fois phosphorylés, constituent autant de points d'ancrage pour des protéines à domaine SH2, **deux boîtes 1 et 2 impliquées dans l'activation du récepteur** et **une boîte 3 importante pour la transduction du signal** [Liongue *et al*., 2009].

III-4/ Voies de transduction du signal

La stochiométrie du récepteur de G-CSF activé est de 2 : 2 soit deux molécules de G-CSF pour deux chaînes polypeptidiques. En effet, le récepteur de G-CSF est constitué d'une chaîne polypeptidique unique qui forme des complexes homo-oligomériques sous l'effet de la fixation d'un dimère de G-CSF [Layton *et* Hall, 2006 ; Panopoulos *et* Watowich, 2008].

Le récepteur de G-CSF est dépourvu d'activité tyrosine kinase intrinsèque [Layton *et* Hall, 2006]. Il est en revanche **couplé à des tyrosines kinases intracellulaires** au niveau de son domaine cytoplasmique, entre les boîtes 1 et 2. Celles de **la famille des Janus Kinases (JAK) jouent un rôle majeur dans l'induction de la réponse cellulaire** [Roberts, 2005].

Suite à la fixation de son ligand, **le récepteur est dimérisé** ce qui provoque **la trans-phosphorylation des tyrosines kinases de la famille JAK** par rapprochement des deux chaînes polypeptidiques du récepteur**.** Une fois activées **les JAK vont phosphoryler les résidus tyrosines du récepteur et d'autres protéines cytoplasmiques permettant le recrutement de messagers secondaires** [Panopoulos *et* Watowich, 2008].

Ces associations protéines-protéines permettent **l'activation de plusieurs cascades de signalisation intracellulaires** dont les plus importantes sont les suivantes (figure 13) [Panopoulos *et* Watowich, 2008 ; Sanganalmath *et al*., 2011] :

- La voie JAK/STAT
- La voie PI3K/Akt
- La voie MAPK

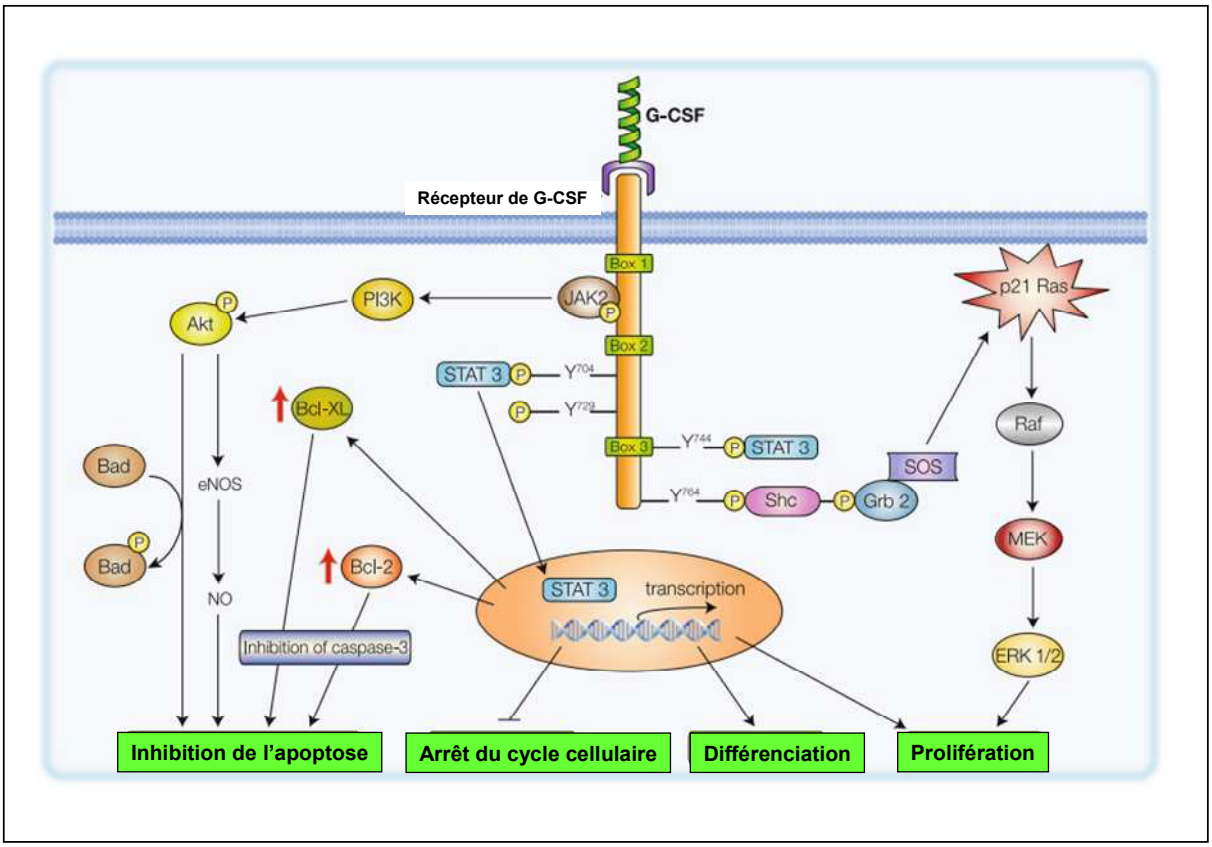


Figure 13 : Principales voies de signalisation mises en jeu lors de l'activation du récepteur du facteur de croissance des colonies de granulocytes [Sanganalmath *et al*., 2011].

La principale voie de signalisation est la voie JAK/STAT. Une fois activées les tyrosines kinases JAK induisent la phosphorylation des résidus tyrosine du domaine cytoplasmique de G-CSF. **Les protéines cytoplasmiques STAT vont alors être recrutées** par ces résidus tyrosines phosphorylés (Y), via leur domaine SH2, et **seront à leur tour phosphorylées**. **Les protéines STAT vont alors s'oligomériser** (homo ou hétérodimères) ; **être transloquées dans le noyau et se fixer à l'ADN au niveau des promoteurs des gènes cibles dont elles vont activer la transcription** [Kamezaki *et al*., 2005 ; Panopoulos *et* Watowich, 2008]. **STAT3 induit un signal de différenciation cellulaire et de prolifération**. STAT3 est spécifiquement phosphorylée par G-CSF, STAT1 et STAT5 le sont aussi mais de façon moins importante [Kamezaki *et al*., 2005].

La protéine adaptatrice Shc est recrutée au niveau du résidu tyrosine Y764 qui est essentiel pour la transmission d'un signal prolifératif maximal. **Le complexe Grb2/SOS se fixe à cette protéine adaptatrice**. Grb2 est une molécule adaptatrice et SOS un facteur d'échange qui est capable de remplacer le GDP de Ras par du GTP et ainsi **d'activer**

Ras et d'initier **la voie de signalisation RAS/Raf/MAPK** [Roberts, 2005]. Une fois activée **Ras active Raf**. Cette dernière va alors **phosphoryler MEK** ce qui va permettre l'activation, par phosphorylation, de différentes MAPK telles que **les protéines ERK1/2**, p38MAPK, ERK5 ou JKN. ERK sera ensuite transloqué dans le noyau où il activera certains facteurs de transcription précoces. Ces facteurs de transcription activent l'expression de certains gènes comme ceux de c-fos, de l'oncostatine M, de l'IRF-1, de l'egr-1 ou du fibrinogène [Panopoulos *et* Watowich, 2008].

La voie de signalisation PI3K est impliquée dans l'inhibition de l'apoptose [Sanganalmath *et al*., 2011]. Les PI3K appartiennent à une famille d'enzymes qui phosphorylent les lipides inositols des membranes en position trois du groupe inositol. Les lipides membranaires phosphorylés vont alors servir de point d'ancrage à deux protéines kinases du type phosphoinositide dépendante kinase (PDK) : PDK1 et Akt [Liongue *et al*., 2009]. Akt est phosphorylée et ainsi une fois activée elle phosphoryle **les protéines Bad** qui sont impliquées dans l'induction de l'apoptose via la formation de pores dans la membrane mitochondriale [Sanganalmath *et al*., 2011].

La régulation négative de la réponse cellulaire de G-CSF met en jeu principalement deux protéines : **SOCS3 et SHIP**. **SOCS3** agit directement et spécifiquement au niveau de la tyrosine Y729 quand celle-ci est phosphorylée ; il inhibe l'activité kinase des JAK et bloque par compétition la fixation des protéines STAT. Il semble exercer un rétrocontrôle négatif pour limiter l'intensité et la durée des effets de la voie de signalisation de G-CSF. **SHIP** s'associe avec la protéine adaptatrice Shc et agit comme **régulateur négatif de PI3K** [Roberts, 2005].

III-5/ Activités biologiques du facteur de croissance des colonies de granulocytes

En tant que facteur de croissance son rôle principal est naturellement **de stimuler la prolifération et la différenciation des progéniteurs de la lignée granulocytaire** et **d'induire la migration des polynucléaires neutrophiles au niveau systémique** [Panopoulos *et* Watowich, 2008 ; Metcalf, 2010]. Des expériences d'invalidation du gène de G-CSF ou de son récepteur chez la souris ont confirmé ce rôle puisque les souris présentent des neutropénies [Panopoulos *et* Watowich, 2008]. Cette propriété du G-CSF est d'ailleurs utilisée en thérapeutique. Les neutropénies sont l'un des effets secondaires néfastes des

chimiothérapies. En effet, elles prédisposent les patients à de sérieuses complications (infections, fièvres…) et compromettent le bon déroulement des protocoles de chimiothérapie. L'avantage d'un traitement avec la forme humaine recombinante de G-CSF est double, il permet une meilleure efficacité (les doses-intensités des schémas thérapeutiques peuvent être respectées) et présente un avantage économique (temps d'hospitalisation plus court du fait qu'il y ait moins de complications). Il est également utilisé en hématologie pour soigner les neutropénies [Anderlini *et* Champlin, 2008].

G-CSF est connu pour avoir **un effet sur la mobilisation des cellules et notamment des cellules souches**. Il est capable de mobiliser les cellules souches hématopoïétiques et **des études prospectives récentes lui attribuent également un pouvoir de mobilisation des progéniteurs des cellules endothéliales** [Anderlini *et* Champlin, 2008 ; Resch *et al*., 2011] (voir chapitre **V-4/ Rôle potentiel des progéniteurs des cellules endothéliales dans la néovascularisation**). Cette propriété du G-CSF est utilisée afin de favoriser la mobilisation des cellules souches à des fins transfusionnelles [Anderlini *et* Champlin, 2008].

G-CSF **améliore les fonctions clés des neutrophiles** telles que l'explosion oxydative, la dégranulation, la phagocytose et le chimiotactisme [Yamada *et al*., 2002 ; Roberts, 2005].

Des travaux récents montrent également **un effet de G-CSF sur les cellules endothéliales** [Park *et al*., 2008]. Il agirait à la fois directement en augmentant leur viabilité et leur migration (par la voie Akt/eNOS) et indirectement en augmentant (via l'élévation de la production d'IL-6 par les monocytes) la production de la protéine C réactive par les hépatocytes. Le premier effet est positif alors que le second est délétère.

Récemment G-CSF s'est révélé être impliqué dans d'autres systèmes que le système hématopoïtétique. Il pourrait avoir **des effets protecteurs et agir sur la régénération** de plusieurs tissus dont le cerveau, le cœur et les os [Liongue *et al*., 2009].

***

Le facteur de croissance des colonies de granulocytes semble jouer un rôle dans la mobilisation des cellules souches et des progéniteurs. Le chapitre suivant sera consacré au modèle que nous avons utilisé, les progéniteurs des cellules endothéliales, pour étudier le rôle

potentiel du facteur de croissance des colonies de granulocytes dans le tissu adipeux au cours de l'obésité.

***

IV / Les progéniteurs des cellules endothéliales

IV-1/ Origine et différenciation des progéniteurs des cellules endothéliales

Il existe quatre types de cellules « souches », classées selon leurs capacités à s'auto-renouveler et à produire des cellules différenciées (figure 14) :

- les cellules souches totipotentes peuvent donner naissance à tous les types cellulaires et donc assurer le développement d'un organisme entier ;
- les cellules souches pluripotentes peuvent donner naissance à tous les types cellulaires à l'exception du placenta ;
- les cellules souches multipotentes peuvent seulement se différencier en un lignage cellulaire ; par exemple, les cellules souches hématopoïétiques sont des cellules multipotentes uniquement capables de se différencier en cellules sanguines ;
- les cellules souches unipotentes (ou progéniteurs) ne peuvent donner qu'un seul type de cellule, leurs capacités d'auto-renouvellement et de prolifération étant plus limitées ; ce sont, par exemple, **les progéniteurs des cellules endothéliales** [Sieveking *et* Ng, 2009].

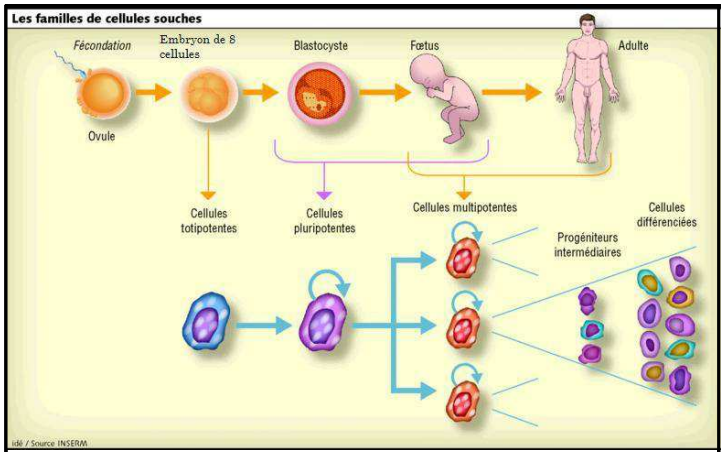


Figure 14 : Les différentes classes de cellules souches (source INSERM).

Les cellules souches présentent différents stades de différenciation et sont classées en fonction de leur capacité à s'auto-renouveler et à produire des cellules différenciées. Il existe quatre classes de cellules souches: les cellules totipotentes qui peuvent donner tout type de cellule, les cellules pluripotentes qui peuvent donner plusieurs types cellulaires, les cellules multipotentes qui sont spécifiquement dévolues à une fonction et les cellules unipotentes (ou progéniteurs) qui ne peuvent donner qu'un seul type de cellule.

A l'heure actuelle, des doutes subsistent sur l'origine exacte de ces PCEs. **L'hémangioblaste** semblerait être l'ancêtre commun des progéniteurs de la lignée hématopoïétique et de la lignée endothéliale (figure 15) [Asahara *et* Kawamoto, 2004 ; Smadja *et al*., 2007 ; Sieveking *et* Ng, 2009]. En effet, il exprime à sa surface à la fois le marqueur membranaire des cellules souches hématopoïétiques (CD34) et un marqueur endothélial : le récepteur de type 2 du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF-R2), aussi connu sous le nom de « récepteur à domaine kinase » (KDR) [Asahara *et* Kawamoto, 2004].

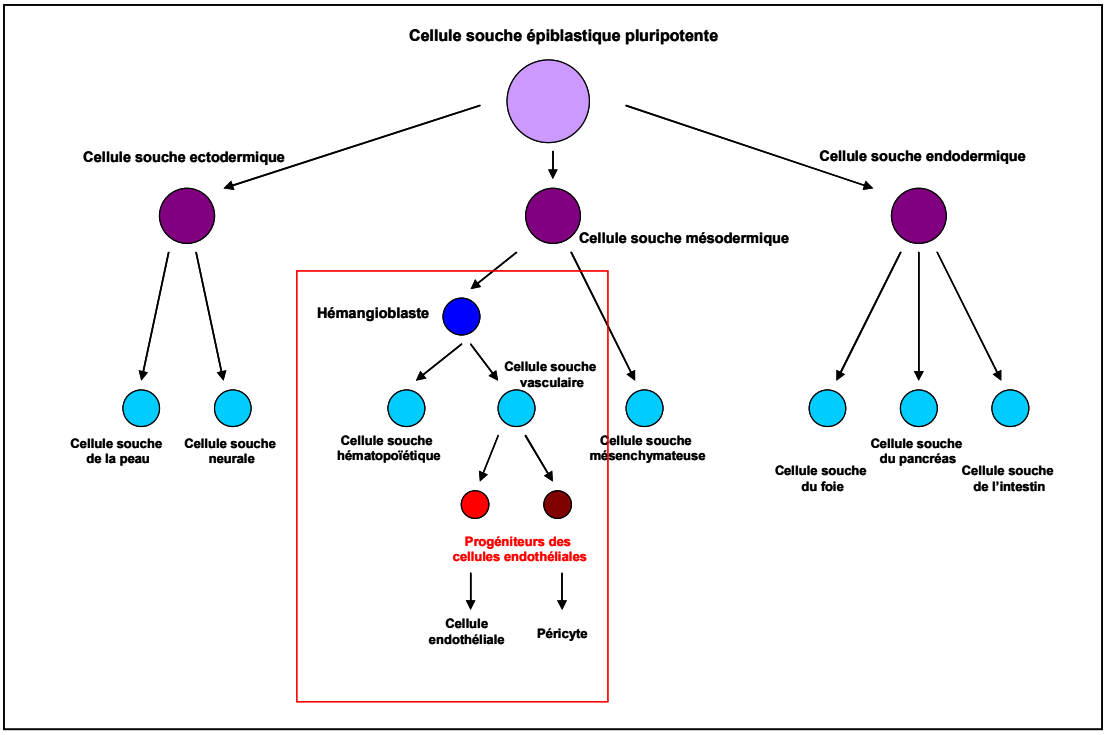


Figure 15 : Origine potentielle des progéniteurs des cellules endothéliales

[Asahara *et* Kawamoto, 2004].

L'hémangioblaste serait l'ancêtre commun des progéniteurs de la lignée hématopoïétique et de la lignée endothéliale. Les progéniteurs des cellules endothéliales seraient capables de donner naissance à des cellules endothéliales et à des péricytes (type particulier de cellules musculaires lisses, entourant l'endothélium des capillaires).

IV-2/ Isolement et mise en culture des progéniteurs des cellules endothéliales

Les progéniteurs des cellules endothéliales ont été mis en évidence pour la première fois (chez l'adulte) **par Ashara en 1997**. Les PCEs ont été décrits comme des cellules immatures, exprimant à la fois le CD34 et le VEGF-R2, et pouvant être mobilisés à

partir de la moelle osseuse jusqu'aux sites d'ischémie et/ou étant capables de faciliter la formation de nouveaux vaisseaux. En pratique, ces cellules ont été isolées, à partir de sang périphérique humain, par sélection positive de l'antigène membranaire CD34 à l'aide de billes magnétiques. Elles se sont différenciées *in vitro* en cellules présentant un phénotype endothélial, exprimant plusieurs des antigènes endothéliaux tels que le VEGF-R2, le CD31 ou l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS). Afin de savoir si ces cellules pouvaient contribuer *in vivo* à la néovascularisation, elles ont été injectées dans des modèles d'ischémie aigüe de la patte chez la souris et le lapin. Elles se sont incorporées au niveau des territoires ischémiques. Ces découvertes ont donc suggéré un rôle potentiel des PCEs dans la néovascularisation et ont de ce fait suscité de nombreux espoirs, notamment dans le traitement des ischémies cardio-vasculaires [Asahara *et al*., 1997].

Les sources de PCEs sont nombreuses et variées. De façon non exhaustive, outre du sang périphérique, chez l'adulte, ils peuvent être isolés à partir de la moelle osseuse [Smadja *et al*., 2007] et du tissu adipeux [Miranville *et al*., 2004]. Ils sont aussi retrouvés dans le foie foetal [Smadja *et al*., 2007] et dans le sang de cordon ombilical [Ingram *et al*., 2004]. Il serait toutefois plus facile d'obtenir des colonies de type endothélial issues des PCEs à partir de sang de cordon ombilical qu'à partir de sang périphérique. En effet, leur nombre est quinze fois plus important à partir du sang de cordon qu'à partir du sang périphérique. De plus, ces colonies sont plus volumineuses et apparaissent en moyenne une semaine plus tôt [Ingram *et al.*, 2004].

Les nombreux travaux consacrés à la biologie des PCEs au cours de ces dernières années font apparaître une forte hétérogénéité cellulaire. En culture, au moins deux types de cellules sont obtenus : **les PCEs précoces** (qui apparaissent en moyenne après 5 jours de culture) et **les PCEs tardifs** (qui apparaissent après 14 à 21 jours de culture). Les PCEs dits précoces sont semblables à ceux isolés initialement par Asahara en 1997 [Sieveking *et* Ng, 2009]. Le temps d'émergence en culture de ces deux types cellulaires a permis de réaliser cette classification et ainsi de clarifier leur dénomination. En effet, auparavant, ces différents types cellulaires étaient indistinctement dénommés PCEs.

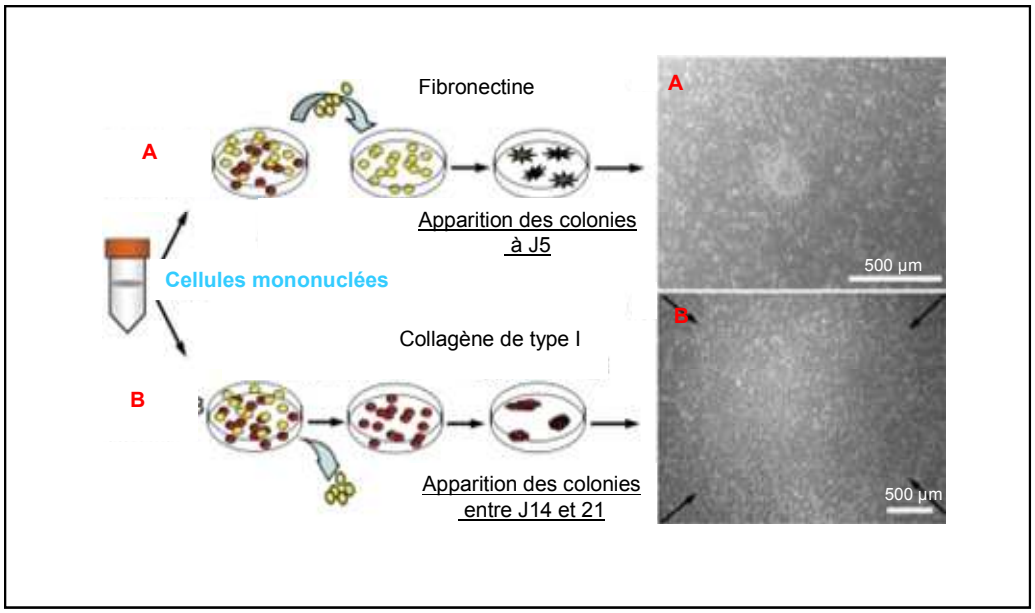


Figure 16 : Isolement et mise en culture des progéniteurs des cellules endothéliales

[Yoder *et al*., 2007].

Il existe deux techniques principales de mise en culture des progéniteurs des cellules endothéliales (PCEs) à partir des cellules sanguines mononuclées isolées sur gradient de Ficoll® : les cellules sont cultivées soit sur fibronectine (A) soit sur du collagène de type I (B). Dans le cadre de la technique (A), les cellules n'ayant pas adhéré (en jaune) au bout de 48H00 de culture sont collectées et réensemencées sur une boîte recouverte de fibronectine. A l'inverse, dans le cadre de la technique (B), les cellules non adhérentes (en jaune) sont éliminées et seules les cellules ayant adhéré sont cultivées sur une boîte recouverte de collagène de type I. Les cellules cultivées sur une matrice de fibronectine apparaissent plus tôt en culture (PCEs précoces) à l'inverse des cellules cultivées sur une matrice de collagène de type I (PCEs tardifs).

Comme on peut le voir sur les photographies ci-dessus, les PCEs précoces et tardifs n'ont pas le même aspect. **Les colonies de PCEs précoces montrent un aspect hétérogène et sont de forme allongée, comme une aiguille, alors que les colonies de PCEs tardifs montrent une plus grande homogénéité et ont un aspect pavimenteux** [Yoder *et al*., 2007 ; Sieveking *et* Ng, 2009].

IV-3/ Caractérisation des progéniteurs des cellules endothéliales

IV-3-1/ Caractérisation phénotypique

Depuis la découverte d'Ashara, une littérature abondante n'a cessé de tenter de mieux définir phénotypiquement les PCEs. **Pour rester en accord avec le terme de progéniteur endothélial, il est nécessaire d'être à la fois en présence de marqueurs de cellules**

immatures ou de cellules souches et à la fois en présence de marqueurs endothéliaux [Fadini *et al*., 2008]. Chez l'Homme, les marqueurs les plus communs pour les cellules souches sont le CD34 et le CD133 (présent sur les cellules plus immatures) et ceux les plus utilisés pour les marqueurs endothéliaux sont le VEGF-R2, le CD31 et le facteur de von Willebrand (vWF) [Fadini *et al*., 2008].

Pendant longtemps, la combinaison des trois marqueurs suivants : CD133, CD34 et VEGF-R2 était utilisée pour définir les PCEs [Sieveking *et* Ng, 2009]. Des études récentes montrent cependant que les cellules CD133 ne seraient pas des PCEs [Fadini *et al*., 2008 ; Sieveking *et* Ng, 2009]. En pratique, **les PCEs sont généralement définis par la combinaison des marqueurs CD34 et VEGF-R2**.

Les PCEs précoces dériveraient de la lignée monocytaire (CD14+) alors que les PCEs tardifs seraient issus des cellules souches hématopoïétiques (CD34+) (figure 17) [Krenning *et al.*, 2009]. Ce lignage potentiel pourrait expliquer le plus fort pontentiel prolifératif **des PCEs tardifs qui sont considérés comme « les vrais PCEs »** [Fadini *et al*., 2008 ; Sieveking *et* Ng, 2009].

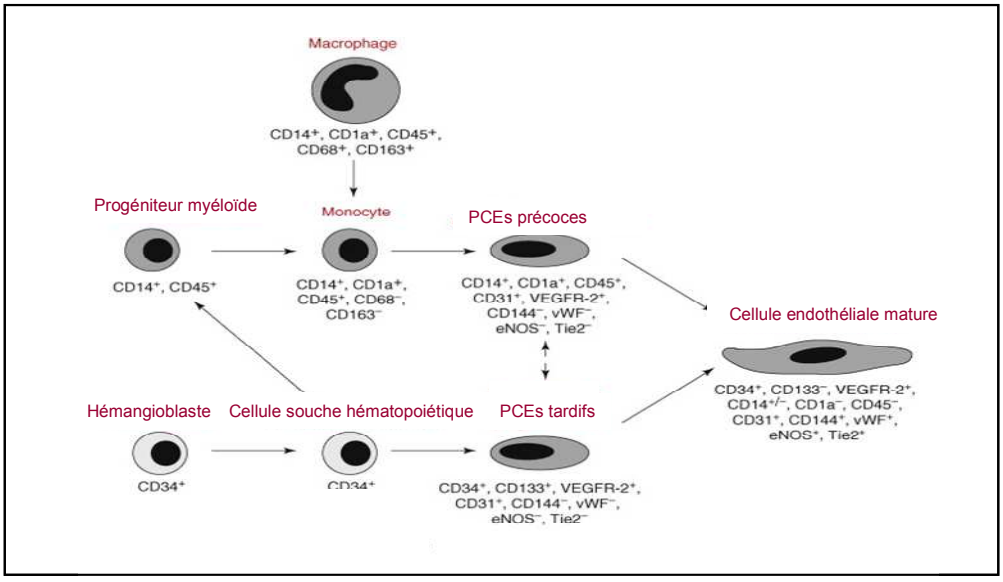


Figure 17 : Schéma de lignage potentiel des progéniteurs des cellules endothéliales

[Krenning *et al*., 2009].

Les progéniteurs des cellules endothéliales (PCEs) précoces seraient issus de la lignée monocytaire et exprimeraient, en autre, leur marqueur caractéristique (CD14+) tandis que les PCEs tardifs seraient issus des cellules souches hématopoïétiques et exprimeraient le marqueur caractéristique des cellules souches (CD34+).

IV-3-2/ Caractérisation fonctionnelle

Il n'y a toujours pas de consensus sur la définition phénotypique des PCEs principalement en raison de l'absence d'un marqueur ou d'une combinaison de marqueurs permettant de les isoler spécifiquement [Sieveking *et* Ng, 2009]. **C'est pourquoi de nombreux critères (y compris fonctionnels) sont nécessaires à la caractérisation de ces cellules, c'est la raison pour laquelle les PCEs sont souvent caractérisés *a posteriori* une fois leur différenciation effectuée** [Ingram *et al*., 2004 ; Fadini *et al*., 2008].

Les tests fonctionnels utilisés ont pour but de vérifier que les PCEs présentent bien les principales caractéristiques fonctionnelles des cellules endothéliales. Différents tests existent et les deux principaux à être utilisés sont les suivants : la captation des lipoprotéines de basse densité (LDL) oxydés et la formation d'un réseau de tubes vasculaires dans le Matrigel®.

Captation des LDL oxydés

Les LDL oxydés sont captés par les macrophages et les cellules endothéliales via des récepteurs « scavenger » [Voyta *et al*., 1984]. C'est une **fonction d'épuration**.

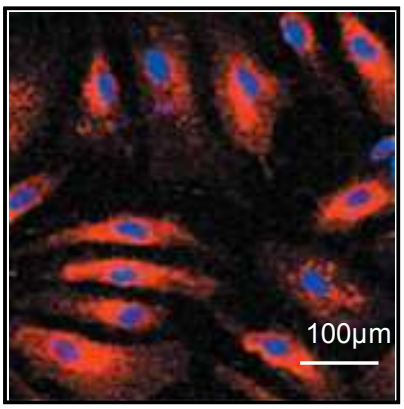


Figure 18 : Photographie de l'incorporation des LDL oxydés par les cellules endothéliales dérivées des progéniteurs des cellules endothéliales [Ingram *et al*., 2004].

Les LDL oxydés sont couplés à une sonde fluorescente. Leur incorporation par les cellules endothéliales peut ainsi être visualisée (en rouge). Les noyaux des cellules sont colorés au DAPI (en bleu). Grossissement 50.

Formation d'un réseau de tubes vasculaires dans le Matrigel®

Le Matrigel® en se solidifiant forme une structure équivalente à une membrane basale de part sa composition, sa structure et ses propriétés physiques. Il induit la formation et l'organisation des cellules endothéliales en tubules vasculaires

(http://www.hellopro.fr/documentation/doc_produit/3974_75f26c81bcaeefd58b89667ae95e6c9d_273914.pdf).

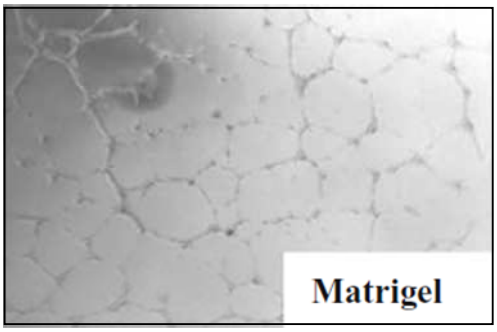
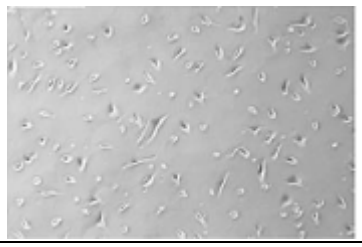
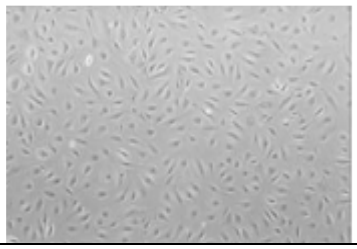


Figure 19 : Photographie de la formation d'un réseau de tubes vasculaires dans le Matrigel® par les cellules endothéliales dérivées des progéniteurs des cellules endothéliales [Smadja *et al*., 2007].

Le Matrigel® permet la formation d'un réseau de tubes vasculaires par les progéniteurs des cellules endothéliales.

Tableau IV : Principales caractéristiques des deux types de progéniteurs des cellules endothéliales [Smadja *et al*., 2007; Yoder *et al*., 2007 ; Fadini *et al*., 2008 ; Sieveking *et* Ng, 2008].

Caractéristiques	Progéniteurs des cellules endothéliales précoces	Progéniteurs des cellules endothéliales tardifs
Temps d'émergence en culture	4 à 7 jours	14 à 21 jours
Aspect morphologique	Hétérogène : forme allongée « aiguille » 	Homogène : aspect pavimenteux 
Marqueurs antigéniques « hématopoïétiques »	oui (CD14+, CD45+)	non
Marqueurs antigéniques « endothéliaux »	oui (VEGF-R2)	oui (VEGF-R2)
Incorporation des LDL oxydés	oui	oui
Formation de tubes vasculaires dans le Matrigel®	non	oui
Sécrétion de cytokines angiogéniques	élevée (VEGF, IL-8, G-CSF)	faible
Pouvoir prolifératif *in vitro*	faible	élevé
Potentiel angiogénique *in vivo*	variable selon les auteurs	élevé

IV-4/ Physiologie des progéniteurs des cellules endothéliales

Les PCEs représentent **moins de 1% de toutes les cellules de la moelle osseuse**. Ils sont donc extrêmement rares dans le sang périphérique, **entre 0.01% et 0.0001% du total des cellules mononuclées** [Smadja *et al*., 2007].

Un certain nombre de facteurs physiologiques et physiopathologiques peuvent influencer le nombre de PCEs. Plusieurs études ont ainsi montré **une diminution du nombre de PCEs chez l'obèse** [Tobler *et al*., 2010 ; MacEneaney *et al*., 2010]. Ils ont également montré que les PCEs tardifs présentaient un plus faible pouvoir prolifératif et une sénescence prématurée pouvant ainsi contribuer au développement et à la progression des anomalies vasculaires chez l'obèse [Tobler *et al*., 2010]. De façon plus générale, **le nombre de PCEs est inversement proportionnel à un certain nombre de facteurs de risques cardiovasculaires** comme le diabète de type 2, le fait de fumer, l'absence d'exercice physique [Miller-Kasprzak *et* Jagodzinski, 2007]. Il a aussi été montré que le nombre de PCEs est augmenté de façon cyclique chez la femme fertile ; cela mettant en avant le caractère attracteur des oestrogènes [Resch *et al*., 2011].

La mobilisation des PCEs, depuis « les niches de cellules souches » situées dans la moelle osseuse, est **très finement régulée par différents facteurs** et fait suite à divers stimuli **dont le plus important est l'hypoxie**. Les cellules adjacentes au site ischémique sécrètent des facteurs de croissance, des chimiokines et des métalloprotéases qui vont contribuer à la mobilisation des PCEs depuis « les niches » de la moelle osseuse jusqu'au sang périphérique. Ce processus est sous le contrôle du **facteur alpha-1 inductible par l'hypoxie** (HIF-1α) qui est sensible aux faibles taux d'oxygène et qui déclenche alors la transcription de molécules pro-angiogéniques comme la chimiokine « le facteur numéro 1 dérivé des cellules stromales » (SDF-1) et son récepteur CXCR4. D'autres facteurs, tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), l'érythropoïétine agissent aussi sur la mobilisation des PCEs [Sieveking *et* Ng, 2009].

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire est indispensable à la prolifération des PCEs et à la différenciation des clones de PCEs en cellules endothéliales [Miller-Kasprzak *et* Jagodzinski, 2007 ; Pearson, 2009]. Du fait de leur capacité à se différencier en cellules endothéliales matures, les PCEs ont suscité beaucoup d'espoir

pour les thérapies ischémiques ; cet aspect et leur rôle potentiel dans les processus de néovascularisation réparatrice du tissu adipeux hypertrophique seront détaillés ultérieurement (voir chapitre **V-4/ Rôle potentiel des progéniteurs des cellules endothéliales dans la néovascularisation**).

***

La réparation de l'endothélium vasculaire, lésé au cours de l'obésité, est cruciale pour le bon fonctionnement du système vasculaire. Les cellules endothéliales sont des cellules différenciées et possèdent, de ce fait, un faible potentiel prolifératif. Dans ce contexte, la découverte des progéniteurs des cellules endothéliales a suscité un fort intérêt quant à leur capacité à régénérer un endothélium. Leur rôle potentiel dans la néovascularisation est très prometteur, de même que l'implication potentielle de G-CSF dans ce processus. Ces points précis seront développés plus en détail dans le chapitre suivant.

***

V / La néovascularisation au sein du tissu adipeux

V-1/ Définitions et mécanismes impliqués lors de la néovascularisation

La néovascularisation ou néoangiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux) fait essentiellement intervenir les processus de vasculogenèse et d'angiogenèse. **La vasculogenèse** correspond à la formation de nouvelles structures vasculaires à partir de cellules souches ou progéniteurs alors que **l'angiogenèse** est un processus dans lequel les nouveaux vaisseaux sanguins sont formés à partir des vaisseaux préexistants [Krenning *et al*., 2009].

Jusque dans les années 1990, le modèle proposait que la formation de nouveaux vaisseaux sanguins chez l'adulte résulterait de la migration et de la réplication locale des cellules endothéliales existantes sans contribution des cellules d'origine sanguine. En 1997, la découverte des progéniteurs des cellules endothéliales, par Asahara et ses collègues, a considérablement remis en cause ce modèle. En effet, ces travaux (et notamment les expériences *in vivo* chez des modèles d'animaux ischémiques) ont proposé une implication potentielle de ces PCEs dans les phénomènes de néovascularisation ; ces PCEs pourraient

s'intégrer au niveau des sites ischémiques et s'y différencier en cellules endothéliales qui participeraient à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Des travaux récents laissent toutefois penser que les PCEs ne contribueraient pas directement à la néovascularisation mais migreraient au niveau des sites ischémiques et y activeraient les péricytes qui eux-mêmes sécrèteraient des médiateurs qui stimuleraient la migration et la réplication des cellules endothéliales (figure 20) [Pearson, 2009]. Ces observations reposent sur le fait que, contrairement à l'hypothèse de départ, les PCEs ne peuvent pas être « suivis » pendant longtemps et que, de plus, ils ne s'intègrent pas au niveau du site ischémique [Krenning *et al*., 2009].

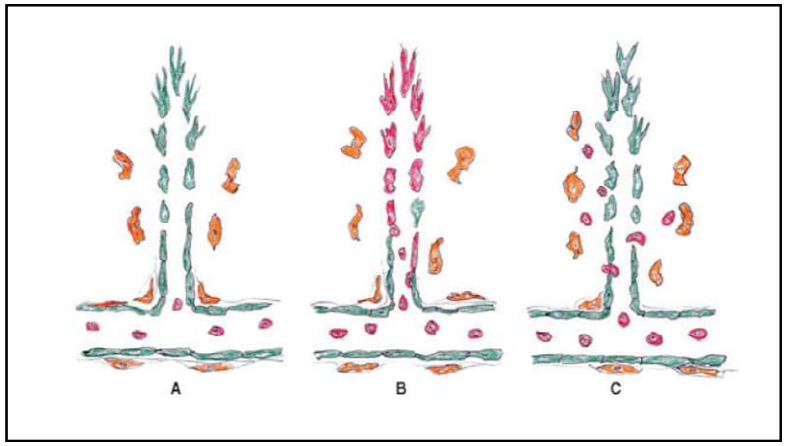


Figure 20 : Evolution du concept de néovascularisation chez l'adulte [Pearson, 2009].

(A) Jusque dans les années 1990, le modèle accepté consistait à décrire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins en termes de migration et de réplication des cellules endothéliales existantes (vert), sans contribution des cellules dérivées du sang (rouge). Les péricytes ou autres cellules murales (orange) migraient et se répliquaient au niveau des nouveaux vaisseaux sanguins ainsi formés.

(B) La découverte des progéniteurs des cellules endothéliales (rouge) et leur rôle potentiel dans la néovascularisation a conduit à totalement réviser ce modèle. Les PCEs contribueraient à la néovascularisation en s'intégrant au niveau des sites ischémiques.

(C) Des données récentes suggéreraient plutôt une contribution indirecte de ces progéniteurs des cellules endothéliales : ils migreraient au niveau des sites ischémiques où ils activeraient les péricytes qui eux-mêmes sécrèteraient des médiateurs favorisant la migration et la réplication des cellules endothéliales.

Le tissu adipeux hypertrophique est le siège d'un état hypoxique (oxygénation insuffisante de certains tissus ; pour revue [Wood *et al*., 2009]). Cet état est caractérisé par **l'activation des facteurs de transcription inductibles par l'hypoxie**. HIF-1α (le principal d'entre eux) **favorise l'expression de facteurs pro-angiogéniques**, VEFG et MCP-1 entre autres, qui vont **mobiliser les progéniteurs des cellules endothéliales** depuis la moelle osseuse et **augmenter la perméabilité vasculaire**. L'augmentation de la perméabilité

vasculaire va perturber les jonctions entre les cellules endothéliales et va par la suite **favoriser l'extravasation des PCEs à travers la membrane endothéliale dégradée**. Les progéniteurs des cellules endothéliales vont ensuite **former des pré-vaisseaux** qui, grâce au microenvironnement angiogénique stimulant l'endothélium, vont **recruter des cellules endothéliales et former des néo-vaisseaux fonctionnels** [Krenning *et al*., 2009].

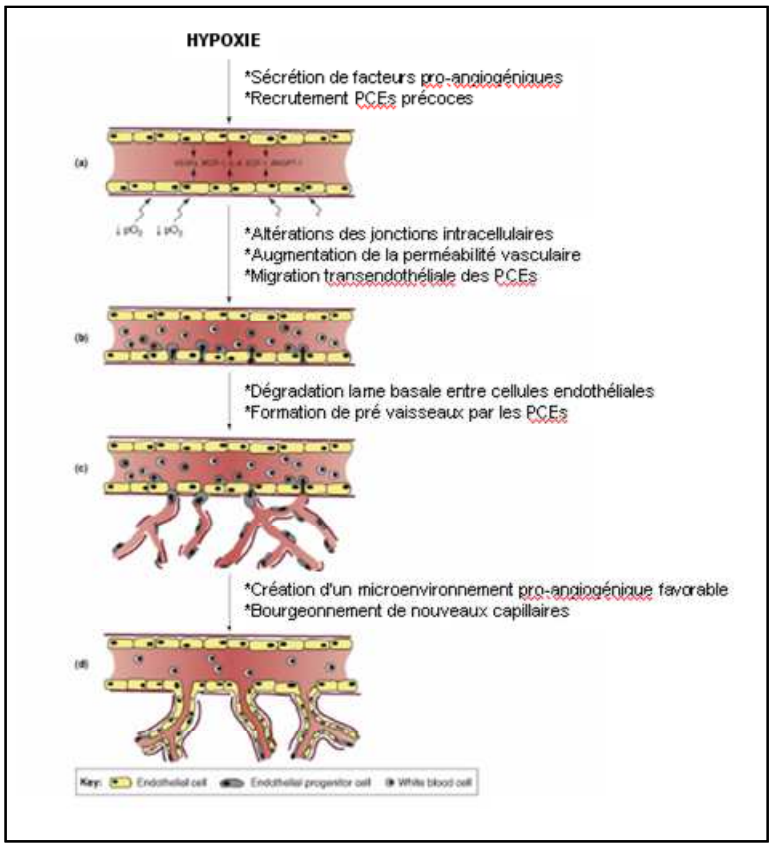


Figure 21 : Mécanismes impliqués dans la néovascularisation [Krenning *et al*., 2009].

(a) L'hypoxie induit la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques qui mobilisent les progéniteurs des cellules endothéliales (PCEs) depuis la moelle osseuse sur le site de l'hypoxie et participent à la dégradation de la lame basale. (b) La dégradation et de la perméabilisation de la lame basale permettent la transmigration des PCEs à travers la lame basale. (c) Cette transmigration permet la création de pré-vaisseaux. (d) Le microenvironnement angiogénique favorise la formation de néovaisseaux fonctionnels.

Il est à noter qu'une étude récente remet en cause l'état hypoxique chez l'obèse [Pasarica *et al*., 2009]. En effet, bien qu'une diminution de la pression artérielle partielle en oxygène soit observée au sein du tissu adipeux de sujets en surpoids ou obèses, cette dernière n'atteindrait pas un niveau suffisant pour induire l'activation des cibles classiques de l'hypoxie.

V-2/ Relation entre l'adipogenèse et la néovascularisation

De nombreux travaux ont montré qu'il existe un lien entre adipogenèse et néovascularisation, aussi bien d'un point de vue physiologique (pendant le développement du tissu adipeux lors de l'embryogénèse) que d'un point de vue pathologique (lors de l'obésité) (pour revue [Cao, 2010 ; Sun *et al*., 2011]). Ce lien a été mis en évidence grâce à une expérience de neutralisation du récepteur du VEGF chez la souris. En effet, **le blocage de la voie de signalisation du VEGF a abouti à l'inhibition de l'expansion de la masse adipeuse et à une altération de la néovascularisation révélant ainsi l'existence d'un lien fonctionnel important entre ces deux processus**. De plus le blocage de VEGF-R2 inhibe la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes [Fukumura *et al*., 2003].

De façon intéressante, la majorité des désordres métaboliques associés à l'obésité (diabète de type 2, hypertension artérielle, maladies coronariennes) montre également un dysfonctionnement vasculaire [Cao, 2010] c'est pourquoi les inhibiteurs d'angiogenèse sont une nouvelle cible thérapeutique.

La régulation de la néovascularisation au sein du tissu adipeux est complexe et met en jeu de nombreux acteurs (figure 22). Néanmoins le VEGF semble jouer un rôle central dans cette cascade de régulation. En effet, une étude récente, utilisant un modèle *in vivo* d'angiogenèse (culture de fragments de biopsies de TASC et de TAV sur une membrane choriocollantoïque de poussin), a **souligné le rôle important du VEGF dans l'angiogenèse du TASC et TAV de patients souffrant d'obésité massive** [Ledoux *et al*., 2008].

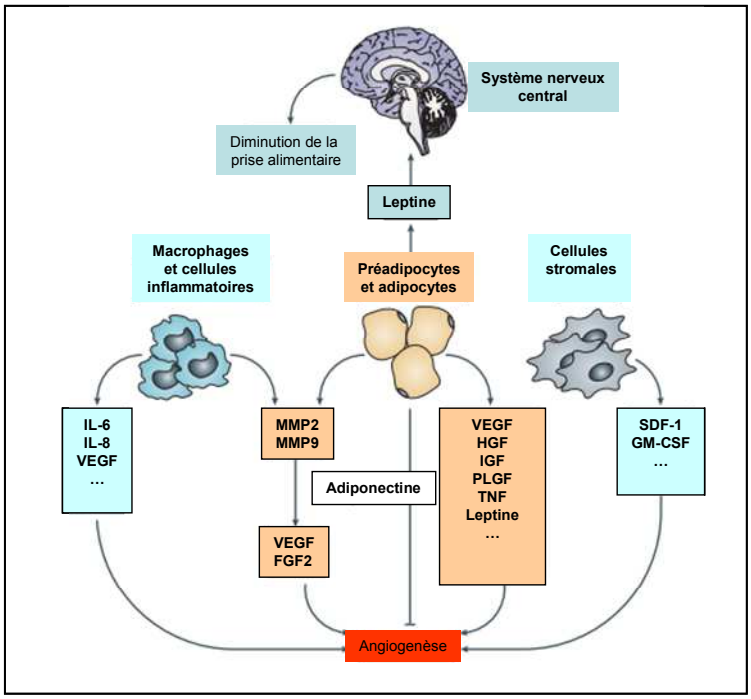


Figure 22 : Schéma simplifié de la régulation de l'angiogenèse au sein du tissu adipeux [Cao, 2010].
Les adipocytes, les pré-adipocytes, les cellules stromales adipocytaires et les macrophages produisent de nombreux facteurs pro-angiogéniques (IL-6, IL-8, VEGF…). Les adipocytes produisent également de l'adiponectine qui est connue pour inhiber les processus d'angiogenèse. La leptine, en plus de son action « coupe faim » au niveau central, stimule localement l'angiogenèse au sein du tissu adipeux.

V-3/ Pouvoir angiogénique du facteur de croissance des colonies de granulocytes ?

Comme nous l'avons vu précédemment le G-CSF est utilisé en thérapeutique pour mobiliser les progéniteurs hématopoïétiques à des fins de transfusion. Nous avons également vu que les progéniteurs hématopoiétiques et les progéniteurs des cellules endothéliales partageraient « un ancêtre commun » : l'hémangioblaste. De ce fait, ils exprimeraient des marqueurs membranaires communs. **Le G-CSF serait donc également capable de mobiliser les PCEs**. Des études prospectives semblent confirmer cette capacité de mobilisation des progéniteurs des cellules endothéliales [Anderlini *et* Champlin, 2008]. Néanmoins, une étude très récente de Tura et de ses collaborateurs a montré **que le G-CSF ne permettait pas la mobilisation des PCEs et les rendrait non fonctionnels, diminuant l'angiogenèse *in vivo* et *in vitro*** [Tura *et al.,* 2010]. Ces résultats sont donc à nuancer et se pose, une nouvelle fois, le problème d'une définition précise du phénotypique des PCEs.

De nombreuses études sur des modèles d'ischémie animale montrent que **l'administration de G-CSF augmenterait la néovascularisation dans l'aire ischémique et diminuerait l'apoptose des cellules endothéliales**. Bien que les mécanismes précis ne soient

pas connus, ces études récentes suggèrent que le G-CSF stimulerait les neutrophiles et les monocytes qui sont eux capables, via des mécanismes paracrine, de promouvoir la néovascularisation dans les tissus ischémiques. Cependant, les essais cliniques de thérapie avec le G-CSF donnent des résultats discordants [Sanganalmath *et al*., 2011].

Le G-CSF semble donc avoir un pouvoir angiogénique, même si celui-ci reste à préciser.

V-4/ Rôle potentiel des progéniteurs des cellules endothéliales dans la néovascularisation

Après avoir caractérisé les progéniteurs des cellules endothéliales, Asahra et ses collaborateurs ont réalisé de nombreux travaux afin d'étudier le pouvoir angiogénique de ces cellules. Ils ont injecté dans des modèles d'ischémie chez la souris des PCEs ayant été préalablement transfectés. Ils ont ainsi pu constater que ces cellules s'étaient intégrées au niveau des sites ischémiques. Ils ont également injecté les PCEs transfectés à des souris ayant subi une irradiation de la moelle osseuse et **ils ont à nouveau constaté que les progéniteurs des cellules endothéliales s'étaient intégrés au niveau des sites ischémiques**. Des expériences réalisées par Shi et ses collaborateurs chez le chien ont confirmé les résultats d'Ashara [Pearson, 2009].

Depuis de nombreuses études pré-cliniques utilisant des PCEs ont vu le jour. **Ces études ont nuancé ces découvertes car il semble difficile de suivre l'intégration des PCEs au niveau des sites ischémiques sur le long terme**. Cela laisse penser **que même si les PCEs pourraient initier la néovascularisation ils ne s'intégreraient pas forcément au niveau des sites ischémiques** [Hur *et al*., 2004].

Le rôle des PCEs dans les mécanismes mis en jeu lors de la néovascularisation n'est pas encore bien défini. **Les PCEs précoces et tardifs agiraient de manière synergique : les PCEs précoces auraient un rôle paracrine (sécrétion de facteur pro-angiogénique) alors que les PCEs tardifs s'incorporeraient au niveau des néo-vaisseaux** (figure 23) [Steinmetz *et al*., 2010].

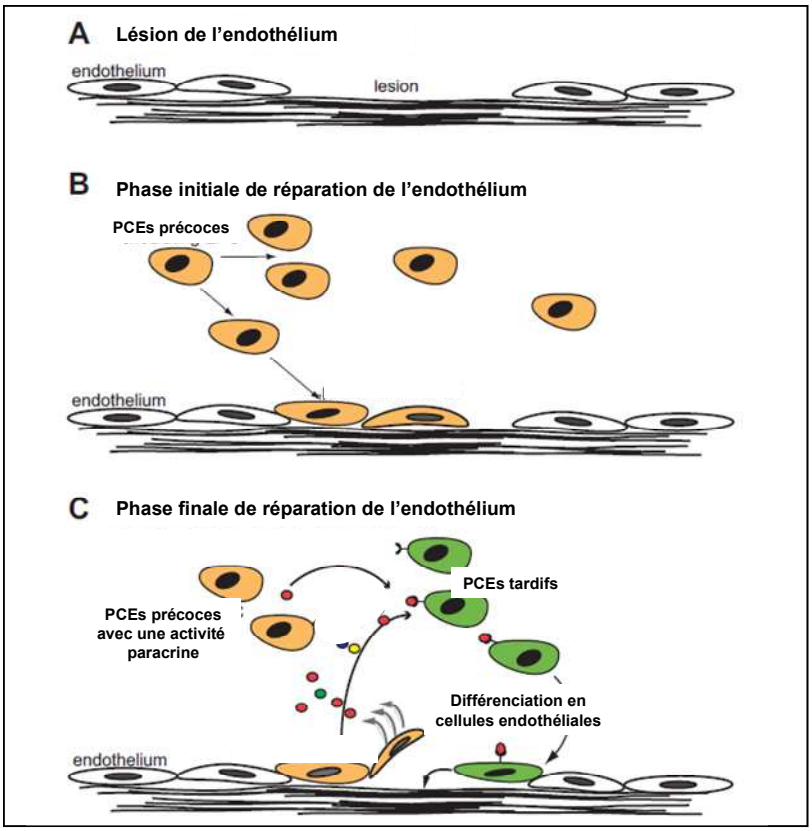


Figure 23 : Rôle hypothétique des deux types de progéniteurs des cellules endothéliales [Steinmetz *et al*., 2010].

Dans les premières phases du processus de néovascularisation, les progéniteurs des cellules endothéliales (PCEs) précoces adhèreraient au niveau de la lésion et se transformeraient en « cellules endothéliales intermédiaires » afin de stabiliser l'endothélium. Dans les phases tardives, ces PCEs précoces agiraient de façon paracrine et sécrèteraient des facteurs pro-angiogéniques, tandis que les PCEs tardifs s'incorporeraient au niveau de l'endothélium lésé où ils se différencieraient en cellules endothéliales.

Hypothèse de travail

Le tissu adipeux joue un rôle central au cours de l'obésité. En effet, suite à un déséquilibre de la balance énergétique, le tissu adipeux subit diverses altérations avec en particulier une modification de sa fonction endocrine. Les sécrétions des adipokines à caractère inflammatoire et angiogénique sont augmentées. En effet, l'inflammation et la néovascularisation sont souvent liées comme semblent également l'être la néovascularisation et l'adipogenèse [Cao, 2010 ; Sun *et al*., 2011].

Parmi ces nombreux médiateurs inflammatoires figure le G-CSF, cytokine pro-inflammatoire, dont l'étude sera l'objet de mon stage. Une étude de Skurk a montré que le G-CSF était un marqueur des adipocytes hypertrophiques [Skurk *et al*., 2007]. Des travaux de notre équipe (non publiés) ont montré que le G-CSF était plus sécrété par des adipocytes rendus *in vitro* inflammatoires que par des adipocytes témoins. De plus, notre équipe a montré, par une approche transcriptomique prospective, que le G-CSF était le gène le plus surexprimé par les pré-adipocytes inflammatoires (article en cours de soumission). Une autre étude très récente a montré que le G-CSF était moins sécrété par le tissu adipeux viscéral de patients obèses ne présentant pas de désordres métaboliques que par le tissu adipeux viscéral de patients obèses présentant des désordres métaboliques [O'Connell *et al*., 2011]. Cependant, un rôle potentiel de G-CSF dans la physiopathologie du tissu adipeux, au cours de l'obésité, reste encore à préciser.

Au cours de ce stage, à l'aide d'études cellulaires et moléculaires, je proposerai un rôle potentiel de G-CSF dans le tissu adipeux au cours de l'obésité. Dans un premier temps, je caractériserai son expression et sa sécrétion, et, dans un second temps, j'étudierai un de ses rôles potentiels dans la physiopathologie du tissu adipeux au cours de l'obésité. **Notre hypothèse propose que l'augmentation de la production de G-CSF par le tissu adipeux hypertrophique puisse participer, par la mobilisation des progéniteurs des cellules endothéliales, à la néovascularisation réparatrice du tissu adipeux hypertrophique**. En effet, des travaux récents montreraient une sénescence prématurée des cellules endothéliales du TAV d'obèse [Villaret *et al*., 2010]. Cette sénescence nécessiterait une réparation vasculaire qui pourrait, selon notre hypothèse, impliquer la mobilisation des PCEs.

Matériels et méthodes

I/ Culture cellulaire

I-1/ Mise en culture des biopsies de tissu adipeux

Les biopsies de tissu adipeux sont réalisées lors des opérations de chirurgie bariatrique (TASC et TAV de patients obèses). Un fragment de ces biopsies est mis en culture afin d'obtenir des milieux de sécrétion qui serviront à quantifier, par des dosages ELISA, les molécules sécrétées par le tissu adipeux.

Un fragment de ces biopsies est prélevé, pesé et mis en culture dans les conditions suivantes : 0,1 gramme de tissu pour 1 millilitre de milieu de culture. Le milieu de culture est préparé à partir d'un milieu de culture de base pour cellules endothéliales (ECBM) (PromoCell, Heidelberg, Allemagne) supplémenté avec 1% d'albumine sérique bovine (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) et avec 1% d'une solution de Penicilline/Streptomycine (Penicilline : 10000 U/mL et Streptomycine : 10 mg/mL) (PromoCell, Heidelberg, Allemagne) [Keophiphath *et al*., 2010]. Après une première incubation d'une heure (étuve à 37°C sous 5% de CO2), le milieu de culture est remplacé afin d'éliminer les protéases libérées lors de la lyse cellulaire due au prélèvement. Le lendemain, après 18H00 d'incubation, les milieux de sécrétion ainsi obtenus sont collectés puis décantés par centrifugation à 4°C (10 min, à 10000t/min). Ils sont ensuite aliquotés et conservés à -80°C avant d'être utilisés dans le cadre de différents projets d'étude.

I-2/ Isolement des différents types cellulaires à partir des biopsies de tissu adipeux

Les principales cellules constituant le tissu adipeux (adipocytes, pré-adipocytes, cellules endothéliales et macrophages) sont isolées par digestion enzymatique de la matrice extracellulaire du tissu adipeux à l'aide de collagénase. Ces biopsies de tissu adipeux sont réalisées soit lors des actes de chirurgie plastique (TASC de sujets normopondéraux ou en surpoids) soit lors des opérations de chirurgie bariatrique (TASC et TAV de patients obèses).

Les cellules ainsi isolées serviront à étudier l'expression, par PCR en temps réel, de différentes protéines au sein du tissu adipeux. Nous avons constitué deux échantillons : un échantillon de 29 adipocytes isolés à partir de tissu adipeux sous-cutané afin d'étudier l'influence du statut pondéral (mince/obèse) sur l'expression de G-CSF et un échantillon des principaux types cellulaires du tissu adipeux (adipocytes (n=14), pré-adipocytes (n=12), macrophages (n=8) et cellules endothéliales (n=9)) afin de comparer l'expression de G-CSF et de son récepteur dans ces types cellulaires.

Le tissu adipeux est digéré, sous agitation à 37°C pendant 1H00, grâce à l'action d'un tampon de digestion (le tampon de digestion est préparé à partir du milieu de culture de base de Dulbecco (DMEM) auquel sont ajoutés la collagénase (1mg/mL de tampon de digestion), 2% d'albumine et 1% d'une solution de Penicilline/Streptomycine) à raison d'un gramme de tissu pour un millilitre de tampon de digestion. Le produit de digestion est filtré sur une compresse stérile puis centrifugé à basse vitesse (200g, 2min). Cette centrifugation permet d'obtenir deux fractions : la fraction adipocytaire (fraction supérieure) et la fraction stroma-vasculaire (fraction inférieure) (figure 24). Les adipocytes sont directement utilisés. Le culot cellulaire (contenant la FSV) est repris dans du tampon de lyse des globules rouges (154mM NH4Cl, 5.7mM K2HPO4 et 0.1mM EDTA pH7.0). Le lysat cellulaire est filtré sur deux tamis cellulaires (100µm puis 40µm) puis centrifugé. Le culot cellulaire obtenu est lavé au PBS et les types cellulaires d'intérêt vont être isolés : les cellules endothéliales sont isolées par une immunosélection CD31+, les macrophages par une immunosélection CD14+ et les pré-adipocytes sont obtenus par ensemencement du culot cellulaire (fraction négative) dans du milieu de culture DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Invitrogen, St Aubin, France). Les pré-adipocytes seront purifiés par passages successifs et utilisés après deux passages [Curat *et al*., 2004].

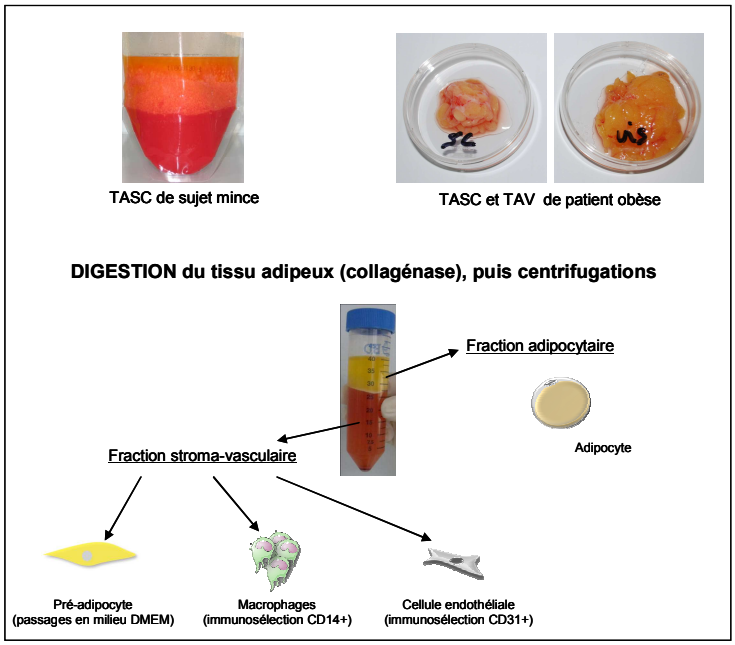


Figure 24: Isolement des différents types cellulaires du tissu adipeux.

Les tissus adipeux sous-cutané (TASC) et viscéral (TAV) sont digérés, sous agitation à 37°C, par la collagénase. Après centrifugations, deux fractions sont obtenues. La fraction adipocytaire et la fraction stroma-vasculaire à partir de laquelle vont ensuite être isolés les macrophages (par immunosélection CD14+), les cellules endothéliales (par immunosélection CD31+) et les pré-adipocytes (par passages successifs en milieu DMEM aditionné de 10% de sérum de veau foetal).

Les types cellulaires sont cultivées selon les conditions *ad hoc*, puis sont ensuite lysées afin d'en extraire l'ARN nécessaire aux études d'expression. Seuls les adipocytes sont directement lysés après avoir été isolés du tissu adipeux.

I-3/ Isolement et mise en culture des cellules sanguines

Les cellules sont isolées à partir de sang périphérique prélevé chez des sujets normopondéraux (donneurs de l'Etablissement Français du Sang, ayant accepté des prélèvements supplémentaires à des fins de recherche) et chez des patients obèses suivis dans le Service de Nutrition de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière. Les cellules mononuclées d'intérêt (monocytes et progéniteurs des cellules endothéliales) sont isolées grâce à un gradient de Ficoll®. Les monocytes sont sélectionnés grâce à une immunosélection CD14+ puis différenciés *in vitro* en macrophages grâce à leur support de culture (lamelles de verre traités par la poly-L-Lysine) [Curat *et al*., 2004 ; Keophiphath *et al*., 2010]. Les progéniteurs des cellules endothéliales sont sélectionnés grâce à leur adhérence au collagène de type I [Mead *et al*., 2008].

I-3-1/ Le gradient de Ficoll®

I-3-1-a/ Principe

Le Ficoll® permet d'isoler les cellules mononuclées (lymphocytes, monocytes, progéniteurs circulants) grâce à la formation d'un gradient de séparation. Les cellules de haute densité (hématies et polynucléaires) vont sédimenter au fond du tube alors que les cellules présentant une densité inférieure à celle du Ficoll® (cellules mononuclées) vont sédimenter à l'interface du Ficoll® et du plasma (figure 25).

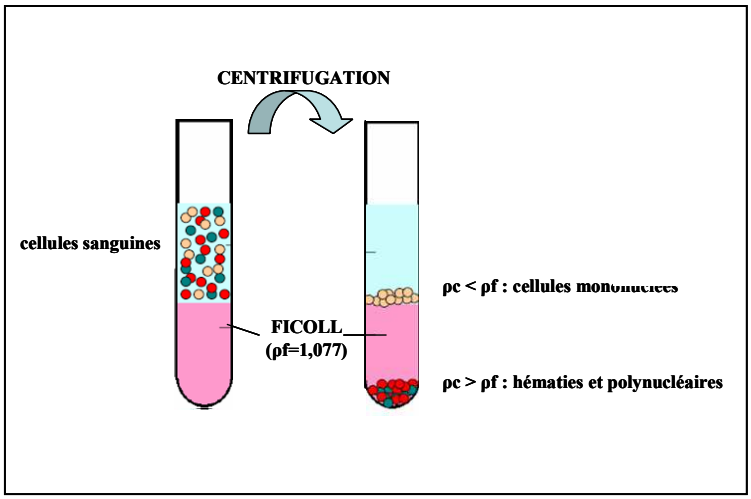


Figure 25 : Principe du gradient de Ficoll®.
Le sang périphérique est déposé sur le Ficoll® puis centrifugé 30 minutes à 700 g afin de réaliser un gradient de séparation cellulaire. Les cellules sont séparées en fonction de leur densité respective (ρc) par rapport à celle du Ficoll® (ρf). Les cellules mononuclées (lymphocytes, monocytes, progéniteurs circulants) qui ont une densité inférieure à celle du Ficoll® sont localisées dans l'anneau situé à l'interface du Ficoll® et du plasma.

I-3-1-b/ Protocole expérimental

Les prélèvements sanguins sont déposés sur du Ficoll® dans une proportion de 2/3 de sang périphérique pour 1/3 de Ficoll® (Amersham Biosciences/GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) puis centrifugés (30 minutes, à 700g) afin de réaliser un gradient de séparation des cellules sanguines. Les cellules mononuclées (lymphocytes, monocytes, progéniteurs circulants) sont contenues dans l'anneau situé à l'interface du Ficoll® et du plasma. Celui-ci est prélevé délicatement, à l'aide d'une pipette, et placé dans un nouveau tube. Les cellules sont ensuite lavées afin d'éliminer toute trace de Ficoll®. Du PBS additionné de 2% de SVF est ajouté puis la suspension cellulaire obtenue est centrifugée (5

minutes à 1000 tours/min). Le surnageant est éliminé puis l'opération est renouvelée une deuxième fois. Les cellules subissent ensuite une étape d'immunosélection pour obtenir les monocytes, qui seront différenciés *in vitro* en macrophages, ou sont directement mises en culture dans le milieu *ad hoc* pour l'étude des progéniteurs des cellules endothéliales.

I-3-2/ Isolement des monocytes et différenciation *in vitro* en macrophages

Le gradient est réalisé comme expliqué précédemment à partir des prélèvements de sang périphérique de patients obèses. L'anneau, prélevé à l'interface du Ficoll® et du plasma, contient une population cellulaire mixte : monocytes, lymphocytes, progéniteurs circulants et éventuellement plaquettes. Une immunosélection est réalisée afin d'isoler positivement les monocytes grâce à leurs antigènes membranaires : le CD14. Nous utilisons pour cela le kit EasySep CD14+ (StemCell Technologies, Meylan, France).

Le volume du culot cellulaire obtenu est mesuré. La solution d'anticorps du cocktail de sélection CD14+ (volume équivalent au 1/10ème de celui du culot cellulaire) est ajoutée. La suspension est placée dans un tube, compatible avec l'aimant fourni pour réaliser la sélection, et incubée 15 minutes à température ambiante. Les billes magnétiques (volume équivalent à la moitié du volume d'anticorps utilisé) sont ajoutées. Après homogénéisation, la suspension est incubée 10 minutes à température ambiante. L'ensemble est repris dans du tampon de dissociation (préparé à partir de PBS auquel sont ajoutés 2% de SVF et 2mM d'EDTA) afin d'avoir un volume réactionnel égal à 2,5 mL. La suspension est homogénéisée puis placée dans l'aimant pendant 5 minutes. La fraction négative est récoltée par retournement du système tube/aimant. Trois lavages sont réalisés. Notre fraction d'intérêt est sélectionnée positivement : les monocytes adhèrent à la paroi du tube. Ils sont récoltés par rinçage des parois du tube.

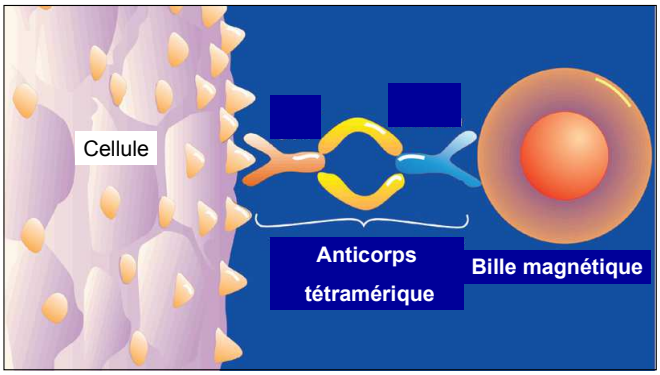


Figure 26 : Principe de l'immunosélection (d'après la fiche technique EasySep).
Les cellules d'intérêt sont « marquées » par un anticorps tétramérique qui reconnaît spécifiquement, d'une part, l'antigène membranaire et, d'autre part, le dextran recouvrant les billes magnétiques qui vont permettre de séparer les cellules marquées des cellules non marquées grâce à un aimant.

Les monocytes étant des cellules adhérentes, il est nécessaire de leur fournir un support de culture. Pour cela on recouvre, pendant 5 minutes, des lamelles de verre, placées au fond des puits, avec de la Poly-L-lysine à 0,01% (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Après avoir éliminé l'excédent de Poly-L-lysine, les lamelles sont rincées trois fois avec du PBS.

Les monocytes sont repris dans du milieu RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) additionné de 10% de SVF et de 1% d'une solution de Penicilline/Streptomycine (Penicilline : 10000 U/mL et Streptomycine : 10 mg/mL) (PromoCell, Heidelberg, Allemagne) [Curat *et al*., 2004]. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours.

La différenciation des monocytes en macrophages *in vitro* est induite par leur support de culture, ici le fait de les cultiver sur des lamelles de verre [Keophiphath *et al*., 2009]. Elle survient après dix jours de culture environ. Ces macrophages seront utilisés pour étudier l'influence d'un traitement à la pravastatine sur la sécrétion de G-CSF.

I-3-3/ Isolement et mise en culture des progéniteurs des cellules endothéliales

Dans le cadre de mon projet, j'ai adapté, à partir des données de la littérature [Ingram *et al*., 2004, Mead *et al*., 2008 et Thebaud *et al*., 2010], un protocole d'isolement et de mise en culture des progéniteurs des cellules endothéliales à partir de sang périphérique. Nous

avons choisi de nous intéresser aux PCEs tardifs car ils ont été décrits comme présentant *in vivo* un pouvoir angiogénique plus élevé [Hur *et al*., 2004].

Pour cela, j'ai testé divers modes opératoires en faisant successivement varier différents critères tels que la source de prélèvement (sang périphérique de sujets obèses ou normopondéraux), le fait d'ajouter une étape d'immunosélection, la densité d'ensemencement, la supplémentation (ou non) en facteur de croissance de l'endothélium vasculaire du milieu de culture.

Les PCEs sont isolés par un gradient de Ficoll® suivi d'une sélection grâce à leur capacité à adhérer au collagène de type I [Ingram *et al*., 2004, Mead *et al*., 2008 et Thebaud *et al*., 2010]. Le gradient est réalisé, comme expliqué précédemment, à partir des prélèvements de sang périphérique de sujets normopondéraux. L'anneau, prélevé à l'interface du Ficoll® et du plasma, contient les cellules mononuclées dont les PCEs. Les puits de la plaque de culture sont recouverts avec du collagène de type I (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) dilué à 50 mg/mL dans de l'acide acétique 0.02 N (1H00, à température ambiante). Après avoir éliminé l'excédent de collagène, les puits sont rincés trois fois avec du PBS.

Les cellules sont ensemencées à une concentration de 2.10^7 cellules par puits de plaque B12 dans un milieu de culture de croissance des cellules endothéliales (ECGM) (PromoCell, Heidelberg, Allemagne) supplémenté de 10% de SVF et de 10 ng/mL de VEGF (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Ce milieu de culture est préparé à partir d'un milieu de culture de base auquel est ajoutée une solution commerciale d'enrichissement contenant, entre autres, des suppléments et facteurs de croissance pour les cellules endothéliales et un anti-fongique, la fungizone à une concentration de 1% (PromoCell, Heidelberg, Allemagne).

Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours. Les premières colonies de cellules endothéliales résultant de la prolifération clonale d'un progéniteur endothélial sont obtenues après trois à quatre semaines de culture.

En fonction des expériences réalisées ultérieurement, les PCEs sont passés en subculture. A confluence, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont lavées avec du PBS afin d'éliminer le sérum contenu dans le milieu de culture qui inhibe l'activité enzymatique de la trypsine. Les cellules sont détachées à 37°C à l'aide d'un mélange

trypsine/EDTA (Invitrogen, St Aubin, France). Le détachement du tapis cellulaire est contrôlé au microscope optique inversé à contraste de phase. L'action de la trypsine est arrêtée par l'ajout de milieu de culture. La suspension cellulaire est recueillie puis centrifugée à 1000 tours/minute pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire remis en suspension dans du milieu de culture. La suspension cellulaire est ainsi ensemencée : 2.10^5 cellules/puits sur des lamelles dans une plaque B24 pour les expériences d'immunofluorescence, 5000 cellules/puits dans une plaque B96 pour les expériences de prolifération et 1.10^5 cellules/insert de porosité 8µm dans une plaque B24 pour les expériences de migration.

II/ Etude de l'expression de G-CSF et de son récepteur

II-1/ Extraction des ARN totaux

II-1-1/ Principe

Les cellules sont lysées, par action chimique et mécanique, afin d'extraire l'ARN cellulaire. L'ARN est ensuite purifié grâce à son affinité pour la silice contenue dans la mini colonne de purification.

II-1-2/ Protocole expérimental

Les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit RNeasy Mini (Qiagen, Courtaboeuf, France) en suivant les recommandations techniques du fabriquant.

Lyse des cellules :

Les cellules sont lysées chimiquement (tampon d'extraction) et mécaniquement. Le tampon d'extraction contient du thiocyanate de guanidine qui dénature les protéines de la membrane cellulaire et du beta-mercaptoéthanol (1%) qui réduit les ponts disulfures des protéines cellulaires.

Etape préliminaire de délipidation (pour les adipocytes) :

La purification des adipocytes sur la colonne nécessite une étape préliminaire de délipidation afin de ne pas saturer la membrane. Elle est réalisée en ajoutant du chloroforme (un demi-volume) au lysat adipocytaire. La suspension est resuspendue énergiquement afin de permettre au chloroforme de solubiliser les lipides adipocytaires. Après centrifugation (10 minutes, à 13000 rpm), deux phases sont obtenues : une phase aqueuse (phase supérieure) qui contient les ARN totaux et une phase organique (phase inférieure) qui contient les lipides.

Purification des ARN totaux :

Le lysat cellulaire est mélangé, volume à volume, avec de l'éthanol à 70% afin de favoriser l'adsorption des ARN totaux sur le gel de silice de la mini colonne d'extraction. En effet, la silice réagit différemment selon la teneur en eau du milieu ; elle va former des liaisons hydrogènes avec l'ARN. La fixation des ARN totaux sur la silice va permettre de les purifier. L'ADN génomique pouvant contaminer la préparation est digéré par la DNase I (kit RNase-free DNase, Qiagen, Courtaboeuf, France). Les protéines résiduelles sont éliminées par des lavages successifs de la colonne. Les ARN totaux sont élués par ajout d'eau stérile ne contenant pas de RNases. En effet, l'ajout d'eau déplace les liaisons hydrogènes qui s'étaient formées entre la silice et l'ARN ; la silice forme de nouvelles liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau ce qui a pour conséquence « le décrochage » des ARN totaux de la colonne.

Dosage des ARN totaux :

Ils sont dosés par lecture de la densité optique à 260 nm (ND-1000, NanoDrop, USA). Les protéines sont dosées par lecture de la densité optique à 280 nm. Le rapport des densités optiques lues à 260 nm et à 280 nm indique le niveau de contamination des ARN par les protéines. Idéalement il doit être compris entre 1,8 et 2,2.

II-2/ Rétro-transcription des ARN

II-2-1/ Principe

La transcriptase inverse catalyse, à partir d'un brin d'ARN matrice, la synthèse du brin d'ADN complémentaire (ADNc). Le but est d'obtenir l'ADNc des ARN messagers (ARNm) extraits pour ensuite pouvoir l'amplifier par PCR.

II-2-2/ Protocole expérimental

L'ARN est rétrotranscrit en ADNc grâce à la transcriptase inverse du virus de la leucémie murine de Moloney (M-MLV). La matrice d'ARN et les réactifs sont ajoutés dans les proportions suivantes (tableau V) et la réaction de rétro-transcription se fait comme indiquée plus bas (tableau VI).

Tableau V : Réactifs utilisés pour la réaction de rétro transcription.

Réactifs	Quantité pour un échantillon	Rôle
ARN	500 ng	Matrice
Amorces universelles	1 µL	Amorce
Transcriptase inverse	0,75 µL	Rétro-transcription
Tampon 5X	4 µL	Tampon de la transcriptase inverse
dNTPs	2,5 µL	Elongation
RNasine	0,5 µL	Inhibiteur des RNases
Eau stérile ne contenant pas de nucléase	qsp 20 µL	Ajustement du volume réactionnel

Tableau VI : Programme de la réaction de rétro transcription (RT).

Programme de RT
68°C, 5 min : hybridation préliminaire des amorces sur l'ARN 37°C, 1H00 : rétro-transcription

II-3/ PCR en temps réel

II-3-1/ Principe

La PCR en temps réel repose sur le même principe que la PCR classique, à savoir l'amplification cyclique d'un fragment d'ADN, avec pour différence une amplification mesurée non pas au final mais tout au long de la réaction donc en temps réel. En effet, à

chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN produite est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc de pouvoir « quantifier » l'ADN et d'en déduire l'expression des ARNm des gènes d'intérêt.

Pour « quantifier » un échantillon par PCR en temps réel, on détermine le nombre de cycles à partir duquel le produit de PCR est détectable. Le moment d'apparition de ce signal seuil dénommé cycle seuil (Ct) est dépendant de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon amplifié. Le Ct calculé est inversement proportionnel au logarithme décimal du nombre de copies initiales, il est calculé automatiquement par le logiciel d'analyse du thermocycleur. Il est matérialisé sur le graphique ci-dessous par une ligne horizontale orange (figure 27).

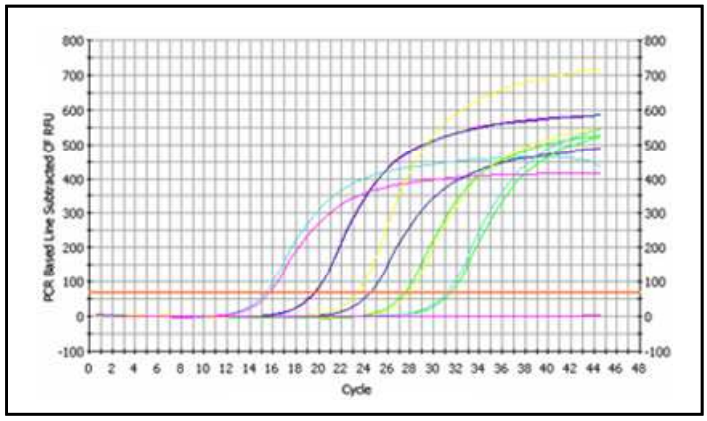


Figure 27 : Exemple de résultat de PCR en temps réel et calcul de cycle seuil (www.ilm.pf/PCRtempsreel).

Chaque courbe sigmoïde représente la mesure de la fluorescence pour un échantillon. Le cycle seuil est matérialisé par une ligne horizontale orange.

Plusieurs systèmes sont utilisés pour détecter le signal fluorescent. Ils sont divisés en deux groupes : les agents intercalants (SybrGreen) (figure 28) et les sondes (Taqman, FRET, Molecular Beacon, Scorpion) (figure 29) (voir le site de la plateforme de PCR en temps réel de l'Institut Louis Malardé à l'adresse suivante : www.ilm.pf/PCRtempsreel).

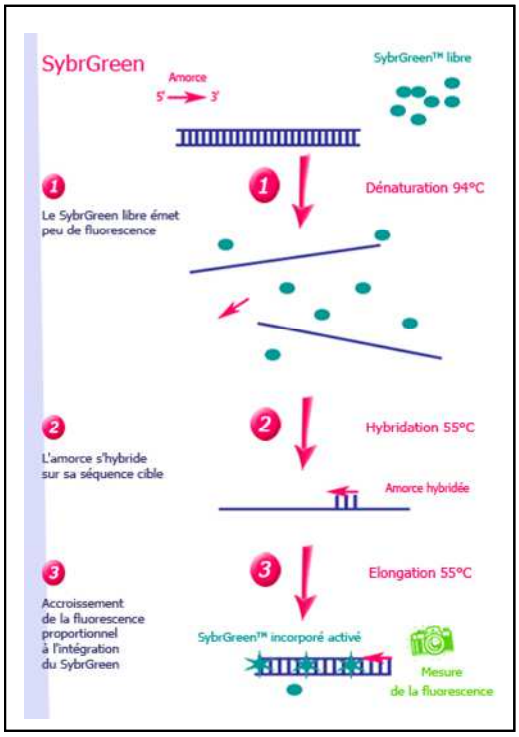


Figure 28 : Principe de la technologie SybrGreen (d'après www.ilm.pf/PCRtempsreel).

(1) Le SybrGreen libre émet peu de fluorescence. (2 et 3) Au cours de la PCR, il va s'incorporer à l'ADN double brin et émettre un signal fluorescent proportionnel à son intégration.

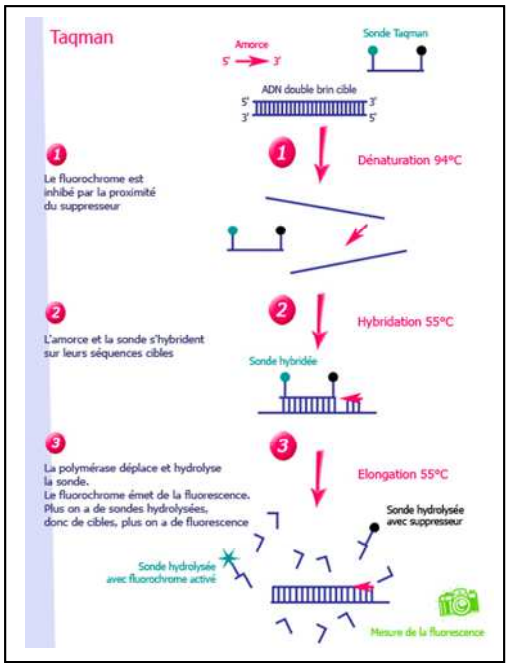


Figure 29 : Principe de la technologie Taqman (d'après www.ilm.pf/PCRtempsreel).

(1) Les sondes sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome émetteur et à leur extrémité 3' par un fluorochrome suppresseur (fluorescent ou non) qui inhibe l'émission de l'émetteur lorsqu'ils sont à proximité. (2 et 3) Au cours de la PCR, si la sonde est hybridée sur sa cible elle est hydrolysée par l'ADN polymérase. L'émetteur ainsi séparé du suppresseur émet un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées.

II-3-2/ Protocole expérimental

II-3-2-a/ Choix du système de détection

La technologie SybrGreen est puissante, économique et facile à mettre en place. Son principal inconvénient est le manque de spécificité de la fluorescence mesurée. En effet, la spécificité de la réaction ne repose que sur l'hybridation spécifique des amorces. C'est pourquoi il est nécessaire de réaliser une courbe de fusion, en fin de réaction, afin de vérifier l'amplification d'un seul et unique produit de PCR. Celle-ci est réalisée en soumettant les amplicons à un gradient de température (55°C à 95°C, par palier de 0,5°C) et en mesurant l'intensité de la fluorescence en continu. La température de fusion des amplicons appelée Tm est représentée par un pic sur la dérivée primaire de cette courbe. Si l'on obtient plusieurs pics à des températures différentes ou des pics décalés par rapport au Tm attendu c'est que l'on est en présence d'un mélange d'amplicons ou d'amplicons ayant une séquence différente. La technologie Taqman est très sensible et très spécifique. En effet, la spécificité de la réaction est liée à la fois à celle des amorces et à celle de la sonde réduisant significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mésappariements ou des dimères d'amorce.

Les deux technologies sont disponibles au laboratoire. Afin d'obtenir un signal plus spécifique, nous avons utilisé la technologie Taqman pour toutes les expériences sauf pour l'étude de l'expression du récepteur du G-CSF pour laquelle nous avons utilisé la technologie SybrGreen. En effet, lors des tests préliminaires avec la technologie Taqman, les Ct du récepteur du G-CSF sortaient trop tardivement ce qui ne nous permettait pas d'exploiter les résultats.

II-3-2-b/ Choix des gènes de ménage

L'expression des gènes d'intérêt est quantifiée en fonction de l'expression d'un gène ubiquitaire dit « gène de ménage ». Ce gène est toujours exprimé, sans mécanisme de régulation et le produit d'expression de ce gène est indispensable à la vie de la cellule. Il s'exprime de la même manière dans toutes les cellules d'un organisme.

En fonction de la littérature [Gabrielsson *et al*., 2005] et de l'expérience du laboratoire, j'ai mesuré l'expression du gène 18S (gène codant pour la petite sous unité ribosomale) et celle de RPL0 (gène codant pour la grande sous unité ribosomale). Les valeurs des Ct de RPL0 présentant moins de dispersion, je l'ai choisi pour normaliser mes données.

II-3-2-c/ Choix des amorces

Dans le cadre de mon projet, j'ai étudié l'expression de G-CSF et de son récepteur dans les cellules isolées du tissu adipeux. En parallèle, j'ai mesuré l'expression de deux autres cytokines inflammatoires (IL-6 et IL-8) connues pour être surexprimées dans l'inflammation du tissu adipeux [Lafontan, 2008].

Pour IL-6 et IL-8, j'ai utilisé les amorces disponibles au laboratoire. Pour G-CSF et son récepteur, nous avons dessiné des amorces à partir du logiciel proposé par Roche en ligne (https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=uplct_030000). A partir du numéro d'accession du gène, nous obtenons des propositions d'amorces utilisables avec les sondes Roche. Les critères de sélection des amorces sont les mêmes que pour toute PCR en temps réel à savoir : petit amplicon (< 100 pb), amorce d'une vingtaine de bases et température d'hybridation de 60°C.

Les nouvelles amorces ont été validées en faisant une gamme de dilution des ADNc d'un type cellulaire et en vérifiant qu'il y avait bien adéquation entre la quantité d'ADNc initialement présente et les Cts obtenus.

Tableau VII : Séquences des amorces utilisées pour les réactions de PCR.

	Amorce sens	Amorce anti-sens
G-CSF	tccaggagaagctggtgagt	ccagagagtgtccgagcag
Récepteur du G-CSF	gtccaagatcacaaagctggt	ccgcactcctccagacttc
IL-6	gcccagctatgaactccttct	gaaggcagcaggcaacac
IL-8	agacagcagagcacacaagc	atggttccttccggtggt
18S	kit contrôle ARN ribosomal 18S (Eurogentec, Angers, France) : mélange amorces sens et anti-sens + sonde	
RPL0	acagggcgacctggaagt	ggatctgctgcatctgctt

II-3-2-d/ Protocole de PCR

La matrice d'ADNc et les réactifs sont ajoutés dans les proportions suivantes (tableau VIII) et la réaction de PCR se fait comme indiquée plus bas (tableau IX) dans un thermocycleur Prism7000 (Applied Biosystems, Villebon-sur-Yvette, France). Tous les échantillons sont passés en duplicats.

Tableau VIII : Réactifs utilisés pour les réactions de PCR.

Réactifs	Quantité pour un échantillon (en µL)	Rôle
Mélange commercial de PCR 2X	10	Polymérisation/élongation
Mélange amorce sens et anti-sens (10µM)	0,4	Amorce
Sonde	0,2	Détection
Eau stérile ne contenant pas de nucléase	qsp 15 µL	Ajustement du volume réactionnel
ADNc (8 ng)	5	Matrice

Tableau IX : Programme de PCR.

Programme de PCR	
95°C, 10 min : dénaturation	1 cycle
95°C, 10 s : dénaturation	40 cycles
60°C, 1 min : hydridation et élongation	

III/ Etude de la sécrétion de G-CSF

Nous avons étudié la sécrétion de G-CSF au niveau cellulaire (macrophages) et au niveau tissulaire (milieux de sécrétion de biopsies de TASC et TAV). Les sécrétions de différentes adipokines (adiponectine, leptine, IL-6 et IL-8) ont été évaluées en parallèle de celle de G-CSF pour les études tissulaires. Des dosages ELISA ont été réalisés pour évaluer ces sécrétions.

III-1/ Etude de la sécrétion de G-CSF au niveau cellulaire

III-1-1/ Principe

Des macrophages sont rendus inflammatoires par ajout de lipopolysaccharide (LPS) et sont traités ou non par la pravastatine. Le but est de savoir si cette statine (molécule aux propriétés anti-inflammatoires ; pour revue Bu *et al*., 2011) agit sur l'inflammation des macrophages, et plus particulièrement sur la sécrétion de G-CSF.

III-1-2/ Protocole expérimental

Une fois que les monocytes sanguins se sont différenciés *in vitro* en macrophages, les cultures se font en milieu RPMI 1% de SVF. Quatre conditions expérimentales sont alors testées :

- aucune modification des conditions de culture (« **groupe contrôle** ») ;
- induction d'une inflammation par ajout de LPS extrait d'*E.Coli* 0127B8 (100 ng/mL ; Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) au milieu de culture (« **groupe LPS** ») ;
- ajout de pravastatine (25 µM) (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) au milieu de culture (« **groupe pravastatine** ») ;
- ajout de LPS (100 ng/mL) et de pravastatine (25 µM) au milieu de culture (« **groupe LPS + pravastatine** »).

Les cellules sont cultivées dans ces conditions pendant 24H00. Les milieux de sécrétion des macrophages sont collectés puis décantés par centrifugation à 4°C (10 min, à 10000t/min). Ils sont ensuite aliquotés et conservés à -80°C en attendant d'être dosés par ELISA.

III-2/ Etude de la sécrétion de G-CSF au niveau tissulaire

Dix patients ont été sélectionnés à partir de la base de données répertoriant les personnes souffrant d'obésité massive suivies au Service de Nutrition de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière et ayant accepté d'intégrer un protocole de recherche selon les critères suivants :

- le genre ;

- le statut diabétique ou non diabétique ;
- l'âge.

Compte tenu de la petite taille de notre échantillon, pour ne pas induire de biais, nous avons retenu exclusivement des femmes non diabétiques. Elles ont entre 37 et 41 ans. Leur IMC est compris entre 45 et 49 kg/m².

Les milieux de sécrétion nécessaires aux dosages ont été réalisés après mise en culture des biopsies de tissu adipeux sous-cutané et viscéral prélevées lors des opérations de chirurgie bariatrique.

Nous avons choisi de mesurer la sécrétion de deux adipokines : l'adiponectine et la leptine. En effet, leur profil de sécrétion dans le tissu adipeux sous-cutané et viscéral est connu [Ibrahim, 2010] ce qui va nous permettre de valider notre modèle. De la même façon, en parallèle de la cytokine d'intérêt G-CSF, nous avons évalué la sécrétion de deux autres cytokines inflammatoires de profils connus (IL-8 et IL-6). IL-6 est la cytokine de référence au niveau de l'inflammation du tissu adipeux et IL-8 présente un effet chimioattractant sur les leucocytes [Bruun *et al*., 2004].

III-3/ Dosage ELISA

III-3-1/ Principe

Plusieurs techniques de dosage ELISA ont été développées : dosages par compétition ou par révélation directe ou indirecte (technique « sandwich »). C'est cette dernière que nous utiliserons ici. Elle consiste à capturer, à l'aide de deux anticorps, l'antigène d'intérêt afin de pouvoir le doser par comparaison à un standard de concentration connue.

III-3-2/ Protocole expérimental

Les sécrétions ont été évaluées grâce à des kits de dosage ELISA (kits DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) pour toutes les adipokines sauf pour IL-8 (PeproTech, Londres, UK). Après avoir effectué des tests préliminaires afin de déterminer la dilution adéquate à utiliser, j'ai réalisé les différents dosages en duplicat en suivant les recommandations préconisées dans les protocoles des fabricants (figure 30).

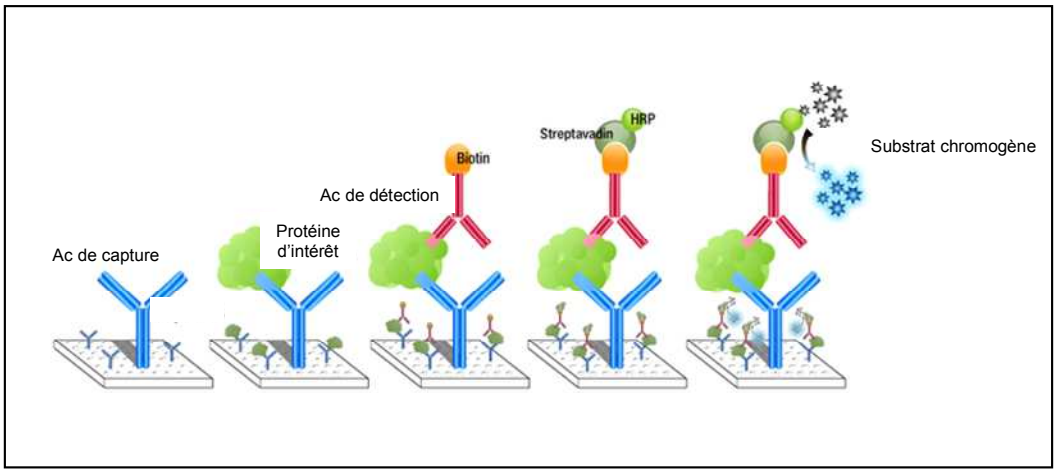


Figure 30 : Protocole schématisé d'un dosage ELISA « en sandwich ».

(1) La plaque est recouverte avec un anticorps de capture ; (2) l'échantillon est ajouté, l'antigène est reconnu et se lie à l'anticorps de capture ; (3) l'anticorps de détection biotinylé est ajouté et se lie à l'antigène ; (4) Le complexe enzymatique (streptavidine/peroxydase (HRP) ou avidine/peroxydase selon les kits) est ajouté et se lie à l'anticorps de détection. Cette liaison se fait grâce à la forte affinité de la streptavidine ou de l'avidine pour la biotine ; (5) Le substrat chromogène est ajouté et est clivé par la peroxydase en une forme colorée détectable dosée par spectrophotométrie (lecture de la densité optique à 405 ou 450 nm).

IV/ Caractérisation des progéniteurs des cellules endothéliales par immunofluorescence

IV-1/ Principe

L'immunofluorescence permet la détection des protéines membranaires, cytosoliques ou nucléaires dans des cellules préalablement fixées et perméabilisées. La détection se fait grâce à un anticorps primaire qui reconnaît spécifiquement les épitopes de la protéine cible, ce dernier est ensuite visualisé grâce à un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome.

IV-2/ Protocole expérimental

IV-2-1/ Ensemencement des cellules sur lamelles

Les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre afin de pouvoir, par la suite, être observées au microscope. Les PCEs sont trypsinés la veille de l'expérience puis ensemencés, sur des lamelles préalablement recouverte de collagène, à raison de 2.10^5 cellules/puits dans une plaque B24.

IV-2-2/ Fixation des cellules

Les cellules sont rincées avec du PBS afin d'enlever les traces de milieu de culture et notamment de sérum qui pourraient empêcher la bonne fixation des cellules. Elles sont ensuite fixées avec une solution contenant 4% de paraformaldéhyde (PAF) (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) pendant 30 minutes à température ambiante. La solution de fixation est remplacée par une solution de PBS-glycine 0,1M pour neutraliser l'action du PAF.

IV-2-3/ Perméabilisation des cellules

Les cellules sont perméabilisées avec une solution de PBS contenant 3% d'albumine et 0,1% de Triton X-100 pendant 5 minutes à température ambiante. Le triton qui est un puissant détergent va perméabiliser la membrane cellulaire.

IV-2-4/ Immunodétection des protéines

Les progéniteurs des cellules endothéliales donnent par expansion clonale des cellules endothéliales en culture. Dans un premier temps, nous avons réalisé un double marquage endothélial : CD31 et vWF. Le CD31 est le marqueur membranaire de référence des cellules endothéliales et le facteur de VonWillebrand est spécifique de la lignée endothéliale [Fadini *et al*., 2008]. Dans un second temps, nous avons réalisé un marquage du cytosquelette d'actine pour visualiser la taille et la forme des PCEs.

Afin de limiter le bruit de fond, les sites non spécifiques sont saturés par ajout du tampon PBS-3% albumine (30 minutes). L'anticorps primaire, préalablement dilué au 1/100 dans le même tampon, est ensuite incubé toute la nuit, sous agitation à 4°C. Le lendemain, les lamelles sont rincées (six fois cinq minutes) avec du PBS afin d'éliminer l'excédent d'anticorps. Les sites non spécifiques sont saturés par ajout du tampon PBS-3% albumine (30 minutes). L'anticorps secondaire (préalablement dilué au 1/250 dans le même tampon) et le DAPI (Abbot Mol Inc, USA) (préalablement dilué au 1/100) sont incubés une heure à température ambiante et à l'obscurité. Le DAPI qui est un intercalant de l'ADN émet une fluorescence bleue lorsqu'il est excité et nous permettra de visualiser les noyaux des cellules.

Les lamelles sont ensuite rincées (six fois 5 minutes) avec du PBS afin d'éliminer l'excédent d'anticorps.

Tableau X : Anticorps utilisés pour les expériences d'immunofluorescence.

Anticorps dirigé contre	Référence	Caractéristiques
CD31	DAKO Clone JC70A	Ac primaire, anti souris
vWF	DAKO polyclonal A0082	Ac primaire, anti lapin
actine	Alexa Fluor 546 Phalloïdin	
Ac primaire	Alexa Fluor 488 anti souris Alexa Fluor 546 anti lapin	Ac secondaire, Alexa Fluor 488 (vert) Alexa Fluor 546 (rouge)

IV-2-5/ Montage et observation du marquage

Afin de pouvoir les observer, les lamelles sont ensuite montées sur des lames dans du milieu de montage Fluoprep® (Biomérieux, Lyon, France) qui préserve l'intensité de la fluorescence. Afin d'éviter toute évaporation, du vernis incolore est déposé autour de la lamelle et les lames sont conservées à 4°C et à l'obscurité jusqu'à leur observation.

L'observation des marquages cellulaires se fait à l'aide d'un microscope confocal (Zeiss LSM710) au centre d'imagerie cellulaire du Centre de Recherche des Cordeliers et avec l'aide de Christophe KLEIN, l'ingénieur responsable de ce service commun.

V/ Etude de la prolifération cellulaire des progéniteurs des cellules endothéliales

V-1/ Principe

Le test MTT (Promega, Madison, WI, USA) est une adaptation du test de prolifération développé par Mosmann [Mosmann, 1983]. Il permet une quantification rapide et sensible de la prolifération et de la viabilité cellulaires. Ce test est basé sur l'activité d'un enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. En présence du substrat MTT, les sels de tétrazolium du substrat sont transformés en cristaux insolubles de formazan grâce à l'activité de la succinate déshydrogénase. La quantité de sel formazan produite par les cellules à partir du MTT est mesurée par spectrophotométrie.

V-2/ Protocole expérimental

Les PCEs sont trypsinés la veille de l'expérience puis ensemencés à raison de 5000 cellules/puits dans une plaque B96, préalablement recouverte de collagène. Le lendemain, le milieu de culture est remplacé par les milieux à tester :

- milieu de sécrétion de TAV de patient obèse massif ;
- milieu de sécrétion de TAV de patient obèse massif additionné de l'anticorps neutralisant de G-CSF (1µg/mL) ;
- milieu de culture de base pour les cellules endothéliales additionné de la protéine recombinante humaine de G-CSF (rhG-CSF) (25 ng/mL) (Peprotech, Londres, UK)
- milieu de culture de base des cellules endothéliales (contrôle) ;
- milieu de culture de croissance des PCEs additionné de 10% de SVF (contrôle « positif »).

Afin de s'assurer que l'effet (potentiel) observé par ajout de l'anticorps neutralisant est bien imputable à celui-ci des immunoglobulines (25 µg/mL) sont ajoutées dans les puits sans anticorps.

Les cellules sont cultivées ainsi de deux à trois jours et chaque condition est réalisée en quadruplicat. La solution de MTT est ajoutée (20µL/puits) et est incubée pendant environ trois heures à 37°C ; l'aspect des cellules est surveillé au microscope. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 490 nm.

VI/ Test de migration cellulaire des progéniteurs des cellules endothéliales

VI-1/ Principe

Les cellules sont cultivées en système « transwell ». Les différents milieux potentiellement attracteurs sont ajoutés dans la partie inférieure du puits et les cellules à tester dans la partie supérieure. La quantité de cellules ayant migré est évaluée par une coloration au crystal violet du filtre contenu dans l'insert du « transwell » (figure 31).

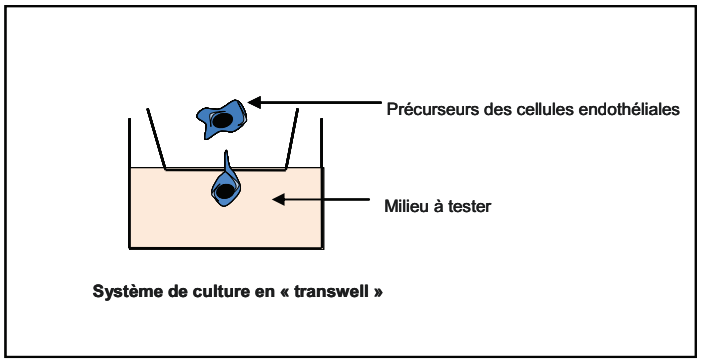


Figure 31 : Principe de l'expérience de migration cellulaire.

Les milieux à tester sont ajoutés dans la partie inférieure du puits et les cellules à tester dans la partie supérieure. La quantité de cellules ayant migré est évaluée par une coloration au crystal violet du filtre contenu dans l'insert du « transwell ».

VI-2/ Protocole expérimental

Les PCEs sont trypsinés la veille de l'expérience puis ensemencés à une concentration de 1.10^5 cellules/insert de porosité 8µm, dont les membranes ont été préalablement recouvertes de collagène de type I, dans une plaque B24. Les milieux à tester sont ajoutés dans la partie inférieure :

- milieu de sécrétion de TAV de patient obèse massif ;
- milieu de culture de base pour cellule endothéliale (contrôle).

Les cellules sont placées dans ces conditions pendant six heures puis elles sont fixées avec une solution à 4% de paraformaldéhyde (20 minutes, à température ambiante). La solution de fixation est éliminée par deux lavages avec du PBS additionné de 2% de SVF. Les membranes cellulaires sont perméabilisées avec de l'éthanol à 20% (20 minutes, à température ambiante). L'éthanol est éliminé et remplacé par une solution de crystal violet à 0,5% (préparée dans de l'éthanol à 20%) qui va permettre de colorer les cellules (20 minutes à température ambiante). Les cellules sont décolorées à l'eau et les cellules qui n'ont pas migré et qui se trouvent dans le fond de l'insert sont éliminées à l'aide d'un coton tige. Le filtre de l'insert est découpé au scalpel et placé dans un tampon d'élution. La densité optique de la solution obtenue est lue à 600 nm.

VII/ Analyse statistique des données

Les expériences de PCR en temps réel et les dosages ELISA ont été réalisés en duplicat pour chaque échantillon. Les expériences de sécrétion de G-CGF par les macrophages ont été effectuées à partir de cinq cultures différentes. Les valeurs sont exprimées sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard de la moyenne (sem).

Du fait du petit nombre d'échantillons ($n<30$), j'ai seulement réalisé des tests non paramétriques : tests de **Mann-Whitney** et de **Kruskal-Wallis** pour comparer les données d'expression génique, test de **Wilcoxon** pour comparer les données (pairées) de sécrétion, **cœfficient de Spearman** pour les études de corrélation.

Une valeur de p inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative ($p<0,05$ *, $p<0,01$**, $p<0,005$***).

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de la version 5 du logiciel GraphPad PRISM (GrapPad Software Ic, San Diedo, CA, USA).

Résultats

I/ G-CSF et le tissu adipeux blanc humain

I-1/ Etude de l'expression de G-CSF par les adipocytes : influence du statut pondéral

Avant d'étudier l'expression de G-CSF et de son récepteur au sein du tissu adipeux, nous avons commencé par étudier l'influence du statut pondéral sur l'expression de G-CSF. En effet, l'expression d'un certain nombre d'adipokines est augmentée au cours de l'obésité [Lafontan, 2008], notamment celle des cytokines pro-inflammatoires telle qu'IL-8 qui nous servira de référence dans cette étude [Bruun *et al*., 2004].

Nous avons constitué un échantillon d'adipocytes (n=29) isolés à partir du TASC de personnes normopondérales, en surpoids ou obèses (IMC compris entre 20 et 69). Les sujets ayant un IMC inférieur ou égal à 25 ont été considérés comme appartenant « au groupe mince » (n=6), à l'inverse de ceux ayant un IMC supérieur à 25 qui ont été considérés comme appartenant « au groupe obèse » (n=23). L'expression de G-CSF a été étudiée par PCR en temps réel ; les valeurs d'expression ont été normalisées par rapport à celles du gène de ménage RPL0. Un test de Mann-Whitney a été réalisé afin d'évaluer la significativité de la différence observée entre les moyennes des valeurs d'expression des deux groupes.

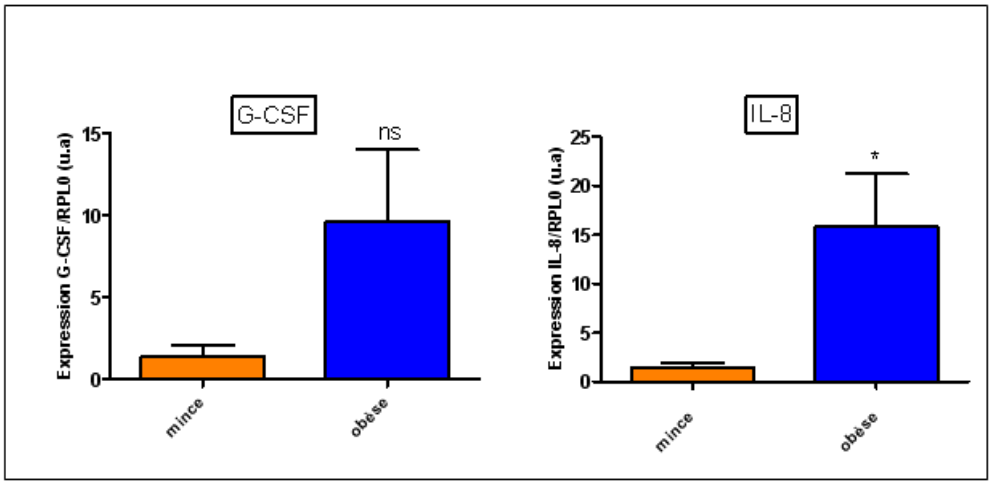


Figure 32 : Influence du statut pondéral sur l'expression du facteur de croissance des colonies de granulocytes.

Les adipocytes on été isolés à partir du tissu adipeux sous-cutané de sujets dits « minces » (IMC ≤ 25, n=6) ou « obèses » (IMC > 25, n=23). L'expression du facteur de croissance des colonies de granulocytes (G-CSF) et de

l'interleukine IL-8 ont été étudiées par PCR en temps réel. Les valeurs d'expression ont été normalisées par rapport à celles du gène de ménage RPL0. La significativité de la différence observée entre les moyennes des valeurs d'expression des deux groupes a été évaluée par un test de Mann-Whitney (* $p<0,05$).

L'expression d'IL-8 est significativement augmentée dans le « groupe obèse » par rapport au « groupe mince » ($p=0.0178$). Ces résultats sont conformes aux résultats publiés [Bruun *et al*., 2004] et valide l'utilisation d'IL-8 comme référence. L'expression de G-CSF est elle aussi augmentée dans le « groupe obèse ». Toutefois la différence observée entre les moyennes des deux groupes n'est pas statistiquement significative ($p=0.1005$). Cela pourrait s'expliquer par la dispersion des valeurs d'expression au sein du « groupe obèse ». Le statut pondéral semble influencer l'expression de G-CSF qui est augmentée « chez l'obèse ».

I-2/ Etude de l'expression de G-CSF et de son récepteur dans les principaux types cellulaires du tissu adipeux

Nous avons montré que l'expression de G-CSF est augmentée dans les adipocytes de sujets obèses. Nous avons ensuite étudié l'expression de G-CSF et celle de son récepteur dans les différents types cellulaires du tissu adipeux afin de voir si elle était spécifique d'un type cellulaire. Nous avons également mesuré, en parallèle, l'expression de deux autres cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8) dont le rôle est connu dans la physiopathologie du tissu adipeux chez l'obèse [Bruun *et al*., 2004 ; Lafontan, 2011].

Nous avons constitué un échantillon des principales cellules du tissu adipeux (n=43) composé d'adipocytes (n=14), de pré-adipocytes (n=12), de macrophages (n=8) et de cellules endothéliales (CD31+ ; n=9). Ces cellules ont été isolées à partir du TASC et du TAV de patients obèses massifs. L'expression de G-CSF, de son récepteur et des interleukines IL-6 et IL-8 ont été étudiées par PCR en temps réel ; les valeurs d'expression ont été normalisées par rapport à celles du gène de ménage RPL0. Un test de Kruskal-Wallis, suivi d'un test de comparaison multiple de Dunn, ont été réalisés afin d'évaluer la significativité de la différence observée entre les moyennes des valeurs d'expression des quatre types cellulaires deux à deux.

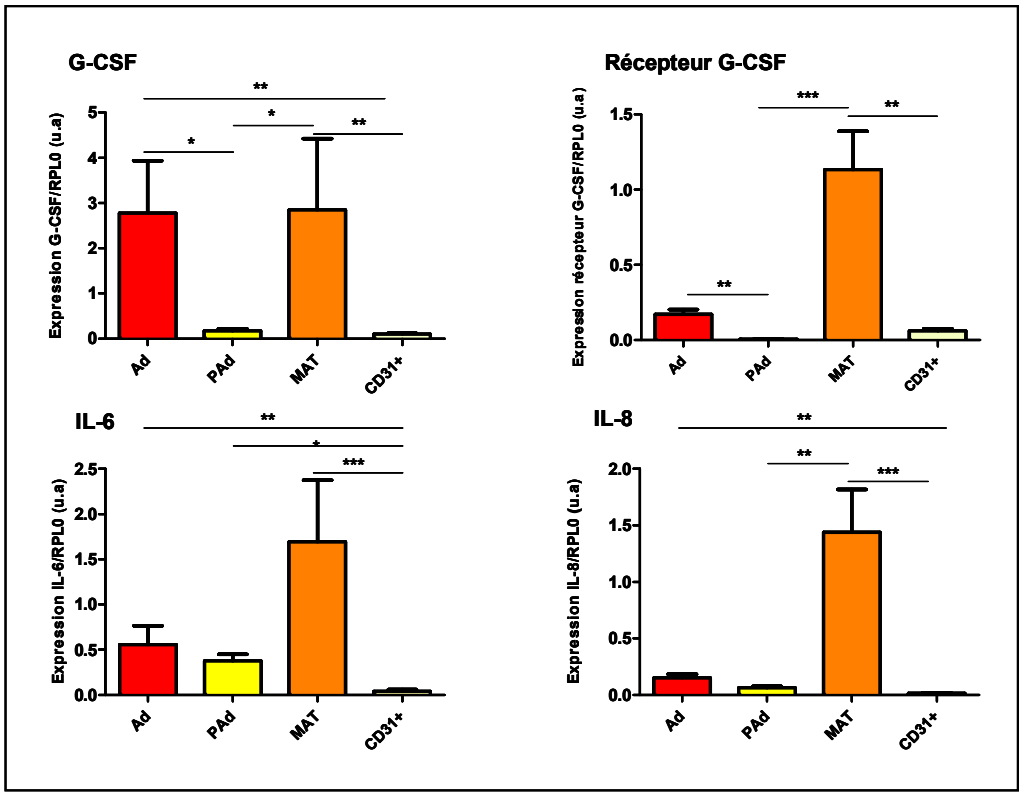


Figure 33 : Expression de G-CSF et de son récepteur dans les principaux types cellulaires du tissu adipeux de patients obèses massifs.

Les quatre types cellulaires étudiés : les adipocytes (Ad), les pré-adipocytes (PAd), les macrophages (MAT) et les cellules endothéliales (CD31+) ont été isolés à partir du tissu adipeux de patients obèses massifs. L'expression du facteur de croissance des colonies de granulocytes (G-CSF), de son récepteur et des interleukines IL-6 et IL-8 ont été étudiées par PCR en temps réel. Les valeurs d'expression ont été normalisées par rapport à celles du gène de ménage RPL0. La significativité de la différence observée entre les moyennes, deux à deux, des valeurs d'expression des quatre types cellulaires a été évaluée par un test de Kruskal-Wallis, suivi d'un test de comparaison multiple de Dunn (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$).

Les expressions d'IL-6 et d'IL-8 sont significativement augmentées pour les macrophages par rapport aux pré-adipocytes et aux cellules endothéliales. Ces deux cytokines sont aussi plus exprimées par les macrophages que par les adipocytes sans toutefois que cette différence soit significative. Les cytokines IL-6 et IL-8 sont deux cytokines pro-inflammatoires et les macrophages sont connus pour sécréter la majorité des cytokines inflammatoires [Surmi *et* Hasty, 2010]. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature. L'expression de G-CSF est significativement augmentée pour les adipocytes et les macrophages par rapport aux deux autres types cellulaires étudiés que sont les pré-adipocytes et les cellules endothéliales. Son récepteur est lui plus exprimé par les macrophages que par les autres types cellulaires. L'expression du récepteur de G-CSF est significativement augmentée pour les macrophages par rapport aux pré-adipocytes et aux cellules endothéliales.

Son expression est également augmentée pour les adipocytes, mais cette différence d'expression est seulement significative pour les pré-adipocytes (et pas pour les cellules endothéliales). G-CSF est majoritairement exprimé par les adipocytes et les macrophages tandis que son récepteur est majoritairement exprimé par les macrophages.

I-3/ Effet de la pravastatine sur la sécrétion de G-CSF par les macrophages

Nous avons montré que le G-CSF est majoritairement exprimé par les macrophages du tissu adipeux des patients obèses massifs. Nous savons également que ce sont les macrophages qui sécrètent la majorité des cytokines inflammatoires [Surmi *et* Hasty, 2010]. De plus, la production de G-CSF, cytokine ayant elle-même une action inflammatoire, est induite par de nombreux médiateurs de l'inflammation dont le LPS [Panopoulos *et* Watowich, 2008]. Nous avons voulu étudier l'effet des statines (molécules connues pour avoir des effets anti-inflammatoires [Bu *et* al., 2011] sur la sécrétion de G-CSF par des macrophages rendus inflammatoires.

Nous avons différencié *in vitro* des monocytes en macrophages et les avons rendus inflammatoires par traitement avec le LPS. Nous avons ensuite étudié l'effet d'une statine, la pravastatine, sur la sécrétion de G-CSF. La sécrétion de G-CSF a été évaluée par dosage ELISA à partir des surnageants des cultures de macrophages. Cinq cultures différentes de macrophages ont été réalisées à partir de sang périphérique de patients obèses et les dosages ont été réalisés en triplicat.

Quatre conditions expérimentales ont été testées, pour chaque culture :

- aucune modification des conditions de culture (« groupe contrôle ») ;
- induction d'une inflammation par ajout de LPS au milieu de culture (« groupe LPS ») ;
- ajout de pravastatine au milieu de culture (« groupe pravastatine ») ;
- ajout de LPS et de pravastatine au milieu de culture (« groupe LPS + pravastatine »).

Les cellules sont cultivées dans ces conditions pendant 24H00.

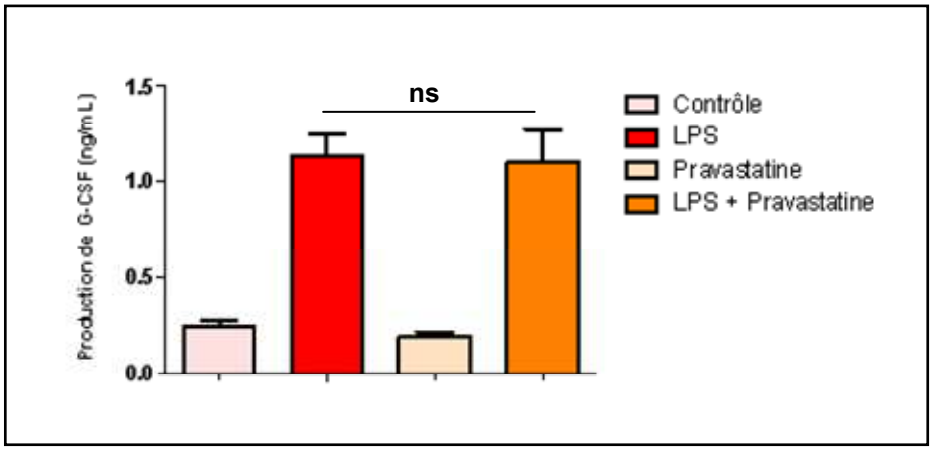


Figure 34 : Effet de la pravastatine sur la sécrétion du facteur de croissance des granulocytes par les macrophages.

Les macrophages ont été obtenus par différenciation *in vitro* de monocytes isolés de sang périphérique de patients obèses. La sécrétion du facteur de croissance des colonies de granulocytes (G-CSF) a été évaluée par dosage ELISA. Quatre conditions ont été testées : « contrôle » (aucune modification du milieu de culture), « macrophages inflammatoires » (milieu de culture + LPS), « pravastatine seule» (milieu de culture + pravastatine) et « macrophages inflammatoires traités à la pravastatine » (milieu de culture + LPS + pravastatine). La significativité de la différence observée entre les moyennes, deux à deux, des valeurs de sécrétion des quatre conditions a été évaluée par un test de Wilcoxon.

Le traitement au LPS a bien rendu les macrophages inflammatoires ; en effet, la sécrétion de G-CSF est augmentée pour le groupe « macrophages inflammatoires » par rapport au groupe « contrôle ». La pravastatine seule n'influence pas la sécrétion de G-CSF par les macrophages. Ces résultats nous permettent de valider l'expérience et d'interpréter les résultats de la condition expérimentale que nous voulions tester à savoir l'éventuel effet d'un traitement à la pravastatine sur la sécrétion de G-CSF par des macrophages rendus inflammatoires. Les résultats montrent que la pravastatine n'influence pas la production de G-CSF par des macrophages inflammatoires ; la pravastine ne semble donc pas avoir d'effet anti-inflammatoire sur les macrophages (pour un traitement de 24H00).

I-4/ Etude de la sécrétion de G-CSF par le tissu adipeux : influence de la localisation anatomique

Nous avons ensuite étudié la sécrétion de G-CSF au niveau tissulaire. Nous avons comparé la sécrétion de G-CSF dans les deux dépôts du tissu adipeux, sous-cutané et viscéral, afin de voir si celle-ci dépendait de l'origine anatomique du tissu adipeux. En effet, les

données de la littérature montrent que les sécrétions de cytokines pro-inflammatoires sont augmentées dans le TAV par rapport au TASC au cours de l'obésité [Lafontan, 2008]. IL-6 et IL-8 seront donc étudiées en parallèle de G-CSF et serviront de référence. De la même façon, nous avons mesuré les sécrétions d'adiponectine et de leptine dans le TASC et le TAV afin de vérifier si elles sont conformes aux données de la littérature pour pouvoir valider notre modèle.

Nous avons constitué un échantillon de dix patientes obèses massives, non diabétiques, ayant subi une opération de chirurgie bariatrique. Les biopsies tissulaires (TASC et TAV) ont été prélevées lors de ces opérations. Un fragment de ces biopsies a été mis en culture afin d'obtenir des milieux de sécrétion pour chaque dépôt adipeux. La sécrétion des différentes molécules a été évaluée par un dosage ELISA à partir de ces milieux. Chaque dosage a été réalisé en duplicat. Un test de Wilcoxon a été réalisé afin d'évaluer la significativité de la différence observée entre les moyennes des valeurs de sécrétion des deux dépôts adipeux.

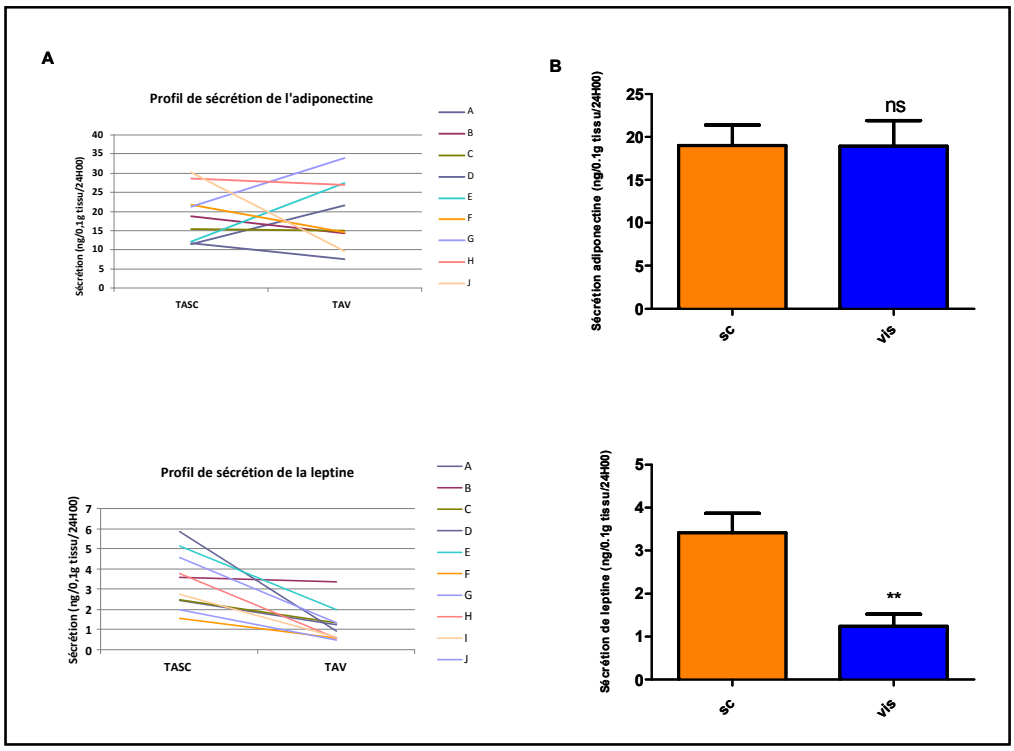


Figure 35 : Influence de la localisation anatomique sur la sécrétion d'adiponectine et de leptine.

Les sécrétions d'adiponectine et de leptine ont été évaluées par dosage ELISA à partir des milieux obtenus après la mise en culture d'un fragment des biopsies de tissu adipeux sous-cutané et viscéral, prélevées lors des opérations de chirurgie bariatrique subies par dix patientes obèses massives. (A) Profil de sécrétion pour chaque patiente ; (B) Moyenne des valeurs de sécrétion pour chaque dépôt adipeux. La significativité de la différence

observée entre les moyennes des valeurs de sécrétion des deux dépôts adipeux a été évaluée par un test de Wilcoxon (* p<0,05 ; ** p<0,01).

Il existe une grande variabilité individuelle des profils de sécrétion de l'adiponectine ; elle n'est pas majoritairement sécrétée par le TAV comme attendu selon les données de la littérature [Ibrahim, 2010]. A l'inverse, les profils d'expression de la leptine sont moins dispersés et notamment pour le TAV. Conformément aux données de la littérature elle est moins sécrétée dans le TAV que dans le TASC au cours de l'obésité [Ibrahim, 2010].

La sécrétion d'adiponectine est semblable dans les deux dépôts adipeux : **19 ng/0,1 g de tissu/24H00**. En revanche, la sécrétion de leptine est plus forte dans le TASC : **3,4 ng/0,1 g de tissu/24H00 pour le TASC** contre **1,2 ng/0,1 g de tissu/24H00 pour le TAV**. Cette augmentation est statistiquement significative (p=0.0020).

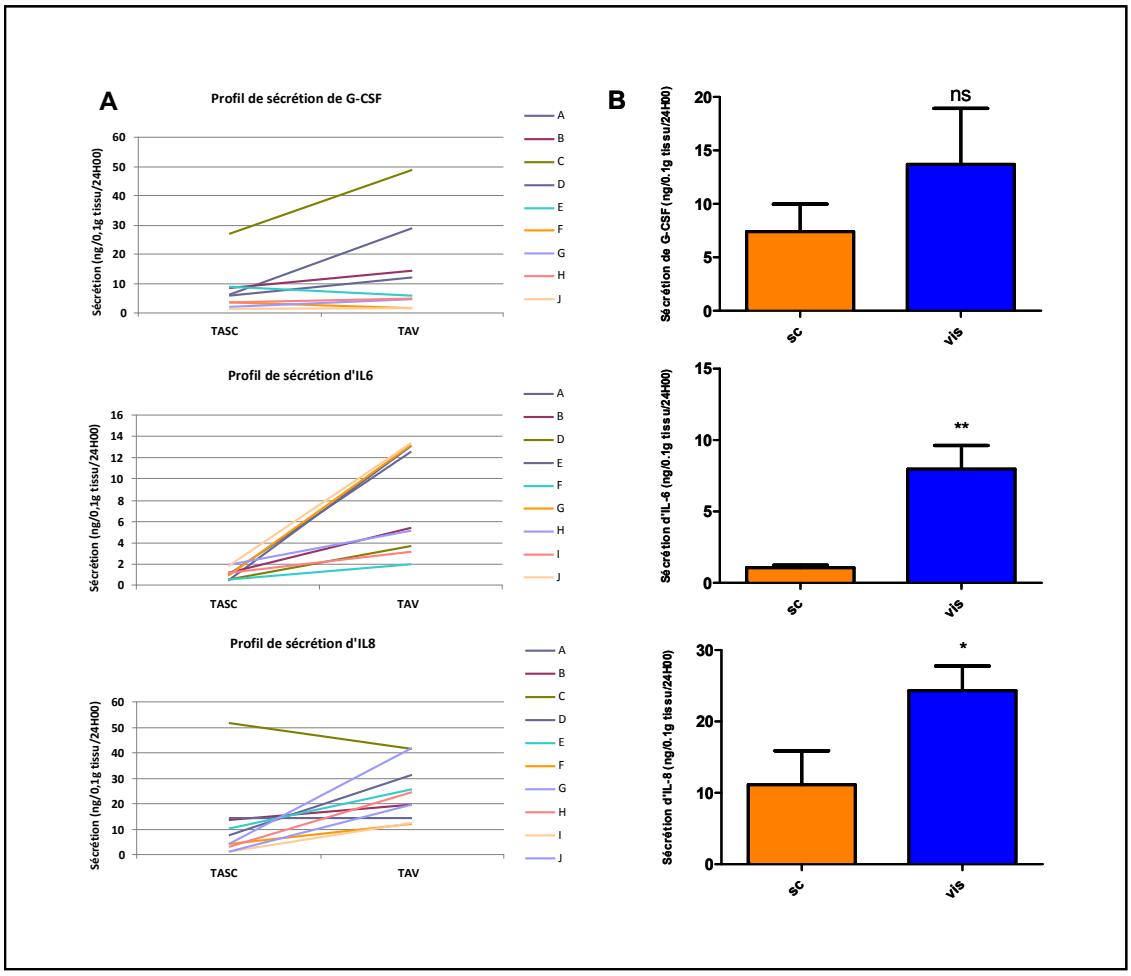


Figure 36 : Influence de la localisation anatomique sur la sécrétion du facteur de croissance des colonies de granulocytes et des interleukines IL-6 et IL-8.

Les sécrétion du facteur de croissance des colonies de granulocytes (G-CSF) et des interleukines IL-6 et IL-8 ont été évaluées par dosage ELISA à partir des milieux de sécrétion obtenus après la mise en culture d'un fragment des biopsies de tissu adipeux sous-cutané et viscéral, prélevées lors des opérations de chirurgie bariatrique subies par dix patientes obèses massives. (A) Profil de sécrétion pour chaque patiente ; (B) Moyenne des valeurs de sécrétion pour chaque dépôt adipeux. La significativité de la différence observée entre les moyennes des valeurs de sécrétion des deux dépôts adipeux a été évaluée par un test de Wilcoxon (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

A l'exception d'une patiente (patiente C) présentant des taux de sécrétion très élevés, les sécrétions des trois cytokines sont plus homogènes dans le TASC que dans le TAV. Comme attendu les sécrétions des interleukines IL-6 et IL-8 sont plus importantes dans le TAV [Ibrahim, 2010].

IL-6 est plus sécrété par le TAV que par le TASC : **13,7 ng/0,1 g de tissu/24H00** contre **1,1 ng/0,1 g de tissu**/24H00. De la même façon, IL-8 est plus sécrété par le TAV que par le TASC : **24,3 ng/0,1 g de tissu/24H00** contre **11,1 ng/0,1 g de tissu/24H00**. Ces augmentations sont statistiquement significatives ($p=0,0039$ pour IL-6 et $p=0,0137$ pour IL-8).

G-CSF est plus sécrété par le TAV que par le TASC : **13,7 ng/0,1 g de tissu/24H00** contre **7,4 ng/0,1 g de tissu/24H00,** bien qu'augmentée cette différence est statistiquement non significative ($p=0,0977$). Le facteur de croissance des colonies de granulocytes semble être plus sécrété par le tissu adipeux viscéral, ce qui serait concordant avec le fait que la majorité des cytokines pro-inflammatoires sont majoritairement sécrétées par ce dépôt adipeux.

I-5/ Relations entre les sécrétions du facteur de croissance des colonies de granulocytes, l'interleukine IL-8 et l'adiponectine dans le tissu adipeux sous-cutané

J'ai réalisé des études de corrélations (test de Spearman) afin d'étudier les éventuelles relations entre les sécrétions des différentes adipokines étudiées.

Afin de ne pas biaiser ces corrélations, j'ai exclu la patiente C qui présentait des taux de sécrétion « hors norme » (et ce même après vérification). J'ai également dû retirer la patiente J pour laquelle il me manquait la valeur du dosage de G-CSF. Au final, les études de corrélations ont donc été effectuées sur un groupe de huit patientes.

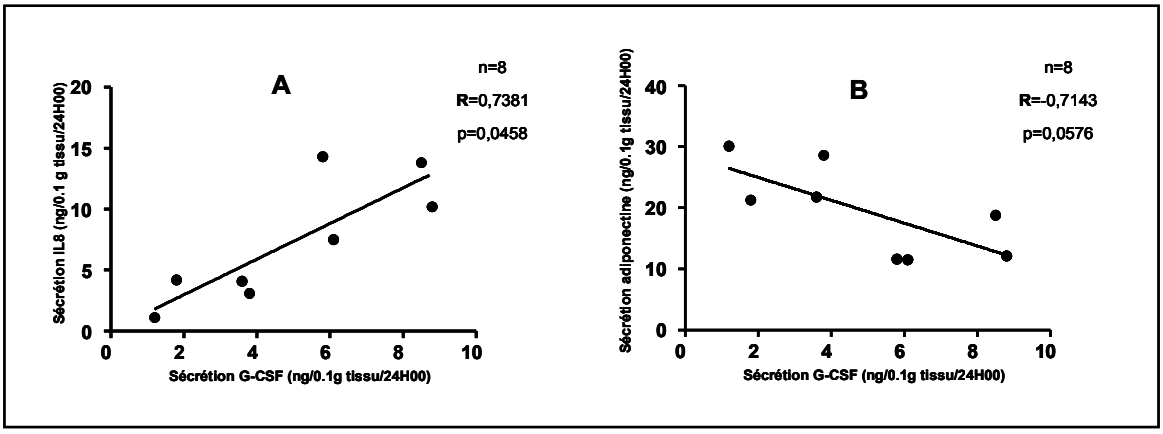


Figure 37 : Corrélations entre les taux de sécrétion du facteur de croissance des colonies de granulocytes et les taux de sécrétion de l'interleukine IL-8 et entre les taux de sécrétion du facteur de croissance des colonies de granulocytes et les taux de sécrétion de l'adiponectine dans le tissu adipeux sous-cutané.

(A) Corrélation positive entre les taux de sécrétion du facteur de croissance des colonies de granulocytes et ceux de l'interleukine IL-8 (n=8).

(B) Corrélation négative entre les taux de sécrétion du facteur de croissance des colonies de granulocytes et ceux de l'adiponectine (n=8).

Les corrélations ont été testées grâce à un test de Spearman.

La sécrétion de G-CSF est positivement corrélée (R=0,74, p=0,0458) à celle d'IL-8 et négativement corrélée (R=-0,71, p=0,0576) à celle de l'adiponectine dans le tissu adipeux sous-cutané. La corrélation positive est statistiquement significative et la corrélation négative est à la limite de la significativité.

***

Notre hypothèse de travail propose que le facteur de croissance des colonies de granulocytes puisse participer, par la mobilisation des progéniteurs des cellules endothéliales, à la néovascularisation réparatrice du tissu adipeux au cours de l'obésité. Nous avons donc isolé des progéniteurs des cellules endothéliales, à partir de sang périphérique, afin de pouvoir vérifier notre hypothèse.

***

II/ Les progéniteurs des cellules endothéliales

II-1/ Validation du protocole d'isolement et de mise en culture des progéniteurs des cellules endothéliales

Dans le cadre de mon projet, j'ai adapté à partir de la littérature [Ingram *et al*., 2004, Mead *et al*., 2008 et Thebaud *et al*., 2010] un protocole d'isolement et de mise en culture des PCEs à partir du sang périphérique. Pour cela, j'ai testé plusieurs modes opératoires en faisant varier successivement différents critères tels que la source de prélèvement (sang périphérique de sujets obèses ou minces), le fait d'ajouter une étape d'immunosélection, la densité d'ensemencement, la supplémentation en facteur de croissance du milieu de culture (ajout ou non de VEGF).

Source du prélèvement : j'ai obtenu des PCEs à partir du sang périphérique de sujets obèses ou minces, mais les PCEs obtenus à partir du sang périphérique de sujets obèses semblaient sénescents. Ils avaient perdu leur pouvoir prolifératif, ce qui ne nous a pas permis d'en obtenir suffisamment pour ensuite réaliser nos expériences [Tobler *et al*., 2010 ; MacEneaney *et al*., 2010]. Nous avons décidé d'utiliser seulement du sang périphérique de sujets minces (et de préférence jeunes) fourni par l'EFS.

Etape d'immunosélection : j'ai ajouté une étape supplémentaire d'immunosélection CD34+ (marqueur membranaire des cellules souches hématopoïétiques) [Fadini *et al*., 2008] mais cela n'a pas donné de meilleurs résultats. En effet, après immunosélection le nombre de cellules CD34+ est très faible et ne semble pas suffisant pour induire une culture. Toutefois il serait nécessaire d'essayer une nouvelle fois de faire cette immunosélection.

Densité d'ensemencement : en me basant sur les données de la littérature, j'ai commencé par utiliser une densité d'ensemencement de $2.5.10^6$ cellules/puits de plaque B12 puis je suis passée à une densité d'ensemencement de 2.10^7 cellules/puits de plaque B12 [Thebaud *et al*., 2010]. Cette augmentation de la densité d'ensemencement nous a permis d'obtenir de meilleurs résultats. En effet, contrairement aux essais précédents nous avons obtenu des colonies de cellules endothéliales dans 75% des cas. La densité d'ensemencement initial semble donc être un point capital, elle s'explique par le fait que les cellules pour pousser nécessitent des contacts entre elles.

Milieu de culture : j'ai utilisé le milieu de culture de croissance des cellules endothéliales, ECGM, disponible au laboratoire. Cependant comme nous n'obtenions pas des résultats satisfaisants nous avons ajouté du VEGF à la concentration de 10 ng/mL car ce facteur de croissance est indispensable pour permettre la différenciation des clones de PCEs en cellules endothéliales [Miller-Kasprzak *et* Jagodzinski, 2007]. Malgré tout ce milieu ne semble pas suffisamment riche car même si nous obtenons des PCEs ils semblent entrer en apoptose au bout d'un certain temps de culture ; cette observation reste à confirmer par un test d'apoptose.

Par ailleurs, du fait des temps de culture très longs (trois à quatre semaines), des contaminations sont apparues dans les boîtes de culture malgré la présence d'antibiotiques et d'antifongiques.

Tableau XI : Conditions de culture des progéniteurs des cellules endothéliales.

Source de prélèvement	Prélèvements sanguins de sujets minces (et de préférence jeunes)
Ensemencement	2.10^7 cellules/puits de plaque B12
Milieu de culture	Milieu de croissance des cellules endothéliales ECGM enrichi avec 10% de SVF et 10 ng/mL de VEGF

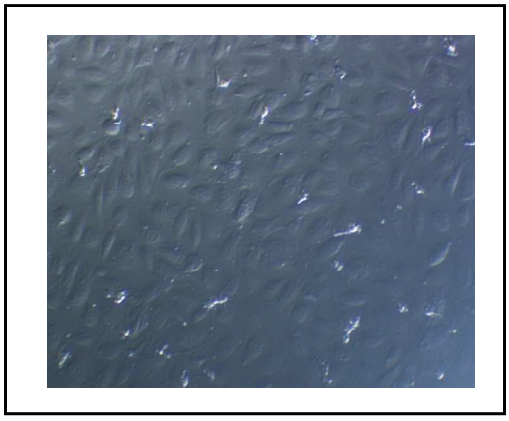


Figure 38 : Photographie en microscopie à contraste de phase des progéniteurs des cellules endothéliales après 25 jours de culture (grossissement 20).

II-2/ Caractérisation phénotypique des progéniteurs des cellules endothéliales

Les clones des progéniteurs des cellules endothéliales se différencient en culture en cellules endothéliales. Nous avons donc effectué des expériences d'immunofluorescence afin de caractériser phénotypiquement les cellules obtenues. Nous avons réalisé des marquages caractéristiques de la lignée endothéliale [Fadini *et al*., 2008].

Nous avons réalisé un double marquage endothélial : un marquage membranaire grâce au CD31 (rouge) et un marquage du réseau extracellulaire grâce au facteur de VonWillebrand (vert). Nous avons également marqué le cytosquelette d'actine (rouge) afin de visualiser la forme des cellules, le noyau étant marqué au DAPI (bleu).

Les lames obtenues ont ensuite été observées en microscopie confocale par Christophe KLEIN, l'ingénieur responsable du Service de Microscopie du Centre de Recherche des Cordeliers.

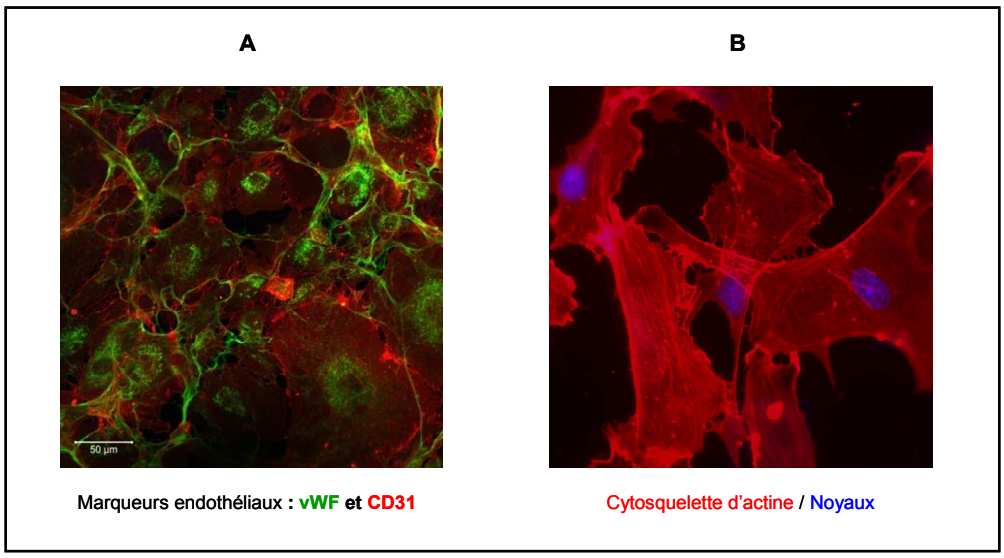


Figure 39 : Photographies en microscopie confocale des progéniteurs des cellules endothéliales.
Des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées sur les progéniteurs des cellules endothéliales.

(A) Double marquage endothélial : CD31 (rouge) et facteur de Von Willebrand (vert).

(B) Marquage du cytosquelette d'actine (rouge) et coloration des noyaux au DAPI (bleu).

Les cellules obtenues en culture sont bien positives pour le double marquage endothélial. Le marquage du CD31, qui est le marqueur membranaire de référence des cellules endothéliales, est visualisable en rouge, tandis que le marquage du facteur de Von

Willebrand, qui se présente sous la forme d'un réseau extracellulaire, est visualisable en vert (photographie A).

De plus, le marquage du cytosquelette d'actine (photographie B), visualisable en rouge, permet de bien se rendre compte de la forme pavimenteuse caractéristique des progéniteurs des cellules endothéliales.

II-3/ Etude de l'effet du facteur de croissance des colonies de granulocytes sur la prolifération des progéniteurs des cellules endothéliales

Notre hypothèse de travail propose que le G-CSF puisse agir sur la mobilisation des progéniteurs des cellules endothéliales. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons testé le pouvoir proliférateur de la forme recombinante humaine de G-CSF (rhG-CSF) sur les PCEs. Pour cela nous avons réalisé un test de prolifération cellulaire : le test MTT.

En pratique, nous avons cultivé les PCEs pendant deux à trois jours et avons testé cinq conditions, chaque condition ayant été testé en quadruplicat :

- milieu de culture de base des cellules endothéliales (contrôle) ;
- milieu de culture de croissance des PCEs additionné de 10% de SVF (contrôle « positif ») ;
- milieu de sécrétion de TAV de patient obèse massif ;
- milieu de sécrétion de TAV de patient obèse massif additionné de l'anticorps neutralisant de G-CSF ;
- milieu de culture de base pour les cellules endothéliales additionné de la protéine recombinante humaine de G-CSF.

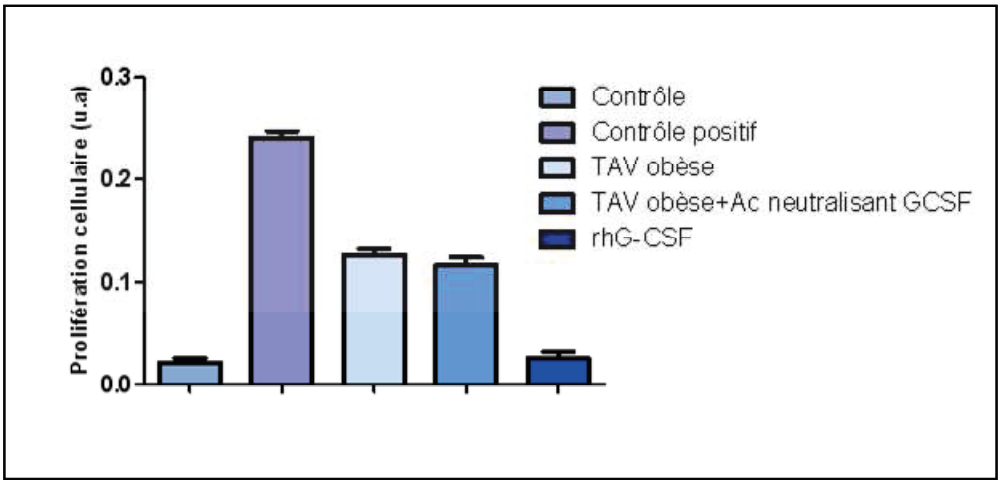


Figure 40 : Test de prolifération cellulaire sur les progéniteurs des cellules endothéliales.

Les progéniteurs des cellules endothéliales ont été cultivés dans différentes conditions :

- « contrôle » : milieu de culture de base des cellules endothéliales ;
- « contrôle positif » : milieu de culture de croissance des cellules endothéliales enrichi en sérum de veau fœtal ;
- « milieu de sécrétion de tissu adipeux viscéral (TAV) de patient obèse» ;
- « milieu de sécrétion de tissu adipeux viscéral de patient obèse + anticorps neutralisant du facteur de croissance des colonies de granulocytes (G-CSF) » ;
- « milieu de culture de base des cellules endothéliales + forme recombinante humaine du facteur de croissance des colonies de granulocytes (rhG-CSF).

La prolifération des progéniteurs des cellules endothéliales a été évaluée grâce au test MTT.

Le milieu de culture de base des cellules endothéliales (« contrôle ») n'induit pas de prolifération cellulaire, tandis que le milieu de culture de croissance des cellules endothéliales enrichi en sérum de veau fœtal (« contrôle positif ») induit une prolifération cellulaire. Ces résultats nous permettent de valider l'expérience et d'en interpréter les résultats.

Les premiers résultats montrent que le milieu de sécrétion du tissu adipeux viscéral de patient obèse massif induit une prolifération cellulaire des progéniteurs des cellules endothéliales. L'ajout au milieu de sécrétion de l'anticorps neutralisant de G-CSF ne modifie pas l'effet prolifératif, ce qui laisse penser que le G-CSF n'aurait pas d'effet direct sur la prolifération des progéniteurs des cellules endothéliales. Cela semble confirmé par le fait que l'ajout de rhG-CSF seul n'augmente pas la prolifération cellulaire. G-CSF ne semble donc pas avoir d'effet (direct tout au moins) sur la prolifération des progéniteurs des cellules endothéliales.

II-4/ Etude de l'effet mobilisateur du facteur de croissance des colonies de granulocytes sur la migration des progéniteurs des cellules endothéliales

Afin de valider ou d'infirmer notre hypothèse nous avons également réalisé des expériences de migration des progéniteurs des cellules endothéliales. Nous avons cultivé les PCEs en système « transwell » afin de pouvoir analyser l'effet d'une substance donnée sur leur éventuelle migration à travers le filtre de ce système.

En pratique, faute d'une quantité suffisante de PCEs, nous n'avons pu que tester deux conditions :

- milieu de culture de base des cellules endothéliales (contrôle) ;
- milieu de sécrétion de tissu adipeux viscéral de patient obèse massif.

Les cellules ont été cultivées dans ces conditions pendant 6H00.

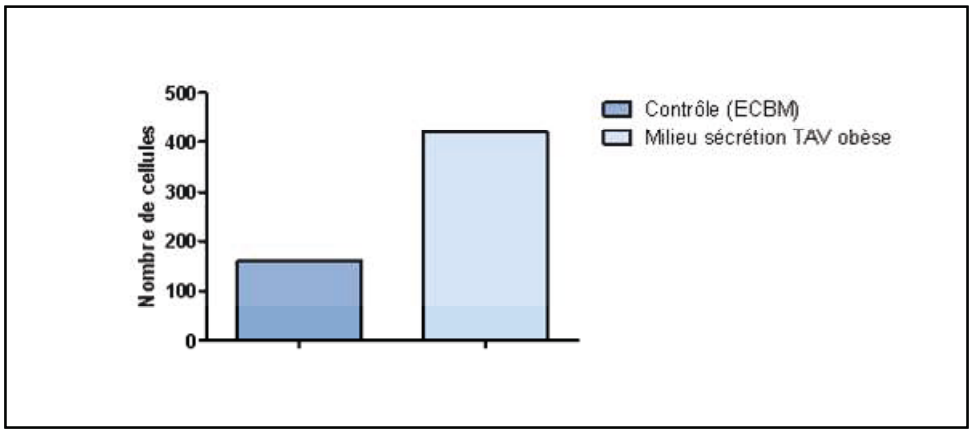


Figure 41 : Migration des progéniteurs des cellules endothéliales.

Les progéniteurs des cellules endothéliales sont cultivés en système « transwell ». Le pouvoir attracteur du milieu de sécrétion de tissu adipeux viscéral de patient obèse (TAV) par rapport à « un milieu contrôle », composé du milieu de culture de base des cellules endothéliales (ECBM), est évalué grâce à ce système de culture.

Les résultats préliminaires montrent que le milieu de sécrétion du tissu adipeux viscéral de patient obèse massif est 2,6 fois plus attractant pour les progéniteurs des cellules endothéliales que le milieu basal.

Discussion

A ce jour, le rôle du facteur de croissance des colonies de granulocytes dans la biologie du tissu adipeux n'est pas bien défini. Pour preuve, une recherche effectuée sur PubMed avec les mots clefs « G-CSF » et « adipose tissue » ne donne que 57 résultats alors que pour une recherche avec le seul mot clé « G-CSF » une liste de 33351 publications est obtenue (recherche effectuée le 20/05/2012). La grande majorité de ces travaux concerne son rôle de facteur de croissance des colonies de granulocytes ou son activité de mobilisateur des cellules souches hématopoïétiques. Quelques articles l'évoquent comme cytokine impliquée dans l'inflammation systémique de bas grade caractéristique du tissu adipeux au cours de l'obésité [Skurk *et al*., 2007 ; O'Connel *et al*., 2011]. Notre équipe, dans des travaux récents en cours de publications, a également montré sa possible implication dans l'inflammation de deux types cellulaires du tissu adipeux (les adipocytes et les pré-adipocytes). C'est pourquoi il nous a semblé intéressant d'essayer de préciser son rôle au sein du tissu adipeux hypertrophique.

Nous avons montré que G-CSF est plus exprimé par les adipocytes, isolés du tissu adipeux sous-cutané, de personnes ayant un IMC supérieur ou égal à 25. En accord avec des études antérieures [Bruun *et al.*, 2004] nous retrouvons une expression augmentée de la cytokine IL-8 chez l'obèse. Dans des travaux publiés en 2007, Skurk et ses collaborateurs ont étudié l'effet de la taille des adipocytes sur l'expression et la sécrétion de différentes adipokines. Ils ont isolé les adipocytes à partir de biopsies de tissu adipeux sous-cutané de personnes ayant subi une chirurgie plastique et les ont séparés, par décantation, en quatre fractions en fonction de leur densité. Ils ont démontré que G-CSF est plus sécrété par les adipocytes de très grande taille [Skurk *et al*., 2007]. Le tissu adipeux renferme des adipocytes de taille variable et ce quelque soit le statut pondéral de la personne. Il aurait été intéressant d'étudier l'expression de G-CSF en ayant préalablement réalisé un tri adipocytaire afin de voir si elle était, comme la sécrétion, un marqueur des adipocytes hypertrophiques.

Nous avons montré que le G-CSF est majoritairement exprimé par les adipocytes et les macrophages, et que son récepteur est lui majoritairement exprimé à la surface des macrophages. Ces résultats suggèrent un mode de régulation autocrine et paracrine pour le G-CSF. Cette cytokine étant connue pour avoir une action pro-inflammatoire [Skurk *et al*., 2007

; O'Connel *et al*., 2011] il est assez logique qu'elle soit majoritairement exprimée par les macrophages, ces cellules sont celles qui sécrètent la majorité des cytokines inflammatoires au sein du tissu adipeux hypertrophique [Surmi *et* Hasty, 2010]. D'ailleurs les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 [Lafontan, 2008], qui nous ont servi de référence, sont elles aussi majoritairement exprimées par les macrophages isolés du tissu adipeux hypertrophique. Ces résultats confirment ceux de la littérature qui stipulaient, en autre, une présence du récepteur de G-CSF à la surface des macrophages [Liongue *et al*., 2009]. Cette revue mentionnait également la présence du récepteur du G-CSF au niveau des cellules endothéliales. Nous n'avons pas retrouvé ce résultat. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les cellules endothéliales du tissu adipeux viscéral chez l'obèse seraient sénescentes [Villaret A *et al*., 2010] et pourraient, de ce fait, ne pas exprimer les mêmes récepteurs membranaires ou en quantité moindre.

Nous avons montré que les monocytes différenciés *in vitro* en macrophages et rendus inflammatoires (par traitement au LPS) sécrètent plus de G-CSF que les mêmes macrophages « contrôle ». Ces résultats confirment que le G-CSF est produit par les macrophages et que sa sécrétion est associée au phénotype pro-inflammatoire des macrophages. Le traitement avec la pravastatine des macrophages inflammatoires n'a pas d'effet sur la sécrétion de G-CSF. Dans ces conditions expérimentales, il n'y a donc pas *in vitro* d'activité anti-inflammatoire de cette molécule sur les macrophages à court terme. Néanmoins, des travaux très récents de l'équipe montrent un effet anti-inflammatoire de la pravastatine sur les macrophages inflammatoires après trois jours de traitement.

Nous avons montré que la sécrétion de G-CSF est plus importante dans le TAV que dans le TASC de patientes obèses massives. De plus, nous avons confirmé que les cytokines IL-6 et IL-8 sont également plus sécrétées par le TAV. En effet, le tissu adipeux viscéral est connu pour sécréter plus de molécules à caractère inflammatoire que le tissu adipeux sous-cutané [Ibrahim, 2010]. Le fait de ne pas retrouver un effet « territoire » marqué pour le G-CSF peut s'expliquer par le fait, qu'au niveau individuel, seules deux patientes montrent une sécrétion très augmentée de G-CSF dans le TAV. Les valeurs de sécrétion de ces trois médiateurs de l'inflammation sont moins dispersées dans le TASC. Cela peut sans doute s'expliquer par le fait que le TASC est plus homogène d'un point de vue cellulaire que le TAV, qu'il est moins vascularisé et moins infiltré par les cellules immunitaires [Lafontan, 2008 ; Ibrahim, 2010]. Ceci semble confirmé par le fait que nous ayons seulement retrouvé

des corrélations entre les sécrétions de ces médiateurs de l'inflammation dans le tissu adipeux sous-cutané. En effet, nous avons trouvé une forte corrélation positive entre les sécrétions de G-CSF et d'IL-8 au sein du tissu adipeux sous-cutané. Ce lien pourrait, en partie, s'expliquer par le fait qu'IL-8 est connu pour avoir un effet chimioattractant sur les neutrophiles et que G-CSF agit justement sur ces neutrophiles du fait de son rôle de facteur de croissance de la lignée granulocytaire [Bruun, 2004 ; Surmi *et* Hasty, 2010].

Nous avons, par ailleurs, confirmé les résultats d'études antérieures qui montraient que la leptine était plus sécrétée par le TAV que par le TASC alors que, contrairement aux données de la littérature, nous n'observons pas de différence de sécrétion de l'adiponectine entre le TASC et le TAV [Ibrahim, 2010]. Ceci pourrait s'expliquer, à la fois, par la forte variabilité individuelle de sécrétion de l'adiponectine et, à la fois, par le fait que des études très récentes aient montré que c'était la forme globulaire de l'adiponectine qui serait impliquée dans les processus d'inflammation [Kamio *et al*., 2008]. Or nous avons dosé par ELISA la forme totale de l'adiponectine. Nous avons trouvé une corrélation négative entre les sécrétions de G-CSF et de l'adiponectine, ce lien pouvant assez facilement s'expliquer par les propriétés anti-inflammatoires de l'adiponectine [Balistreri *et al*., 2010].

Aujourd'hui, de nombreux travaux montrent qu'adipogenèse et angiogenèse sont des processus liés au sein du tissu adipeux tant d'un point de vue physiologique, que physiopathologique (obésité) [Cao, 2010 ; Sun *et al*., 2011]. C'est dans ce contexte que nous avons choisi de nous intéresser aux progéniteurs des cellules endothéliales et à leur rôle potentiel dans la néovascularisation réparatrice. En effet, des travaux récents ont montré une probable sénescence des cellules endothéliales du TAV d'obèse [Villaret *et al*., 2010]. Cette sénescence prématuée nécessiterait une réparation vasculaire qui, selon notre hypothèse, pourrait impliquer la mobilisation des PCEs qui pourrait elle-même être médiée par le G-CSF. Depuis leur découverte par Ashara [Ashara *et al*., 1997], les PCEs ont suscité beaucoup d'espoir et notamment dans le traitement des épisodes ischémiques. Cependant, les données de la littérature sont controversées. Ceci s'explique, en grande partie, par la fait que le terme PCEs englobe une grande variabilité de cellules, ces dernières n'ayant pas forcément les mêmes fonctions physiologiques. Dans notre étude, nous avons choisi de nous intéresser aux PCEs dits tardifs qui montrent *in vivo* un plus fort potentiel angiogénique [Hur *et al.,* 2004].. En accord avec les données de la littérature, qui faisaient état d'une sénescence de ces cellules chez l'obèse [Tobler *et al.,* 2010 ; MacEneaney *et al.*, 2010], nous avons obtenu un plus grand

nombre de PCEs à partir du sang périphérique de sujets minces que de sujets obèses. Les PCEs sont présents en très faible quantité dans le sang périphérique [Smadja *et al.,* 2007]. Nous avons obtenu de meilleurs rendements en augmentant la densité initiale d'ensemencement lors de la mise en culture. Le VEGF est le facteur de croissance primordial pour l'obtention des colonies de cellules endothéliales [Miller-Kasprzak *et* Jagodzinski, 2007]. Nous avons obtenu un plus grand nombre de PCEs en ajoutant du VEGF au milieu de culture. Toutefois malgré ces ajustements des conditions de culture, le nombre de colonies de cellules obtenu a rarement été suffisant pour nous permettre de réaliser les expériences nécessaires à l'étude complète du rôle potentiel du G-CSF sur la mobilisation de ces PCEs.

Les premières expériences de prolifération cellulaire réalisées sur les PCEs ont montré que le milieu de sécrétion du TAV de patient obèse massif induit une prolifération cellulaire. En revanche, l'addition au milieu de sécrétion de l'anticorps neutralisant de G-CSF ne modifie pas cet effet prolifératif, ce qui laisse penser que le G-CSF n'aurait pas d'effet direct sur la prolifération de ces cellules. Ceci semble être confirmé par le fait que l'addition de rhG-CSF n'augmente pas la prolifération cellulaire. Ces résultats sont confirmés par des données récentes de la littérature qui montrent que l'administration de G-CSF diminue à la fois les propriétés angiogéniques des PCEs dits tardifs et les propriétés pro-angiogéniques des PCEs dits précoces [Tura *et al*., 2010]. Les auteurs de l'article suggèrent que tout effet bénéfique de ces cellules s'expliquerait par un effet paracrine. De plus, les expériences préliminaires de migration des PCEs ont montré que le milieu de sécrétion du TAV de patient obèse massif est plus attractant que le milieu contrôle. Le tissu adipeux de patient obèse massif sécrète donc bien des facteurs attractants pour les PCEs. Des expériences complémentaires sont nécessaires afin d'identifier ces facteurs.

Conclusion et perspectives

Le premier objectif du travail de recherche qui m'a été confié consistait à préciser la régulation du facteur de croissance des granulocytes au sein du tissu adipeux humain. Nous avons montré que son expression était augmentée chez les personnes en surpoids ou obèses (IMC $\geq$ 25), confirmant ainsi que G-CSF était augmenté au cours de l'obésité. Grâce à des expériences de PCR en temps réel, nous avons montré que le G-CSF était plus exprimé par les adipocytes et les macrophages isolés du tissu adipeux de patients obèses massifs. Il serait intéressant à ce niveau de réaliser des expériences de tri adipocytaire afin de savoir si l'expression de G-CSF peut être corrélée à la taille adipocytaire. Une collaboration, avec M.Hoyos de l'ESPCI, visant à séparer les adipocytes en fonction de leur taille (normal et hypertrophique) est d'ailleurs en train de se mettre en place. Le récepteur de G-CSF est lui plus exprimé par les macrophages. Ces résultats suggèrent un mode de régulation autocrine et paracrine de G-CSF au sein du tissu adipeux. Des études de sécrétion au niveau cellulaire (monocytes différenciés *in vitro* en macrophages) ont confirmé que les macrophages produisaient bien du G-CSF, et que cette sécrétion était fortement augmentée en condition inflammatoire. Ces résultats pris dans leur ensemble montrent bien que G-CSF est l'un des médiateurs de l'inflammation au sein du tissu adipeux hypertrophique. Enfin grâce à des dosages ELISA, nous avons montré que le G-CSF était plus sécrété par le tissu adipeux viscéral que par le tissu adipeux sous cutané de patientes souffrant d'obésité massive. Or nous savons, qu'au cours de l'obésité, le tissu adipeux viscéral est plus inflammatoire que le tissu sous-cutané (plus fortes sécrétions des médiateurs de l'inflammation, plus forte accumulation des cellules immunitaires), ces données renforcent donc le rôle/l'implication de G-CSF au cours de l'inflammation du tissu adipeux, notamment au sein du tissu adipeux viscéral.

Le second objectif du travail de recherche qui m'a été confié consistait à développer dans l'équipe un nouveau modèle cellulaire (les progéniteurs des cellules endothéliales) afin de préciser le rôle de G-CSF au sein du tissu adipeux humain au cours de l'obésité. Notre hypothèse de travail propose que les progéniteurs des cellules endothéliales pourraient jouer un rôle dans la réparation vasculaire et que celui-ci serait médié par le G-CSF. Nous avons choisi de nous intéresser aux PCEs tardifs car ils ont été décrits comme présentant *in vivo* un plus fort potentiel prolifératif. J'ai commencé par adapter, à partir des données de la littérature, un protocole d'isolement et de mise en culture de ces cellules. Ce protocole sera

utilisé ultérieurement au laboratoire dans le cadre du projet doctoral de Vanessa Pellegrini. Après avoir défini des conditions « optimales » de culture, nous avons pu caractériser par un double marquage endothélial (marqueur membranaire CD31 et facteur de VonWillebrand) les PCEs tardifs. Outre cette caractérisation phénotypique, il apparaît important de poursuivre par une caractérisation fonctionnelle de ces cellules, par exemple en testant leur capacité à incorporer les LDL oxydés et à former *de novo* un réseau vasculaire sur Matrigel®. Les premières expériences de prolifération et de migration réalisées sur ces cellules montrent à la fois un effet prolifératif et attractant du milieu de sécrétion du tissu adipeux viscéral de patient obèse massif sur les PCEs. Le G-CSF n'a pas montré d'effet direct *in vitro* sur la prolifération des PCEs.

Nous n'avons pas pu poursuivre ces travaux car nous avons eu de grandes difficultés à obtenir des PCEs en quantité suffisante. En effet, nous avons eu des problèmes récurrents de contamination des cultures, ces derniers pourraient potentiellement être réduits par l'utilisation d'un incubateur spécifique dédié à ces cultures à long terme. De plus, même si nous réussissons à les cultiver les PCEs semblent entrer en apoptose. Cette impression visuelle serait à confirmer par des tests *ad hoc*. Dans le futur, il serait souhaitable d'utiliser un milieu de culture « plus riche ». En effet, la majorité des publications dans le domaine utilise un milieu de culture de croissance des cellules endothéliales enrichi en différents facteurs et notamment en VEGF qui est comme nous l'avons vu indispensable à l'obtention de colonies de cellules endothéliales par différenciation d'un clone de PCEs. De plus, les PCEs étant présents en très faible quantité dans le sang périphérique il serait intéressant de travailler non pas sur quelques tubes de sang mais sur des poches de sang ; idéalement en sélectionnant des sujets jeunes, minces et sportifs.

Une fois que les conditions de culture auront été améliorées le nombre de PCEs devrait être suffisant pour réaliser de nouvelles expériences de prolifération et de migration. Pour les expériences de prolifération, il faut confirmer nos premiers résultats et il serait intéressant de rajouter deux conditions : ajout de VEGF au milieu de culture et ajout de l'anticorps neutralisant de VEGF au milieu de culture. Pour les expériences préliminaires de migration, il faudrait en plus tester les conditions suivantes : ajout de rhG-CSF et ajout de l'anticorps neutralisant de G-CSF. En effet, les premiers résultats ont montré un effet prolifératif et attractant du milieu de sécrétion du tissu adipeux viscéral de patient obèse massif sur les PCEs, mais pas d'effet prolifératif direct *in vitro* de G-CSF. Des travaux de

Ohki et ses collaborateurs, réalisé sur modèle murin, suggèrent que le G-CSF augmenterait indirectement la néovascularisation. Ils proposent que le G-CSF pourrait augmenter le nombre circulant de neutrophiles et leur sécrétion de VEGF. Le VEGF pourrait alors induire la mobilisation des progéniteurs des cellules hématopoïétiques (*via* leur récepteur VEGFR1) et des progéniteurs des cellules endothéliales (*via* leur récepteur VEGFR2) vers les sites d'ischémie. Ces dernières cellules ne sont pas capables d'incorporer les structures vasculaires mais peuvent sécréter des facteurs angiogéniques [Ohki *et al.*, 2005].

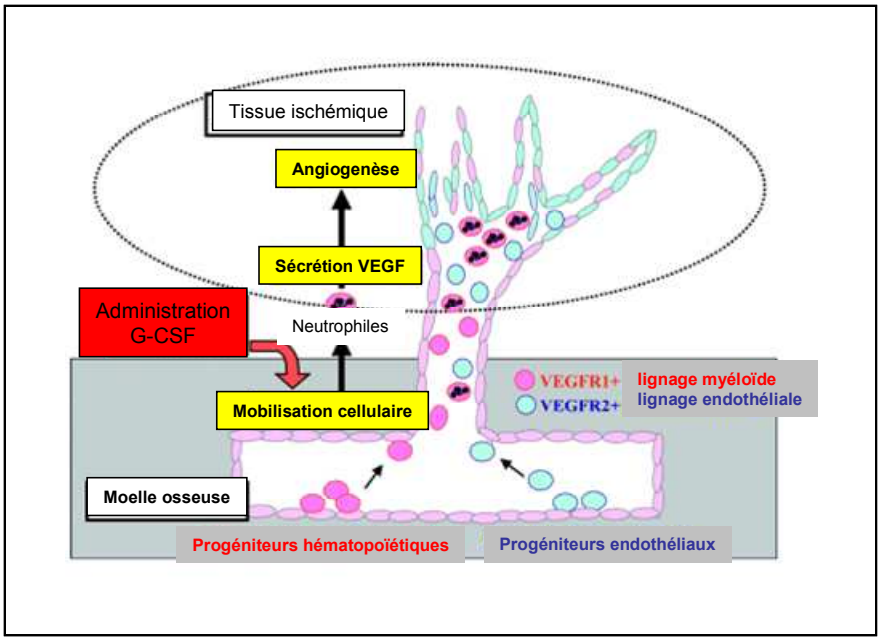


Figure 42 : Mécanisme d'action du facteur de croissance des colonies de granulocytes dans la mobilisation des progéniteurs des cellules endothéliales [Ohki *et al.*, 2005].

Le facteur de croissance des colonies de granulocytes (G-CSF) induit la mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques et endothéliaux. Il favorise la prolifération des neutrophiles qui vont sécréter du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Le VEGF va contribuer à la néoangiogenèse au sein du tissu ischémique en favorisant l'incorporation des progéniteurs des cellules endothéliales au sein des capillaires.

Si la majorité des travaux s'accordent sur un rôle des PCEs dans la néovascularisation, l'action respective et/ou complémentaire des PCEs précoces et tardifs reste à préciser. Les PCEs précoces seraient issus de la lignée monocytaire et sécréteraient des facteurs proangiogéniques, tandis que les PCEs tardifs auraient la capacité de s'intégrer au niveau vasculaire. Les PCEs agissant vraisemblablement de façon synergique, il pourrait être intéressant de cultiver les deux sous types cellulaires. Afin de répondre à notre hypothèse de travail, à savoir que le G-CSF mobiliserait les PCEs, il serait intéressant de mesurer l'expression du récepteur de G-CSF sur ces deux sous types cellulaires. En admettant que les

PCEs précoces soient dérivés de la lignée monocytaire il est vraisemblable que, comme les monocytes et les macrophages, ils possèdent à leur surface des récepteurs du G-CSF. Si ceci était confirmé il serait alors peut être plus intéressant de les cultiver eux, enfin tout au moins pour préciser l'action du G-CSF.

De plus, des travaux récents de l'équipe ont montré, en immunohistochimie, la présence de neutrophiles activés dans les vaisseaux sanguins du tissu adipeux viscéral de patients obèses. Or l'on sait que le G-CSF induit la survie des neutrophiles et que ces mêmes neutrophiles sont « des bombes à retardement » puisqu'ils relarguent, en autre, des espèces réactives de l'oxygène exerçant des effets délétères sur les cellules avoisinantes. Il serait donc intéressant de confirmer le rôle anti-apoptotique de G-CSF sur les neutrophiles et de valider la sécrétion de VEGF par ces cellules. Ensuite des stratégies visant à limiter cet effet pourraient être mise en place.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, le G-CSF peut donc être considéré comme une nouvelle adipokine et pourrait participer, par la mobilisation des PCEs, à la réparation vasculaire du tissu adipeux blanc humain au cours de l'obésité. Toutefois des expériences complémentaires sont nécessaires pour mieux appréhender son rôle potentiel dans la mobilisation des progéniteurs des cellules endothéliales.

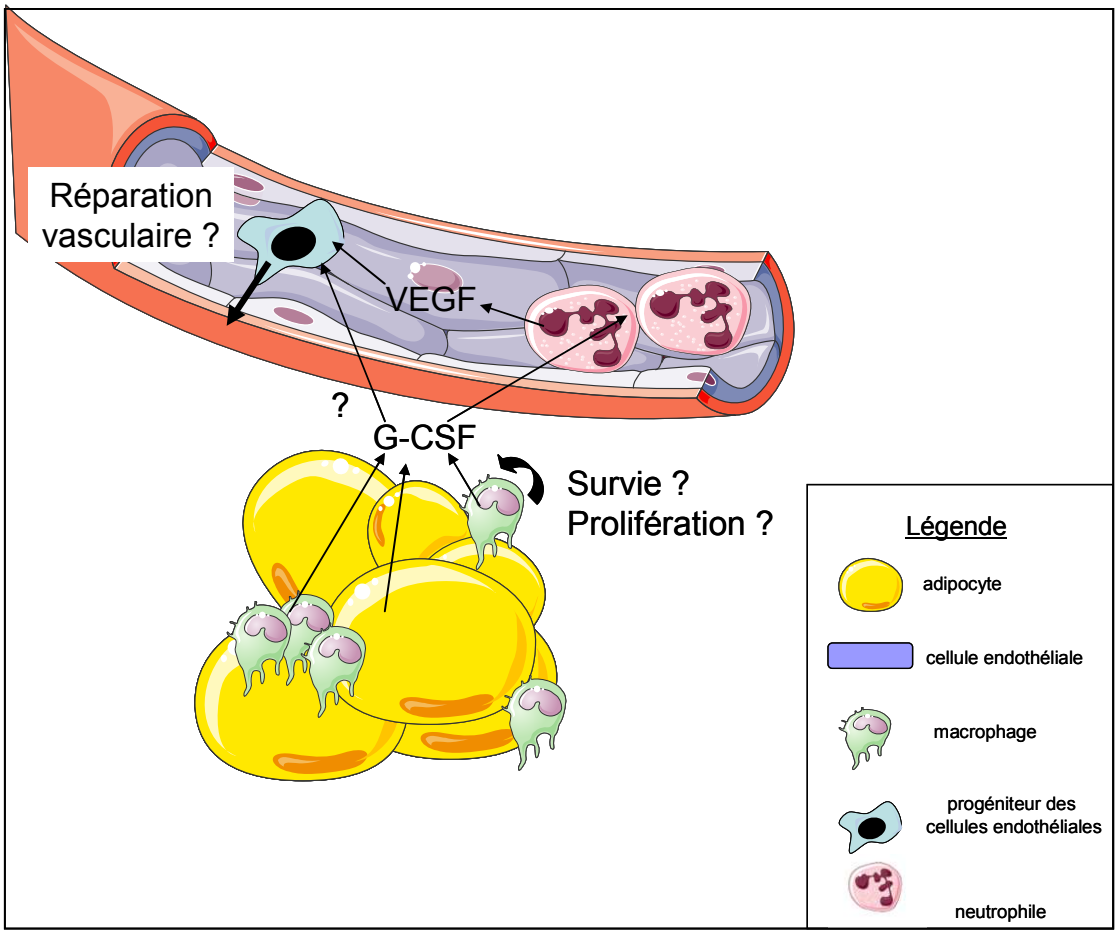


Figure 43 : Schéma intégratif général.

Le facteur de croissance des colonies de granulocytes (G-CSF) est majoritairement sécrété par les adipocytes et les macrophages. Les macrophages présentent à leur surface le récepteur du G-CSF suggérant un mode d'action autocrine et paracrine. Au cours de l'obésité, l'endothélium vasculaire est dysfonctionnel ce qui nécessite une réparation vasculaire. Les progéniteurs des cellules endothéliales (PCEs) pourraient y participer et être mobilisées par le G-CSF. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), produit par les neutrophiles en réponse au G-CSF, pourrait agir de façon indirecte sur la mobilisation des PCEs.

Evaluation du coût du stage

Produit	Fournisseur	Prix unitaire (en euros)	Coût expériences (en euros)
Culture cellulaire			
Milieu ECBM	PromoCell	88 / 500 mL	176
Milieu ECGM	PromoCell	99 / 500 mL	495
Milieu RPMI	PromoCell	10 / 500 mL	20
Milieu DMEM	PromoCell	10 / 500 mL	10
Sérum de veau foetal	Invitrogen	30 / 3*100 mL	30
Ficoll	Life Technologies GE Healtcare	177 / 6*100 mL	177
Collagène de type I	BD Biosciences	164 / 25 mL	164
Poly-L-lysine	Sigma	86,40 / 50 mL	86,40
Kit immunosélection	Stem cell technologies	602 / kit	602
Albumine sérique bovine	PAA laboratories	106,50 / 100g	106,50
VEGF	Invitrogen		
PBS +/+	Invitrogen	166 / 12*1L	166
PBS -/-	Invitrogen	166 / 12*1L	166
Eau stérile	Dutscher	54,10 / 1L	54,10
Solution de Pénicilline-Streptomycine	PromoCell	13 / 100 mL	13
Fungizone	PromoCell	29 / 100 mL	29
Mélange trypsine/EDTA	Invitrogen	14 / 100 mL	14
Tubes sang EFS	EFS	0,70 / tube	21
Falcon 15 mL	Dutscher	188,70 / carton	188,70
Falcon 50 mL	Dutscher	223,40 / carton	223,40
Plaque B6	Dutscher	121,10 / 50	121, 50
Plaque B12	Dutscher	149,90 / 50	149,60
Plaque B24	Dutscher	126,70 / 50	126,70
Plaque B48	Dutscher	251 / 50	251
Plaque B96	Dutscher	127,10 / 50	127,10
Pipette 1mL	Dutscher	128,90 / 1000	128,90
Pipette 2mL	Dutscher	178,20 / 1000	178,20
Pipette 5mL	Dutscher	49,60 / 200	49,60
Pipette 10mL	Dutscher	49,60 / 200	49,60
Pipette 25mL	Dutscher	114 / 200	114
PCR en temps réel			
Kit extraction	Qiagen	1102 / 250 éch	1102
DNase RNase free	Qiagen	74,40 / 50 éch	148,80
Enzyme MMLV	Promega	235	235
Random primers	Promega	34	34
Rnasin	Promega	260	260

dNPTs	Promega	101	101
Mix SyberGreen	Eurogentec	424 / 750 éch	424
Mix Sonde	Eurogentec	281 / 750 éch	281
Service Oligo	Eurogentec	1300	5200
Plaque 96	Applied	53 / 10 plaques	106
Films adhésifs	Applied	215 / 100	215
Pointes 0,5-1 µL	Dutscher	35 / 1000 cônes	35
Pointes 20µL	Dutscher	35 / 1000 cônes	35
Pointes 200 µL	Dutscher	33 / 1000 cônes	33
Pointes 1000 µL	Dutscher	33 / 1000 cônes	33
ELISA			
Plaque	Dutscher	112,70 / 50 plaques	112,70
Human G-CSF DuoSet	R&D	695 / 15 plaques	695
Human Adiponectine DuoSet	R&D	695 / 15 plaques	695
Human Leptine DuoSet	R&D	695 / 15 plaques	695
Human IL-6 DuoSet	R&D	695 / 15 plaques	695
Human IL-8	PeproTech	100 / 200 plaques	200
Reagent diluent 10X	R&D	215 / 5*20 mL	215
Substrate Reagent Pack	R&D	250 / 10*20 mL	250
Sérum de chèvre	R&D	80 / 20 mL	80
µtubes 0,5 mL	Dutscher	39,10	39,10
µtubes 1,5 mL	Dutscher	34,10	34,10
µtubes 2 mL	Dutscher	53,90	53,90
Immunofluorescence			
Lames SuperFrost	Dutscher	87 / 2000	87
Lamelles	Dutscher	48 / 1000	48
PAF	Sigma	37	37
Anticorps primaire dirigé contre CD31	Invitrogen	247 / 500µL	247
Anticorps primaire dirigé contre vWF	Invitrogen	250/ 500µL	250
Anticorps primaire dirigé contre actine	Invitrogen	267 / 500µL	267
Anticorps secondaire Alexa Fluor 488	Invitrogen	203 / 500µL	203
Anticorps secondaire Alexa Fluor 546	Invitrogen	203 / 500µL	203
DAPI	Abbot	86,70 / kit	86.70
Milieu de montage Fluoprep	Fluoromount Southern Biotech	115 / 10mL	115
Service commun microscopie	CRC	30 / heure	60

Etude de la prolifération			
Test de prolifération	Promega	229 / 1000 essais	229
rhG-CSF	Peprotech	170 / 10 µg	170
Anticorps neutralisant G-CSF	Peprotech	210 / 100 µg	210
Etude du recrutement			
Système de culture en transwell	Dutscher	156,90 / 24 plaques	156,90
Effet de la pravastatine			
Pravastatine	Sigma	58 / 25 mg	58
LPS	Sigma	34 / 1 mg	34

TOTAL : 17 812,50 euros

Bibliographie

Articles scientifiques :

Anderlini, P., and Champlin, R.E. (2008). Biologic and molecular effects of granulocyte colony-stimulating factor in healthy individuals: recent findings and current challenges. Blood *111*, 1767–1772.

Asahara, T., and Kawamoto, A. (2004). Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. Am. J. Physiol., Cell Physiol. *287*, C572–579.

Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J.M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science *275*, 964–967.

Avalos, B.R. (1996). Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. Blood *88*, 761–777.

Balistreri, C.R., Caruso, C., and Candore, G. (2010). The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. Mediators Inflamm. *2010*, 802078.

Basdevant, A. (2006). [Obesity epidemic: origins and consequences]. C. R. Biol. *329*, 562–569; discussion 653–655.

Bruun, J.M., Lihn, A.S., Madan, A.K., Pedersen, S.B., Schiøtt, K.M., Fain, J.N., and Richelsen, B. (2004). Higher production of IL-8 in visceral vs. subcutaneous adipose tissue. Implication of nonadipose cells in adipose tissue. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *286*, E8–13.

Bu, D., Griffin, G., and Lichtman, A.H. (2011). Mechanisms for the anti-inflammatory effects of statins. Curr. Opin. Lipidol. *22*, 165–170.

Cancello, R., Henegar, C., Viguerie, N., Taleb, S., Poitou, C., Rouault, C., Coupaye, M., Pelloux, V., Hugol, D., Bouillot, J.-L., et al. (2005). Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. Diabetes *54*, 2277–2286.

Cancello, R., Tordjman, J., Poitou, C., Guilhem, G., Bouillot, J.L., Hugol, D., Coussieu, C., Basdevant, A., Bar Hen, A., Bedossa, P., et al. (2006). Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. Diabetes *55*, 1554–1561.

Cao, Y. (2010). Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. Nat Rev Drug Discov *9*, 107–115.

Chun, T.-H., Hotary, K.B., Sabeh, F., Saltiel, A.R., Allen, E.D., and Weiss, S.J. (2006). A pericellular collagenase directs the 3-dimensional development of white adipose tissue. Cell *125*, 577–591.

Clément, K., Viguerie, N., Poitou, C., Carette, C., Pelloux, V., Curat, C.A., Sicard, A., Rome, S., Benis, A., Zucker, J.-D., et al. (2004). Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. Faseb J. *18*, 1657–1669.

Curat, C.A., Miranville, A., Sengenès, C., Diehl, M., Tonus, C., Busse, R., and Bouloumié, A. (2004). From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. Diabetes *53*, 1285–1292.

Demetri, G.D., and Griffin, J.D. (1991). Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. Blood *78*, 2791–2808.

Fadini, G.P., Baesso, I., Albiero, M., Sartore, S., Agostini, C., and Avogaro, A. (2008). Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau. Atherosclerosis *197*, 496–503.

Fain, J.N. (2010). Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review. Mediators Inflamm. *2010*, 513948.

Frisch, R.E. (1978). Population, food intake, and fertility. There is historical evidence for a direct effect of nutrition on reproductive ability. Science *199*, 22–30.

Fukumura, D., Ushiyama, A., Duda, D.G., Xu, L., Tam, J., Krishna, V., Chatterjee, K., Garkavtsev, I., and Jain, R.K. (2003). Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis. Circ. Res. *93*, e88–97.

Gabrielsson, B.G., Olofsson, L.E., Sjögren, A., Jernås, M., Elander, A., Lönn, M., Rudemo, M., and Carlsson, L.M.S. (2005). Evaluation of reference genes for studies of gene expression in human adipose tissue. Obes. Res. *13*, 649–652.

Garrow, J.S. (1998). Regulation of body weight is social skill. BMJ *316*, 1246.

Goossens, G.H., Bizzarri, A., Venteclef, N., Essers, Y., Cleutjens, J.P., Konings, E., Jocken, J.W.E., Cajlakovic, M., Ribitsch, V., Clément, K., et al. (2011). Increased adipose tissue oxygen tension in obese compared with lean men is accompanied by insulin resistance, impaired adipose tissue capillarization, and inflammation. Circulation *124*, 67–76.

Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science *259*, 87–91.

Hur, J., Yoon, C.-H., Kim, H.-S., Choi, J.-H., Kang, H.-J., Hwang, K.-K., Oh, B.-H., Lee, M.-M., and Park, Y.-B. (2004). Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *24*, 288–293.

Ibrahim, M.M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. Obes Rev *11*, 11–18.

Ingram, D.A., Mead, L.E., Tanaka, H., Meade, V., Fenoglio, A., Mortell, K., Pollok, K., Ferkowicz, M.J., Gilley, D., and Yoder, M.C. (2004). Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. Blood *104*, 2752–2760.

Kamezaki, K., Shimoda, K., Numata, A., Haro, T., Kakumitsu, H., Yoshie, M., Yamamoto, M., Takeda, K., Matsuda, T., Akira, S., et al. (2005). Roles of Stat3 and ERK in G-CSF signaling. Stem Cells *23*, 252–263.

Kamio, N., Akifusa, S., Yamaguchi, N., and Yamashita, Y. (2008). Induction of granulocyte colony-stimulating factor by globular adiponectin via the MEK-ERK pathway. Mol. Cell. Endocrinol. *292*, 20–25.

Kelley, D.E., Thaete, F.L., Troost, F., Huwe, T., and Goodpaster, B.H. (2000). Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *278*, E941–948.

Keophiphath, M., Rouault, C., Divoux, A., Clément, K., and Lacasa, D. (2010). CCL5 promotes macrophage recruitment and survival in human adipose tissue. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *30*, 39–45.

Kopelman, P.G. (2000). Obesity as a medical problem. Nature *404*, 635–643.

Kopelman, P.G. (2005). Clinical treatment of obesity: are drugs and surgery the answer? Proc Nutr Soc *64*, 65–71.

Krenning, G., van Luyn, M.J.A., and Harmsen, M.C. (2009). Endothelial progenitor cell-based neovascularization: implications for therapy. Trends Mol Med *15*, 180–189.

van Kruijsdijk, R.C.M., van der Wall, E., and Visseren, F.L.J. (2009). Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. *18*, 2569–2578.

Lafontan, M. (2011). [Kidney, adipose tissue, adipocytes--what's new?]. Nephrol. Ther. *7*, 69–79.

Layton, J.E., and Hall, N.E. (2006). The interaction of G-CSF with its receptor. Front. Biosci. *11*, 3181–3189.

Ledoux, S., Queguiner, I., Msika, S., Calderari, S., Rufat, P., Gasc, J.-M., Corvol, P., and Larger, E. (2008). Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue in severe human obesity. Diabetes *57*, 3247–3257.

Liongue, C., Wright, C., Russell, A.P., and Ward, A.C. (2009). Granulocyte colony-stimulating factor receptor: stimulating granulopoiesis and much more. Int. J. Biochem. Cell Biol. *41*, 2372–2375.

MacEneaney, O.J., Kushner, E.J., Westby, C.M., Cech, J.N., Greiner, J.J., Stauffer, B.L., and DeSouza, C.A. (2010). Endothelial progenitor cell function, apoptosis, and telomere length in overweight/obese humans. Obesity (Silver Spring) *18*, 1677–1682.

Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., and Ranganathan, S. (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. Nat. Med. *1*, 1155–1161.

Mead, L.E., Prater, D., Yoder, M.C., and Ingram, D.A. (2008). Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from human blood. Curr Protoc Stem Cell Biol *Chapter 2*, Unit 2C.1.

Metcalf, D. (2010). The colony-stimulating factors and cancer. Nat. Rev. Cancer *10*, 425–434.

Miller-Kasprzak, E., and Jagodziński, P.P. (2007). Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.) *55*, 247–259.

Miranville, A., Heeschen, C., Sengenès, C., Curat, C.A., Busse, R., and Bouloumié, A. (2004). Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. Circulation *110*, 349–355.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods *65*, 55–63.

Mutch, D.M., and Clément, K. (2006). Unraveling the genetics of human obesity. PLoS Genet. *2*, e188.

Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Kaziro, Y., Yamazaki, T., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oheda, M., and Nomura, H. (1986). Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. Nature *319*, 415–418.

NEEL, J.V. (1962). Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? Am. J. Hum. Genet. *14*, 353–362.

O'Connell, J., Lynch, L., Hogan, A., Cawood, T.J., and O'Shea, D. (2011). Preadipocyte factor-1 is associated with metabolic profile in severe obesity. J. Clin. Endocrinol. Metab. *96*, E680–684.

Ohki, Y., Heissig, B., Sato, Y., Akiyama, H., Zhu, Z., Hicklin, D.J., Shimada, K., Ogawa, H., Daida, H., Hattori, K., et al. (2005). Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils. Faseb J. *19*, 2005–2007.

Ouchi, N., Parker, J.L., Lugus, J.J., and Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. Nat. Rev. Immunol. *11*, 85–97.

Panopoulos, A.D., and Watowich, S.S. (2008). Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and "emergency" hematopoiesis. Cytokine *42*, 277–288.

Park, K.-W., Kwon, Y.-W., Cho, H.-J., Shin, J.-I., Kim, Y.-J., Lee, S.E., Youn, S.-W., Lee, H.-C., Kang, H.-J., Shaul, P.W., et al. (2008). G-CSF exerts dual effects on endothelial cells--opposing actions of direct eNOS induction versus indirect CRP elevation. J. Mol. Cell. Cardiol. *45*, 670–678.

Pasarica, M., Sereda, O.R., Redman, L.M., Albarado, D.C., Hymel, D.T., Roan, L.E., Rood, J.C., Burk, D.H., and Smith, S.R. (2009). Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. Diabetes *58*, 718–725.

Pearson, J.D. (2009). Endothelial progenitor cells - hype or hope? J. Thromb. Haemost. *7*, 255–262.

Prentice, A.M., Hennig, B.J., and Fulford, A.J. (2008). Evolutionary origins of the obesity epidemic: natural selection of thrifty genes or genetic drift following predation release? Int J Obes (Lond) *32*, 1607–1610.

Resch, T., Pircher, A., Kähler, C.M., Pratschke, J., and Hilbe, W. (2011). Endothelial Progenitor Cells: Current Issues on Characterization and Challenging Clinical Applications. Stem Cell Rev.

Roberts, A.W. (2005). G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all! Growth Factors *23*, 33–41.

Sanganalmath, S.K., Abdel-Latif, A., Bolli, R., Xuan, Y.-T., and Dawn, B. (2011). Hematopoietic cytokines for cardiac repair: mobilization of bone marrow cells and beyond. Basic Res. Cardiol. *106*, 709–733.

Sieveking, D.P., and Ng, M.K.C. (2009). Cell therapies for therapeutic angiogenesis: back to the bench. Vasc Med *14*, 153–166.

Simon, C., Schweitzer, B., Oujaa, M., Wagner, A., Arveiler, D., Triby, E., Copin, N., Blanc, S., and Platat, C. (2008). Successful overweight prevention in adolescents by increasing physical activity: a 4-year randomized controlled intervention. Int J Obes (Lond) *32*, 1489–1498.

Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C., and Hauner, H. (2007). Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. J. Clin. Endocrinol. Metab. *92*, 1023–1033.

Smadja, D.M., Cornet, A., Emmerich, J., Aiach, M., and Gaussem, P. (2007). Endothelial progenitor cells: characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy. Cell Biol. Toxicol. *23*, 223–239.

Steinmetz, M., Nickenig, G., and Werner, N. (2010). Endothelial-regenerating cells: an expanding universe. Hypertension *55*, 593–599.

Stephens, M., Ludgate, M., and Rees, D.A. (2011). Brown fat and obesity: the next big thing? Clin. Endocrinol. (Oxf) *74*, 661–670.

Sun, K., Kusminski, C.M., and Scherer, P.E. (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. J. Clin. Invest. *121*, 2094–2101.

Surmi, B.K., and Hasty, A.H. (2010). The role of chemokines in recruitment of immune cells to the artery wall and adipose tissue. Vascul. Pharmacol. *52*, 27–36.

Svensson, P.-A., Jernås, M., Sjöholm, K., Hoffmann, J.M., Nilsson, B.E., Hansson, M., and Carlsson, L.M.S. (2011). Gene expression in human brown adipose tissue. Int. J. Mol. Med. *27*, 227–232.

Thebaud, N.B., Bareille, R., Remy, M., Bourget, C., Daculsi, R., and Bordenave, L. (2010). Human progenitor-derived endothelial cells vs. venous endothelial cells for vascular tissue engineering: an in vitro study. J Tissue Eng Regen Med *4*, 473–484.

Tobler, K., Freudenthaler, A., Baumgartner-Parzer, S.M., Wolzt, M., Ludvik, B., Nansalmaa, E., Nowotny, P.J., Seidinger, D., Steiner, S., Luger, A., et al. (2010). Reduction of both number and proliferative activity of human endothelial progenitor cells in obesity. Int J Obes (Lond) *34*, 687–700.

Tordjman, J., Divoux, A., Prifti, E., Poitou, C., Pelloux, V., Hugol, D., Basdevant, A., Bouillot, J.-L., Chevallier, J.-M., Bedossa, P., et al. (2012). Structural and inflammatory heterogeneity in subcutaneous adipose tissue: Relation with liver histopathology in morbid obesity. J. Hepatol. *56*, 1152–1158.

Tura, O., Crawford, J., Barclay, G.R., Samuel, K., Hadoke, P.W.F., Roddie, H., Davies, J., and Turner, M.L. (2010). Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) depresses angiogenesis in vivo and in vitro: implications for sourcing cells for vascular regeneration therapy. J. Thromb. Haemost. *8*, 1614–1623.

Villaret, A., Galitzky, J., Decaunes, P., Estève, D., Marques, M.-A., Sengenès, C., Chiotasso, P., Tchkonia, T., Lafontan, M., Kirkland, J.L., et al. (2010). Adipose tissue endothelial cells from obese human subjects: differences among depots in angiogenic, metabolic, and inflammatory gene expression and cellular senescence. Diabetes *59*, 2755–2763.

Voyta, J.C., Via, D.P., Butterfield, C.E., and Zetter, B.R. (1984). Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. J. Cell Biol. *99*, 2034–2040.

Wood, I.S., de Heredia, F.P., Wang, B., and Trayhurn, P. (2009). Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. Proc Nutr Soc *68*, 370–377.

Yamada, M., Suzuki, K., Kudo, S., Totsuka, M., Nakaji, S., and Sugawara, K. (2002). Raised plasma G-CSF and IL-6 after exercise may play a role in neutrophil mobilization into the circulation. J. Appl. Physiol. *92*, 1789–1794.

Yoder, M.C., Mead, L.E., Prater, D., Krier, T.R., Mroueh, K.N., Li, F., Krasich, R., Temm, C.J., Prchal, J.T., and Ingram, D.A. (2007). Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. Blood *109*, 1801–1809.

Autres références :

* [Bout, 2010] : rapport parlementaire intitulé « L'organisation de la recherche et ses perspectives en matière de prévention et de traitement de l'obésité »

* [Guy-Grand, 2008] : http://www.jle.com/e-docs/00/04/3D/5F/vers_alt/VersionPDF.pdf

* [Lafontan, 2008] : http://www.institut-servier.com/download/obesite2/4.pdf

* OMS : http://www.eufic.org/article/fr/artid/obesite-maladie-millenaire/(obésité/maladie)

http://www.who.int/topics/obesity/fr/ (définition obésité)

* Enquête ObEpi (2009) :

http://www.roche.fr/gear/newcontents/servlet/staticfilesServlet?type=data&communityId=re7

19001&id=static/attachedfile/re7300002/re72700003/AttachedFile_10101.pd

* Répartition du tissu adipeux dans l'organisme : http://obesite.ulaval.ca/obesite/abdominale/traitement.php

* Schéma d'un court-circuit gastrique : http://fr.dir.groups.yahoo.com/group/Gastric-By-Passers/?v=1&t=directory&ch=web&pub=groups&sec=dir&slk=

* Fiche technique Matrigel® : http://www.hellopro.fr/documentation/doc_produit/3974_75f26c81bcaeefd58b89667ae95e6c9d_273914.pdf

* Site de la plateforme de PCR en temps réel de l'Institut Louis Malardé : www.ilm.pf/PCRtempsreel

* Logiciel proposé pour le choix des amorces par Roche en ligne : https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=uplct_030000