



HAL
open science

Influence de la protéine découplante mitochondriale UCP2 sur la signalisation et le métabolisme des macrophages

Yalin Emre

► **To cite this version:**

Yalin Emre. Influence de la protéine découplante mitochondriale UCP2 sur la signalisation et le métabolisme des macrophages. Biologie cellulaire. Université René Descartes - Paris V, 2007. Français. NNT: . tel-00182672

HAL Id: tel-00182672

<https://theses.hal.science/tel-00182672>

Submitted on 26 Oct 2007

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 5

Spécialité
Biologie Cellulaire / Immunologie

Présentée par
Monsieur Yalin EMRE

Pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université Paris 5

Sujet de thèse

**Influence de la protéine découplante mitochondriale UCP2 sur la
signalisation et le métabolisme des macrophages**

Soutenue le 10 octobre 2007 devant le jury composé de :

Catherine Sautès-Fridman
Francesc Villarroya
Louis Casteilla
Frédéric Geissmann
Anne-Marie Cassard-Doulicier

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse

TABLE DES MATIÈRES

ABRÉVIATIONS	p.5
LISTE DES ARTICLES	p.7
LISTE DES FIGURES	p.8
AVANT PROPOS	p.9
INTRODUCTION	p.11
I/ La mitochondrie	p.11
1/ Les fonctions	p.12
1.1/ La production d'énergie	p.12
1.1.1/ Le cycle de Krebs	p.12
1.1.2/ La chaîne respiratoire	p.13
1.1.2.1/ Description	p.13
1.1.2.2/ Régulation	p.13
1.1.2.3/ Un couplage imparfait	p.14
1.2/ La production de radicaux libres par la mitochondrie	p.14
1.2.1/ Les espèces réactives de l'oxygène	p.14
1.2.2/ La production mitochondriale	p.15
1.2.3/ Les espèces dérivées et les systèmes anti-oxydants	p.15
1.3/ L'apoptose	p.16
2/ Les protéines découplantes	p.18
2.1/ UCP1 et le découplage	p.18
2.2/ UCP2	p.19
2.2.1/ La famille des UCP	p.19
2.2.2/ La distribution et la régulation de l'expression d'UCP2	p.20
2.2.2.1/ Distribution	p.20
2.2.2.2/ Régulation	p.20
2.2.3/ L'activité physiologique	p.20
2.2.3.1/ La sécrétion d'insuline	p.21
2.2.3.2/ L'immunité	p.22
2.2.3.3/ L'activité neuronale	p.22
2.2.4/ L'activité biochimique	p.23
2.2.4.1/ Le découplage	p.23
2.2.4.2/ Le transport de métabolites	p.25
II/ Les Macrophages	p.26
1/ Généralités	p.26
2/ L'activation	p.26
2.1/ Les molécules de surface	p.26
2.1.1/ Pattern Recognition Receptor	p.27
2.1.1.1/ Les lectines	p.27
2.1.1.2/ Les récepteurs Scavenger	p.27
2.1.1.3/ Les Toll-like Receptor et leurs ligands	p.28
2.1.2/ Les récepteurs impliqués dans la phagocytose d'éléments opsonisés	p.28

2.1.3/ Les récepteurs aux cytokines et aux molécules d'adhésion	p.28
2.1.4/ Le complexe majeur d'histocompatibilité	p.29
2.2/ Les modes d'activation du macrophage	p.29
2.2.1/ L'activation innée	p.29
2.2.2/ L'activation humorale	p.29
2.2.3/ L'activation classique	p.30
2.2.4/ L'activation alternative	p.30
3/ Les fonctions	p.30
3.1/ La phagocytose	p.30
3.2/ Les molécules produites	p.31
3.2.1/ Les espèces réactives de l'oxygène	p.31
3.2.2/ Le monoxyde d'azote	p.32
3.2.3/ Les enzymes	p.33
3.2.4/ Les cytokines et les facteurs de croissance	p.33
3.3/ La présentation d'antigène	p.34
4/ La signalisation par les TLR	p.35
4.1/ Les voies MAPK	p.36
4.1.1/ La cascade ERK	p.37
4.1.2/ La cascade p38	p.37
4.1.3/ La cascade JNK	p.38
4.2/ La voie NF- κ B	p.38
4.3/ En aval des voies de signalisation	p.39
4.4/ La régulation	p.40
5/ Les ROS et la signalisation	p.40
5.1/ Origine	p.40
5.2/ Le rôle des ROS dans la signalisation cellulaire	p.41
5.2.1/ La mise en évidence	p.41
5.2.2/ Le niveau d'action	p.42
5.3/ Les ROS et la signalisation dans les macrophages en réponse au LPS	p.42
III/ Le diabète de type 1	p.45
1/ Les modèles d'étude	p.45
1.1/ La souris NOD	p.45
1.2/ Le rat BB	p.46
1.3/ La streptozotocine	p.46
2/ La génétique	p.47
2.1/ Les gènes HLA	p.47
2.2/ Le gène de l'insuline	p.48
2.3/ Les autres loci	p.48
3/ La physiopathologie	p.49
3.1/ Les auto-antigènes	p.49
3.1.1/ L'acide glutamique décarboxylase	p.49
3.1.2/ La tyrosine phosphatase	p.49
3.1.3/ L'insuline	p.50
3.2/ L'insulite	p.50
3.3/ La destruction des cellules β	p.50
3.3.1/ Les lymphocytes T	p.51
3.3.2/ Et les macrophages ?	p.51

3.3.3/ L'organe cible	p.52
BUT DU TRAVAIL	p.53
RÉSULTATS	p.54
1/ Article 1 : The uncoupling protein 2 modulates the cytokine balance in innate immunity.	p.54
1.1/ Introduction	p.54
1.2/ Manuscrit	p.55
1.3/ Résultats complémentaires	p.56
1.3.1/ Expression d'UCP2	p.56
1.3.2/ Production de cytokines	p.56
1.4/ Conclusion et points de discussion	p.56
2/ Article 2 : Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages	p.57
2.1/ Introduction	p.57
2.2/ Manuscrit	p.58
2.3/ Résultats complémentaires	p.59
2.3.1/ ROS cellulaires	p.59
2.3.2/ Effet de l'IFN- γ ...	p.59
2.3.1.1/ ... sur l'expression d'UCP2	p.59
2.3.1.2/ ... sur les phénotypes Ucp2-WT/Ucp2-KO	p.60
2.3.3/ TNF- α et l'IL-1 β	p.60
2.3.4/ Phagocytose	p.60
2.4/ Conclusion et points de discussion	p.61
3/ Article 3 : Role of uncoupling protein UCP2 in cell-mediated immunity: how macrophage-mediated insulinitis is accelerated in a model of autoimmune diabetes	p.62
3.1/ Introduction	p.62
3.2/ Manuscrit	p.63
3.3/ Résultats complémentaires	p.64
3.4/ Conclusion et points de discussion	p.64
4/ Article 4 : Glutamine metabolism is altered in macrophages of Ucp2 knock-out mice.	p.66
4.1/ Introduction	p.66
4.2/ Manuscrit	p.67
4.3/ Conclusion et points de discussion	p.68
5/ Article 5 : Avian UCP : the killjoy in the evolution of the mitochondrial uncoupling proteins	p.69
5.1/ Introduction	p.69
5.2/ Manuscrit	p.70
5.3/ Conclusion et points de discussion	p.71
DISCUSSION	p.72
1/ Activité physiologique – UCP2 et la signalisation	p.72
1.1/ La mitochondrie et la signalisation par les ROS	p.72
1.1.1/ Les MAPK	p.73

1.1.2/ Quels ROS ?	p.73
1.1.3/ Cible cytoplasmique des ROS	p.74
1.2/ UCP2 et le mode d'activation des macrophages	p.75
1.3/ La signalisation par les ROS dans les cellules β -pancréatiques	p.76
1.4/ NF- κ B et la pré-activation	p.76
1.4.1/ NF- κ B ?	p.76
1.4.2/ La pré-activation ?	p.77
1.5/ Caractéristiques d'UCP2	p.78
1.6/ Les macrophages Ucp2-KO et la destruction des pathogènes	p.80
2/ Activité biochimique - UCP2 et le métabolisme	p.82
2.1/ L'oxydation de la glutamine	p.82
2.2/ L'activité métabolique d'UCP2	p.83
2.3/ Signalisation par les ROS ou par le métabolisme ?	p.84
2.3.1/ Théorie métabolique de la signalisation par les ROS	p.84
2.3.2/ Quelques précisions	p.85
2.4/ La production de ROS mitochondriaux et l'activité découplante	p.86
2.4.1/ Les théories découplantes et la production de ROS	p.86
2.4.2/ Les arguments opposables	p.87
2.5/ Les autres UCP et le métabolisme	p.87
2.5.1/ UCP1	p.87
2.5.2/ UCP3	p.88
2.5.3/ avUCP	p.88
3/ Aspects <i>in vivo</i> et interprétations	p.89
3.1/ UCP2 et le système immunitaire	p.89
3.1.1/ La distribution cellulaire	p.89
3.1.2/ Les cytokines	p.90
3.1.3/ La réponse adaptative et auto-immunité	p.91
3.2/ Théorie anti-oxydante	p.93
3.2.1/ Les ROS du stress oxydatifs	p.93
3.2.2/ L'induction d'UCP2	p.93
3.2.2.1/ <i>In vitro</i>	p.93
3.2.2.2/ <i>In vivo</i>	p.94
3.2.3/ Les molécules anti-inflammatoires	p.95
3.2.4/ Applications de la théorie anti-oxydante	p.96
3.3/ Le LPS et le métabolisme en réponse à l'agression	p.97
3.4/ Les îlots de Langerhans et l'insuline	p.98
3.4.1/ La sécrétion d'insuline	p.98
3.4.2/ Les macrophages et les îlots de Langerhans	p.99
4/ Conclusions et perspectives	p.101
RÉFÉRÉNCES	p.104
ANNEXES	p.126
1/ Article 1. UCP2 is a mitochondrial transporter with an unusual very short half-life	p.126
2/ Article 2. Thermoregulation: what role for UCPs in mammals and birds?	p.127

ABRÉVIATIONS

□-CG	□-céto-glutarate
ADN	acide désoxy-ribo-nucléique
ADP	adénosyl-diphosphate
AIF	apoptosis-inducing factor
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1
APC	cellule présentatrice d'antigène
ARN	acide ribo-nucléique
ARNm	ARN messenger
ATF-2	activating transcription factor-2
ATP	adénosyl-triphosphate
avUCP	UCP aviaire
BB	Bio-breeding
BCR	B cell receptor
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CoA	co-enzyme A
Co-Q	ubiquinone ou co-enzyme Q
Co-QH°	ubisemiquinone
Co-QH ₂	ubiquinol
Da	dalton
DB	diabetes prone
DCFDA	dichlorohydrofluorescein
DHE	dihydroéthidium
DIABLO	direct inhibitor of apoptosis protein binding protein with low pI
DPI	diphényleneiodonium chloride
DR	diabetes resistant
EAE	encéphalo-myélite autoimmune expérimentale
EGF	epidermal growth factor
endo G	endonucléase G
ERK	extracellular signal-related kinase
FAD	flavine adénine dinucléotide oxydé
FADH ₂	flavine adénine dinucléotide réduit
GAD	acide glutamique décarboxylase
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GSSG	glutathion oxydé
GSH	glutathion réduit
H ⁺	proton
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
HLA	human leukocyte antigen
HO ⁻	anion hydroxyle
HO°	radical hydroxyle
HOCl	ion hypochlorite
I-□B	inhibitor of □B
IA-2	islet antibody-2
IAP	inhibitor of apoptosis protein
IDDM	insulin-dependent diabetes mellitus
IFN	interféron
Ig	immunoglobuline
IKK	I-□B Kinase
IL	interleukine
iNOS	NOS inductible
IRAK	IL-1 receptor-associated kinase

JNK	c-jun NH ₂ -terminal kinase
KO	knock-out
LDL	low density lipoprotein
LPS	lipopolysaccharides
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKAK	MAPK-activated kinase
MCP	monocyte chemoattractant protein
MEK	MAP/ERK kinase
MIP	macrophage inflammatory protein
MLDS	multiple low-dose streptozotocin
Mnk-1	MAPK-interacting kinase
MPO	myélo-peroxydase
MTP	pore de transition de perméabilité mitochondrial
MyD88	myeloid differentiation primary response protein 88
NAC	N-acétyl-cystéine
NAD ⁺	nicotine adénine dinucléotide oxydé
NADH,H ⁺	nicotine adénine dinucléotide réduit
NADPH	nicotine adénine dinucléotide phosphate réduit
NBT	nitrobleu tetrazolium
NEMO	NF- κ B essential modulator
NK	natural killer
NO	monoxyde d'azote
NOD	non obese diabetic
NOS	nitric oxyde synthase
NOX	NADPH oxydase
O ₂ ^{o-}	anion superoxyde
ONOO ^{o-}	peroxynitrite
ORF	phase ouverte de lecture
NF- κ B	nuclear factor- κ B
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
phox	phagocyte oxidase
PKC	protéine kinase C
PRR	pattern recognition receptor
RHD	Rel Homology Domain
ROS	espèces réactives de l'oxygène
SAPK	stress-activated protein kinase
Smac	second mitochondria-derived activator of caspase
SOD	superoxide dismutase
STZ	streptozotocine
TAB	tissu adipeux brun
TAK-1	TGF-activated kinase-1
TCR	T cel receptor
Th	T helper
TIR	Toll/IL-1 Receptor
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TNF-R	récepteur au TNF
TRAF	TNF receptor-associated factor
UCP	uncoupling protein
VEGF	vascular endothelial growth factor
VNTR	variable number of tandem repeat
WT	wild-type

LISTE DES ARTICLES

Dans la partie résultats :

1/ The uncoupling protein 2 modulates the cytokine balance in innate immunity.

Rousset S., Emre Y., Join-Lambert O., Hurtaud C., Ricquier D. et Cassard-Doulcier A.M.

Cytokine. (2006) 34, 135-42.

2/ Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages.

Emre Y., Hurtaud C., Nübel T., Criscuolo F., Ricquier D. et Cassard-Doulcier A.M.

Biochemical Journal. (2007) 402, 271-8.

3/ Role of uncoupling protein UCP2 in cell-mediated immunity:
how macrophage-mediated insulinitis is accelerated in a model of autoimmune diabetes

Emre Y., Hurtaud C., Karaca M., Nübel T., Zavala F. et Ricquier D.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (sous presse)

4/ Glutamine metabolism is altered in macrophages of *Ucp2* knock-out mice.

Nübel T., Emre Y., Rabier D., Ricquier D. et Bouillaud F.

Manuscrit en préparation.

5/ Avian UCP : the killjoy in the evolution of the mitochondrial uncoupling proteins.

Emre Y., Hurtaud C., Ricquier D., Bouillaud F., Hughes J. et Criscuolo F.

Journal of Molecular Evolution (sous presse).

Dans l'annexe :

6/ Thermoregulation: what role for UCPs in mammals and birds?

Mozo J., Emre Y., Bouillaud F., Ricquier D. et Criscuolo F.

Bioscience Reports. (2005) 25, 227-49.

7/ UCP2 is a mitochondrial transporter with an unusual very short half-life.

Rousset S., Mozo J., Dujardin G., Emre Y., Masscheleyn S., Ricquier D. et Cassard-Doulcier A.M.

FEBS Letters. (2007) 581, 479-82.

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : La mitochondrie et ses transporteurs.
- Figure 2** : Le métabolisme cellulaire.
- Figure 3** : Le cycle de Krebs.
- Figure 4** : La glutaminolyse.
- Figure 5** : La chaîne respiratoire.
- Figure 6** : La production de ROS par le complexe III.
- Figure 7** : L'histoire des ROS.
- Figure 8** : Les dégâts des ROS et du NO sur l'activité mitochondriale.
- Figure 9** : L'apoptose.
- Figure 10** : L'organisation des transporteurs mitochondriaux
- Figure 11** : Le découplage.
- Figure 12** : Les PRR.
- Figure 13** : Les TLR et leurs ligands
- Figure 14** : Les différents modes d'activation des macrophages.
- Figure 15** : La NADPH oxydase.
- Figure 16** : La signalisation par les récepteurs TLR, IL-1R et TNF-R.
- Figure 17** : Les MAPK.
- Figure 18** : NF- κ B.
- Figure 19** : L'effet biologique des ROS.
- Figure 20** : Les conséquences cellulaires des ROS.
- Figure 21** : La signalisation par les ROS.
- Figure 22** : L'action des ROS sur l'activité des phosphatases.
- Figure 23** : La streptozotocine.
- Figure 24** : L'expression d'UCP2 dans la rate après infection par *L. monocytogenes*.
- Figure 25** : La production de cytokines dans la rate après infection par *L. monocytogenes*.
- Figure 26** : La production de ROS cellulaires.
- Figure 27** : L'influence de l'IFN- γ sur l'expression d'UCP2.
- Figure 28** : L'influence de l'IFN- γ sur le phénotype des macrophages Ucp2-KO et Ucp2-WT.
- Figure 29** : L'influence du TNF- α et de l'IL-1 β sur l'expression d'UCP2.
- Figure 30** : La phagocytose de bactéries.
- Figure 31** : Le transfert adoptif.
- Figure 32** : Conséquences *in vivo* du LPS sur la rate.
- Figure 33** : La translocation nucléaire de NF- κ B.
- Figure 34** : Théorie métabolique de la signalisation par les ROS.
- Figure 35** : Les modèles de lutte contre les ROS par UCP2.
- Figure 36** : Modèle en deux étapes de la régulation d'UCP2 dans le modèle LPS.
- Figure 37** : Le stress oxydatif et la théorie anti-oxydante.

AVANT PROPOS

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à la protéine découplante mitochondriale UCP2 et à son influence dans la signalisation cellulaire et le métabolisme des macrophages.

Dans une première partie, les mitochondries et leurs fonctions seront introduites, ainsi que les protéines découplantes. Cette présentation permettra de faire le point sur les connaissances actuelles concernant UCP2, notamment dans le système immunitaire et la production de radicaux libres (ROS), mais également de mettre en évidence certaines controverses quant aux fonctions d'UCP2. Dans la deuxième partie de l'introduction, je ferais une présentation générale sur les macrophages où seront également abordées les voies de signalisation importantes dans l'activation des macrophages. L'une de ces voies implique les ROS. La dernière partie de l'introduction sera centrée sur la physiopathologie du diabète de type 1 dans lequel UCP2 pourrait avoir un rôle.

Le travail expérimental s'est déroulé selon plusieurs axes. Il a débuté par le modèle d'infection des souris Ucp2-KO et Ucp2-WT par *Listeria monocytogenes*. Cette étude met en évidence un rôle régulateur d'UCP2 sur le développement de la réponse immune. Dans un deuxième temps, nos études *in vitro* des voies de signalisation ont démontré la participation de la mitochondrie à la signalisation par les ROS lors de l'activation des macrophages via la modulation d'UCP2. Par conséquent, les macrophages Ucp2-KO ont une signalisation des voies MAPK augmentée après stimulation, responsable de leur meilleure capacité de réponse. Cette meilleure activité des macrophages Ucp2-KO a été confirmée *in vivo* dans le cadre du diabète de type 1. Le développement de cette maladie auto-immune est fortement accélérée chez les souris Ucp2-KO. Cependant, ces données physiologiques ne permettent pas de conclure sur l'activité biochimique d'UCP2. Notre laboratoire a récemment démontré que la glutamine était un inducteur spécifique de l'expression d'UCP2. Nous nous sommes ainsi intéressés au métabolisme de la glutamine dans les macrophages Ucp2-KO et avons montré que les macrophages Ucp2-KO ont une capacité d'oxydation de la glutamine inférieure aux macrophages Ucp2-WT. Enfin, dans une dernière partie, une histoire de l'évolution des UCP de mammifères et aviaire sera décrite, basée sur nos études phylogénomiques.

Le dernier chapitre de cette thèse discutera les données présentées afin de proposer un modèle sur la fonction d'UCP2, associant les résultats sur la production de ROS mitochondriaux et l'oxydation de la glutamine.

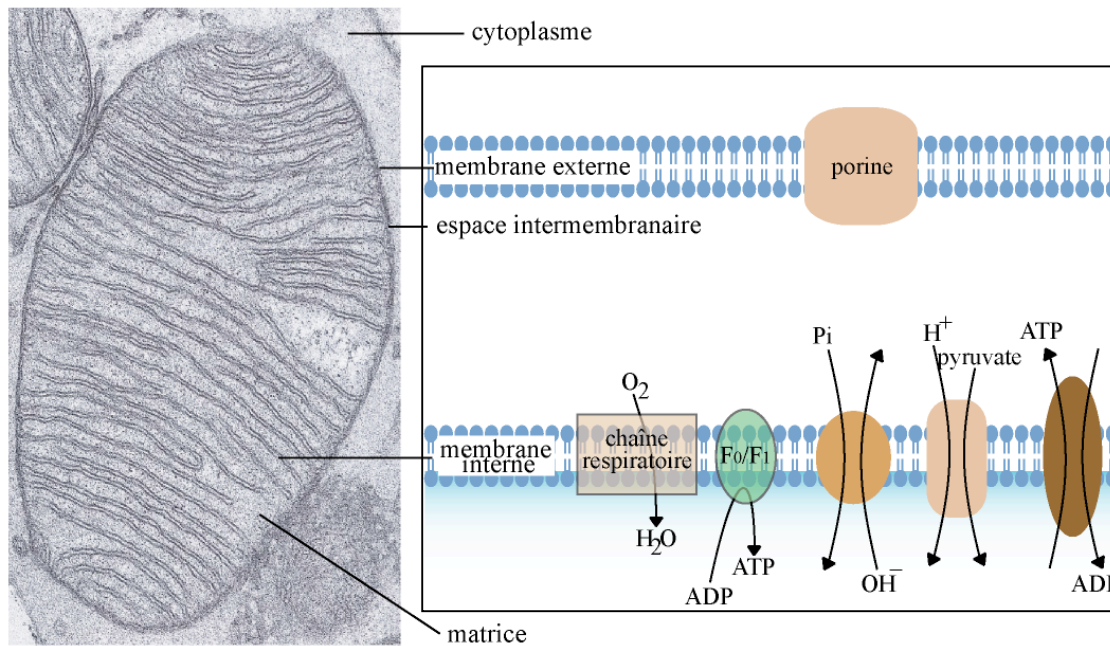


Figure 1 : La mitochondrie et ses transporteurs.

Les mitochondries comportent deux membranes qui délimitent la matrice mitochondriale, l'espace intermembranaire et le cytoplasme. La porine, présente dans la membrane externe, permet le transport passif de molécule d'une masse moléculaire inférieure à 7000 Da entre le cytoplasme et l'espace intermembranaire. Des transporteurs spécifiques sont en revanche nécessaire pour que les molécules franchissent la membrane interne. Celle-ci contient la chaîne respiratoire et la F₀/F₁ ATP synthase.

INTRODUCTION

I/ La mitochondrie

La vie cellulaire nécessite de l'énergie. Celle-ci provient d'une multitude de molécules organiques. Le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines aboutit soit au stockage de l'énergie (triglycérides, glycogène) soit à l'élaboration d'une molécule directement utilisable : l'ATP. L'ATP est constamment disponible et immédiatement régénéré. La plus grande partie de l'ATP est produite dans les mitochondries.

Les mitochondries sont des organites, de l'ordre du micron, présents dans toutes les cellules eukaryotes à l'exception des érythrocytes. Outre la synthèse d'ATP, d'autres réactions fondamentales s'y déroulent telles que le cycle de Krebs ou la β -oxydation des acides gras.

Les mitochondries possèdent deux membranes. Une membrane interne et une membrane externe qui délimitent deux compartiments : l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. La membrane externe est lisse. Des échanges passifs ont lieu entre le cytoplasme et l'espace intermembranaire par l'intermédiaire de canaux protéiques, les porines. Ainsi, la membrane externe est perméable à toute molécule de masse moléculaire inférieure à 7000 Da. A l'inverse, la membrane interne comporte de nombreuses invaginations. C'est au sein de celle-ci que se trouvent l'ATP synthase et les complexes de la chaîne respiratoire. La membrane interne étant imperméable aux ions, il existe de nombreux transporteurs spécifiques leur permettant de pénétrer dans la matrice (Fig. 1).

La plupart des protéines mitochondriales sont codées par des gènes nucléaires, synthétisées dans le cytosol puis importées à l'intérieur de la matrice. Néanmoins, la mitochondrie possède son propre matériel génétique. L'ADN mitochondrial circulaire code des ARNt et des ARNr mitochondriaux ainsi que des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire. L'ADN mitochondrial est transcrit et traduit dans la matrice.

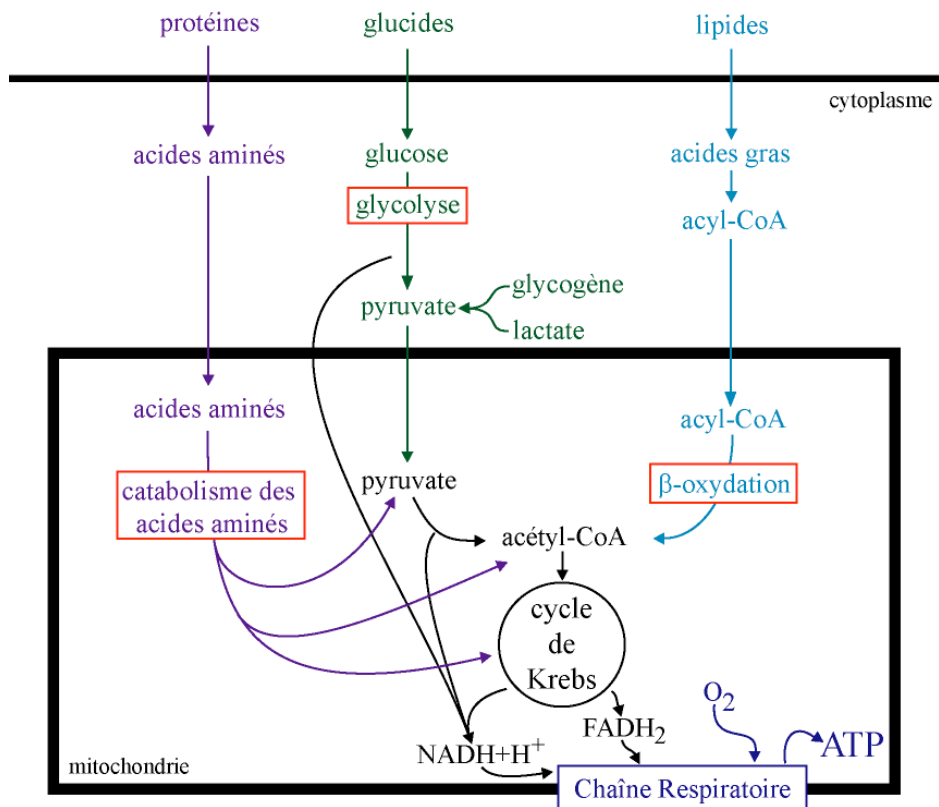


Figure 2 : Le métabolisme cellulaire.

Le catabolisme des glucides, des lipides et des protéines aboutit à la production d'acétyl-CoA, substrat principal du cycle de Krebs.

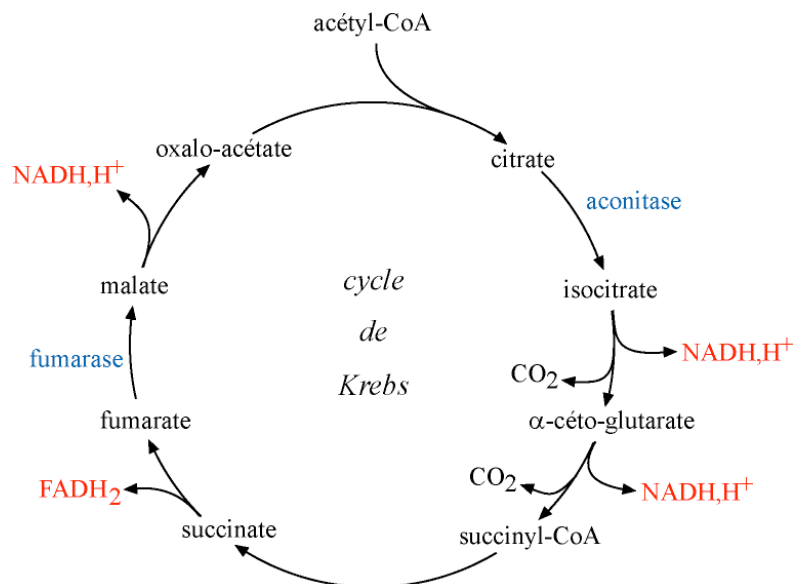


Figure 3 : Le cycle de Krebs.

Le cycle tricarboxylique ou cycle de Krebs est un carrefour métabolique où se rejoignent les substrats énergétiques. Le cycle de Krebs extrait l'énergie de l'acétyl-CoA pour produire 1 ATP, 3 NADH, H⁺ et 1 FADH₂ qui sont repris par la chaîne respiratoire. En bleu sont mentionnés l'aconitase et la fumarase, deux enzymes dont il sera question dans l'article macrophage/LPS.

1/ Les fonctions

La mitochondrie est considérée comme l'usine à énergie de la cellule en raison de son rôle dans la synthèse d'ATP. Cependant, il ne s'agit pas de sa seule fonction. Outre la synthèse d'hormones stéroïdes, de l'hème et du maintien de l'homéostasie calcique, les mitochondries sont également impliquées dans l'apoptose. Nous ne traiterons dans ce chapitre que de leur rôle dans la production d'énergie et l'apoptose.

1.1/ La production d'énergie

Les mitochondries possèdent un équipement enzymatique unique qui leur permet :

- . de transférer l'énergie contenue dans les molécules d'acétyl-CoA aux co-enzymes NAD^+ et FAD dans le cycle de Krebs.
- . d'utiliser l'énergie des co-enzymes par la chaîne respiratoire pour la synthèse d'ATP.

1.1.1/ Le cycle de Krebs

Le principal substrat du cycle de Krebs est l'acétyl-CoA (Fig. 2).

. Origine glucidique

Dans ce cas, le glucose, le glycogène et le lactate sont oxydés en pyruvate. La pyruvate deshydrogénase catalyse ensuite la formation de l'acétyl-CoA.

. Origine lipidique

Les acides gras sont d'abord transformés en acyl-CoA. L'acyl-CoA entre dans la mitochondrie grâce à la carnitine-acyl transférase. Dans la matrice, l'acyl-CoA est oxydé dans l'hélice de Lynen sur son carbone α . Chaque tour forme un acyl-CoA ayant perdu 2 carbones, un acétyl-CoA et des co-enzymes réduits. L'acyl-CoA sera oxydé autant de fois qu'il possède de paires de carbone.

. Origine protéique

Certains acides aminés qui proviennent du catabolisme des protéines peuvent donner directement de l'acétyl-CoA. Il s'agit de l'Ile, Leu, Lys, Trp. D'autres conduisent au pyruvate et par conséquent à l'acétyl-CoA (Ala, Cys, Ser, Gly, Thr et Trp).

Le cycle de Krebs est un ensemble de 8 réactions coordonnées qui ont lieu dans la matrice mitochondriale (Fig. 3). Il permet d'extraire l'énergie contenue dans l'acétyl-

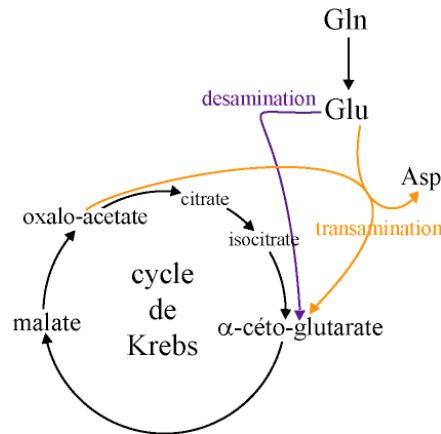


Figure 4 : La glutaminolyse.

Dans la matrice mitochondriale, la glutamine est convertie en glutamate.

1/ L'aspartate amino-transférase catalyse la transamination du glutamate en α -céto-glutarate et l'oxalo-acétate en aspartate.

2/ La glutamate deshydrogénase catalyse la désamination du glutamate en α -céto-glutarate.

L' α -céto-glutarate généré de ces deux manières entre dans le cycle de Krebs.

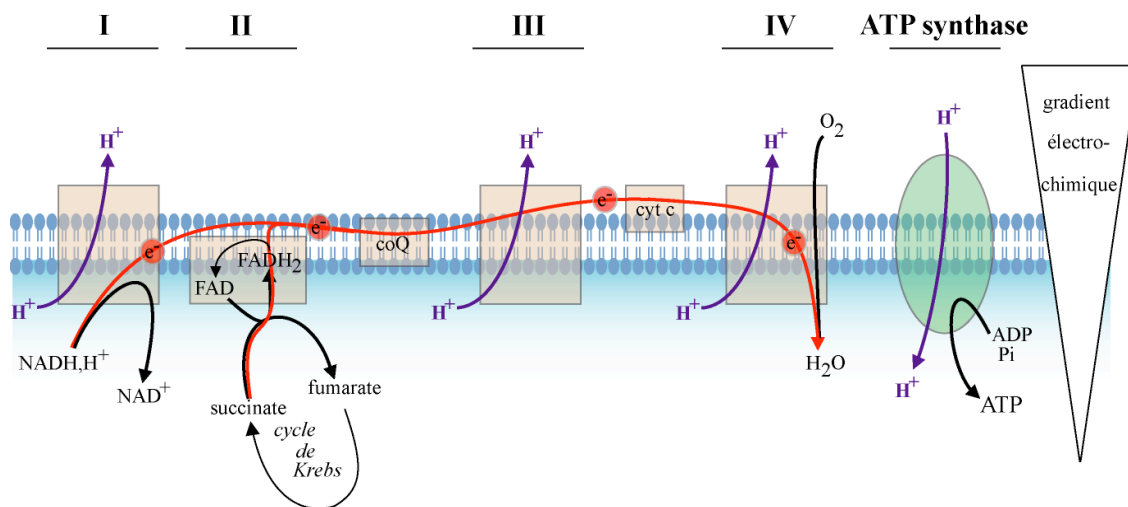


Figure 5 : La chaîne respiratoire.

Les électrons du NADH, H^+ sont captés par le complexe I contenant la NADH deshydrogénase.

La succinate deshydrogénase du complexe II réduit le FAD en FADH_2 .

Les électrons sont ensuite transportés au complexe III par le coenzyme Q. Au cours du cycle du Co-Q, les électrons sont ensuite transférés un à un aux cytochromes du complexe III, puis au cytochrome c. Le cytochrome c est situé sur la face externe de la membrane interne. Elle transporte les électrons au complexe IV qui catalyse la réduction de l'oxygène en deux molécules d'eau. En parallèle au transport des électrons, un gradient électrochimique est établi de part et d'autre de la membrane interne par le pompage de protons au niveau des complexes I, III et IV. Ce gradient constitue une force protomotrice utilisée par la F_0/F_1 -ATP synthase pour la production d'ATP.

CoA en l'oxydant en 2 CO₂. L'énergie est transférée sur les co-enzymes NAD⁺ et FAD et sur un ADP. Les coenzymes réduits (3 NADH,H⁺ et 1 FADH₂) entrent dans la chaîne respiratoire.

L'oxalo-acétate est régénéré en fin de cycle mais il est également fourni par la carboxylation du pyruvate ou la transamination de l'aspartate.

Les acides aminés entrent dans le cycle en donnant de l'α-céto-glutarate, du succinyl-CoA ou du fumarate. Le cas de la glutamine est décrit plus en détail dans la figure 4.

1.1.2/ La chaîne respiratoire

1.1.2.1/ Description

La chaîne respiratoire est un ensemble de complexes enzymatiques situés dans la membrane interne de la mitochondrie.

- complexe I : NADH-coenzyme Q oxydo-réductase
- complexe II : succinate-coenzyme Q oxydo-réductase
- complexe III : ubiquinol-cytochrome c oxydo-réductase
- complexe IV : cytochrome c oxydase

Elle permet la réoxydation des co-enzymes NADH,H⁺ et FADH₂. Par une série de réactions d'oxydo-réduction, les électrons sont transportés au complexe IV où l'oxygène est réduit en eau. Parallèlement, des protons sont pompés de la matrice vers l'espace intermembranaire par les complexes I, III et IV, créant un gradient électrochimique. C'est ce gradient qui fournit à la F₀/F₁-ATP synthase l'énergie nécessaire à la phosphorylation de l'ADP en ATP (Fig. 5). En effet, les protons retournent dans la matrice mitochondriale via l'ATP synthase. Ainsi, la phosphorylation de l'ADP en ATP, c'est-à-dire la synthèse d'ATP est directement couplée à l'oxydation des co-enzymes par la chaîne respiratoire mitochondriale.

1.1.2.2/ Régulation

Un premier point de contrôle de la synthèse d'ATP est la concentration d'oxygène qui dépend de l'apport via la respiration pulmonaire et la circulation.

Les taux d'ADP et d'ATP contrôlent également la chaîne respiratoire. En effet, lorsque la concentration en ADP est faible et la concentration en ATP élevée, les oxydations cellulaires sont diminuées et par conséquent l'activité de la chaîne ralentie. A l'inverse, si la concentration en ATP est faible, c'est-à-dire que la consommation cellulaire d'ATP est élevée, le fonctionnement de la chaîne respiratoire augmente.

1.1.2.3/ Un couplage imparfait

Les expériences réalisées *in vitro* sur des mitochondries isolées ont montré que l'augmentation de la quantité d'ADP favorise la respiration et la synthèse d'ATP. La respiration est donc bien couplée à la synthèse d'ATP.

Dans le même temps, lorsque ces expériences sont réalisées en l'absence d'ADP, il n'y a pas de synthèse d'ATP. Néanmoins, une respiration est toujours observée, bien que 3 à 10 fois plus faible. Ceci signifie que le couplage entre l'oxydation des co-enzymes (respiration) et la synthèse d'ATP n'est pas parfait et donc un certain pourcentage de la respiration n'est pas couplée à la synthèse d'ATP. Une explication est une fuite de protons à travers la membrane interne.

1.2/ La production de radicaux libres par la mitochondrie

1.2.1/ Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) constituent une famille de petites molécules dérivées de l'oxygène. Elle inclut des radicaux oxygénés (anion superoxyde, hydroxyle, peroxyde) et un certain nombre de molécules non radicalaires qui sont des agents oxydants ou facilement convertibles en radicaux (ion hypochlorite, peroxyde d'hydrogène, ozone ou oxygène singulet). Les différents ROS sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

espèce	formule
anion superoxyde	$O_2^{\circ-}$
peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
radical hydroxyle	HO°
radical alkoxyde	RO°
radical peroxyde	ROO°
anion hydroxyde	HO^-
ozone	O_3
ion hypochlorite	$HOCl$
oxygène singulet	1O_2

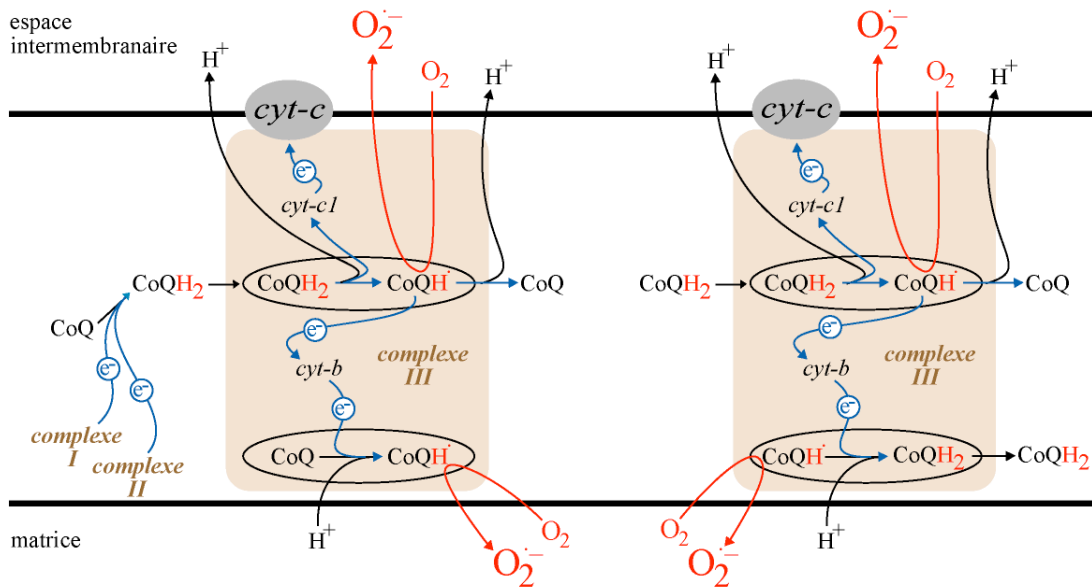


Figure 6 : La production de ROS par le complexe III.

Au cours de la phosphorylation oxydative, les électrons sont transférés des coenzymes réduits ($\text{NADH}, \text{H}^+, \text{FADH}_2$) au complexe IV. Au cours de ce transport, se déroule le cycle du Co-Q. Une molécule Co-Q et une molécule Co-QH₂ se fixent au complexe III en 2 sites.

Co-QH[•], instable, est capable de réagir avec les molécules d'oxygène, générant l'anion superoxyde. La vitesse de la chaîne est responsable de la durée de vie de Co-QH[•] et donc de la génération de ROS par la chaîne respiratoire.

1.2.2/ La production mitochondriale

La production de ROS a plusieurs origines comme la NADPH oxydase (chapitre II.3.2.1/) ou la mitochondrie. Dans cette partie, il ne sera question que la production mitochondriale. La mitochondrie est la principale source de production de ROS dans une cellule au repos. Lorsque les électrons transportés par la chaîne respiratoire sont perdus, ils se combinent avec l'oxygène résultant en la formation de l'anion superoxyde. Ce phénomène a principalement lieu au niveau des complexes I et III (Turrens, 1997), les sources mineures de ROS mitochondriaux étant l' α -céto-glutarate deshydrogénase du cycle de Krebs et la monoamine oxydase (Tretter et Adam-Vizi, 2004 ; Andreyev et al. 2005). Le mécanisme de production par le complexe I est encore débattu (Adam-Vizi et Chinopoulos, 2006). Dans le complexe III, la fuite d'électrons a lieu au cours du cycle du co-enzyme Q (Fig. 6) (Chen et al., 2003). Dans ce cas, la demi-vie du radical ubisemiquinone (Co-QH°) est déterminante. Si la chaîne tourne lentement la demi-vie des intermédiaires augmente (comme celle de Co-QH°), favorisant la production de superoxyde. A l'inverse, une vitesse plus élevée diminuera la demi-vie de Co-QH° et la probabilité de fuite d'électrons. La production de ROS mitochondriaux est ainsi fonction de l'état métabolique de la cellule.

A cette notion de vitesse, il faut ajouter celle d'un découplage partiel (mild uncoupling). Ainsi, un léger découplage de la respiration permettrait une accélération de la chaîne et donc une diminution de la production de superoxyde (Skulachev, 1998).

La production de ROS est une cascade qui débute avec la formation du superoxyde. Ainsi, lors de la respiration mitochondriale, 0,2 à 2% du flux d'électrons conduirait à la production de ROS (Chance et al., 1979, St-Pierre et al., 2002). L'anion superoxyde est donc un dérivé « involontaire » de la respiration.

1.2.3/ Les espèces dérivées et les systèmes anti-oxydants

Les ROS sont hautement réactifs et peuvent endommager les molécules cellulaires. Les cellules possèdent différents mécanismes enzymatiques pour s'en protéger, tels que la glutathion peroxydase, la catalase ou la superoxyde dismutase (SOD) (Wassmann et al., 2004). En réponse au superoxyde et au peroxyde, la cellule

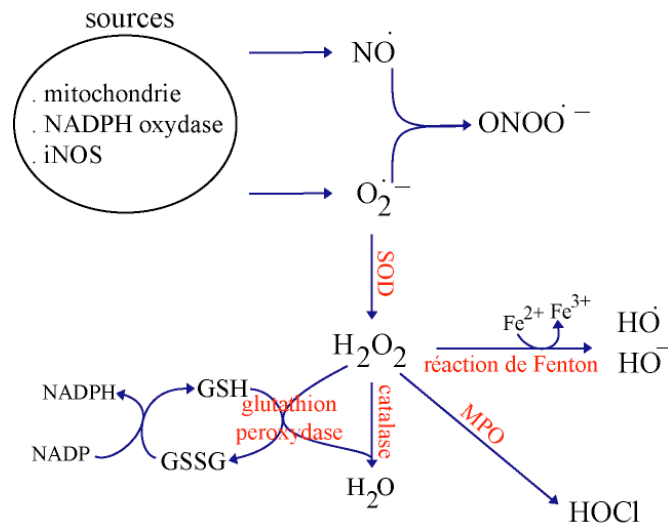


Figure 7 : L'histoire des ROS.

La production de ROS débute par la génération de l'anion superoxyde. Celui-ci est converti en peroxyde d'hydrogène par la superoxyde dismutase (SOD). Par l'action de la catalase ou de la glutathion peroxydase, H_2O_2 se transforme en eau. La myéloperoxydase (MPO) catalyse la transformation du superoxyde en ion hypochlorite. La réaction de Fenton se déroule en présence de métaux de transition. A partir de H_2O_2 , elle produit le radical hydroxyle et l'anion hydroxyde. La réaction du monoxyde d'azote avec le superoxyde forme le peroxyntrite.

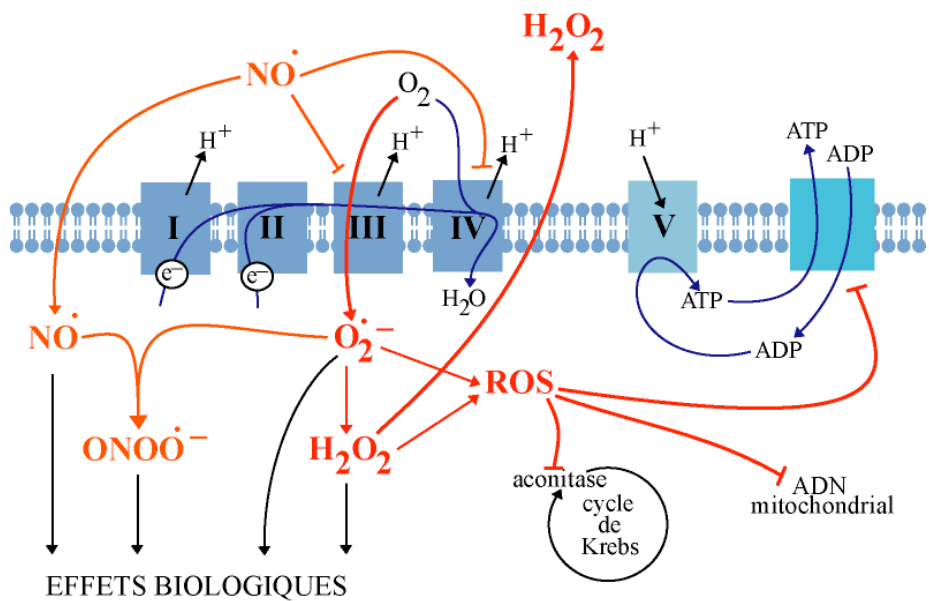
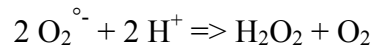


Figure 8 : Les dégâts des ROS et du NO sur l'activité mitochondriale.

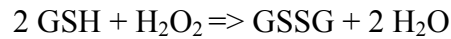
La production de NO et de ROS ont des conséquences sur le fonctionnement de la mitochondrie. L'anion superoxyde est produit par la chaîne respiratoire. Il se dismute en H_2O_2 , capable de diffuser hors de la mitochondrie pour agir dans le cytoplasme. Le NO et le superoxyde réagissent pour former du peroxyntrite, une molécule très réactive. ROS et NO sont responsables de l'altération des fonctions mitochondriales, comme les transporteurs mitochondriaux ou l'aconitase du cycle de Krebs. Ils peuvent également endommager l'ADN mitochondrial, voire entraîner l'apoptose.

augmente l'expression de ces enzymes (Zelko et al., 2002) (Fig. 7).

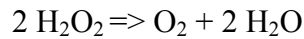
Le superoxyde se dismute spontanément en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à pH faible (comme dans le phagosome) ou sous l'action de la SOD (Fridovich, 1978).



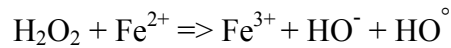
La glutathion peroxydase permet la neutralisation du peroxyde :



La catalase, présente dans les peroxysomes, réduit le peroxyde :



Une réaction biologique importante est la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton (Imlay et al., 1988).



D'autres éléments dans la cascade de production de ROS incluent la réaction du superoxyde avec le monoxyde d'azote NO pour former le peroxynitrite ou la formation de l'ion hypochlorite à partir de H₂O₂, catalysée par la myélo-peroxydase du phagosome.

Les ROS réagissent avec diverses molécules comme les protéines, les lipides, les acides nucléiques, pouvant ainsi altérer ou détruire la fonction des molécules cibles. Par conséquent, les ROS ont été catalogués comme principaux contributeurs aux dommages causés dans l'organisme. La figure 8 illustre la production mitochondriale de ROS et leurs conséquences biologiques.

1.3/ L'apoptose

La mort cellulaire programmée ou apoptose est un phénomène physiologique déterminant. Elle permet l'élimination des cellules anormales ou indésirées.

L'apoptose peut être induite de deux manières. L'une est la voie extrinsèque qui est initiée par les récepteurs de mort de la membrane plasmique (TNF-R, Fas). La seconde est une voie intrinsèque en réponse à une rupture de l'homéostasie

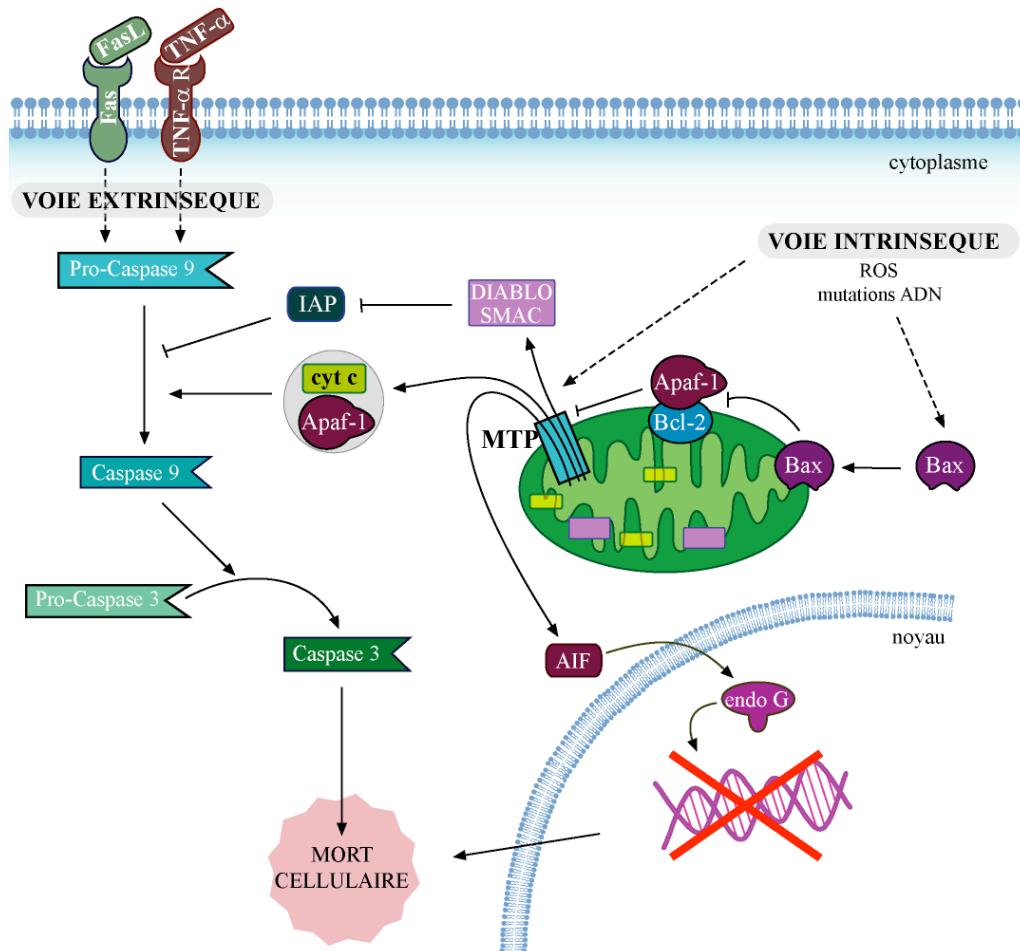


Figure 9 : L'apoptose.

En réponse à un signal de mort intrinsèque (ROS, mutations de l'ADN) ou extrinsèque (TNF- α , FasL) la cellule initie une cascade d'événements conduisant à sa mort par apoptose. Au niveau de la mitochondrie, l'ouverture du pore de transition libère dans le cytoplasme plusieurs médiateurs. Le cytochrome c et Apaf-1 activent la pro-caspase 9. Smac/DIABLO lève l'inhibition qui pèse sur les voies d'activation des caspases. AIF active endo-G, participant à la dégradation de l'ADN.

intracellulaire. Quelle que soit le mode d'induction (intrinsèque ou extrinsèque), les caractéristiques morphologiques de l'apoptose sont similaires, à savoir une réduction de la taille de la cellule, une condensation de la chromatine, un clivage des chromosomes, une rupture de la membrane plasmique et une transformation des organites cellulaires en vésicules appelées corps apoptotiques.

De nombreuses molécules participent à l'apoptose comme les caspases mais aussi le pore de transition de perméabilité mitochondrial (MTP). Les caspases constituent deux groupes. D'un côté les caspases initiatrices (tels que les caspases 2, 8 et 9) qui clivent et activent plusieurs enzymes ou protéines impliquées dans l'apoptose. De l'autre, les caspases effectrices (comme les caspases 3, 6 et 7) qui dégradent des cibles cellulaires précises au cours de l'apoptose. Le MTP est constitué de la porine, la cyclophiline D et de l'échangeur ADP/ATP.

Les facteurs stimulant l'induction de l'apoptose faisant intervenir la mitochondrie sont multiples. Ils incluent les radiations ionisantes, les dommages de l'ADN, l'activation de facteurs suppresseurs de tumeurs (comme p53) ou d'oncogènes, des médiateurs lipidiques ou des agents toxiques.

L'ouverture du MTP est contrôlée par les protéines de la famille Bcl-2 (pour B cell leukemia/lymphoma-2). Cette famille regroupe des protéines pro-apoptotiques (comme Bax, Bad et Bid) et anti-apoptotiques (tels que Bcl-2 et Bcl-x_L). L'activation intrinsèque de l'apoptose conduit à l'insertion de protéines pro-apoptotiques dans la membrane des mitochondries où elles s'oligomérisent. Ces complexes multimériques provoquent la rupture des membranes mitochondriales et l'ouverture du MTP.

La conséquence est d'une part la perte du gradient électrochimique entre la membrane interne et la matrice. D'autre part, des protéines pro-apoptotiques sont libérées dans le cytoplasme comme AIF (Apoptosis-Inducing Factor), Smac/DIABLO (Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase, Direct Inhibitor of Apoptosis protein Binding protein with Low pI) et le cytochrome c.

Le cytochrome c libéré dans le cytoplasme s'associe à Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1). Le complexe ainsi formé ou apoptosome, clive et active la pro-caspase 9. Les IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) sont des protéines cytoplasmiques qui inhibent l'activation des pro-caspases. Une fois dans le cytoplasme, Smac/DIABLO inhibe les IAP, favorisant l'activation de la caspase 9. Une autre protéine libérée est AIF. Elle active l'endonucléase G, une DNase mitochondriale, qui transloque dans le noyau au cours de l'apoptose (Fig. 9).

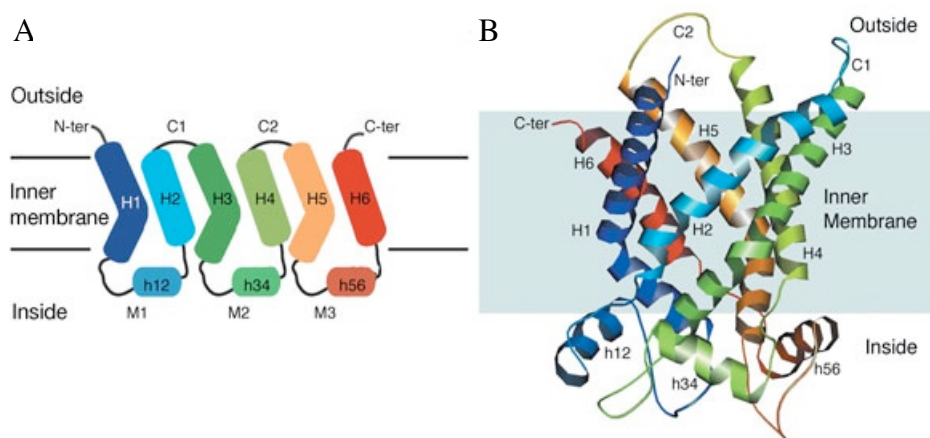


Figure 10 : L'organisation des transporteurs mitochondriaux

(Pebay-Peroula et al., Nature, 2003)

(A) Topologie de l'ADP/ATP translocase, représentative des transporteurs mitochondriaux. Leur structure secondaire comporte 6 hélices α -transmembranaires (H), 3 boucles matricielles (M) et 2 boucles dans l'espace inter-membranaire. Les extrémités N- et C- terminales sont dans l'espace inter-membranaire.

(B) Schéma de la structure de la translocase.

L'apoptose est un phénomène finement régulé qui fait interagir de nombreux partenaires pro et anti-apoptotiques.

2/ Les protéines découplantes

Comme nous l'avons précédemment mentionné, l'imperméabilité aux ions de la membrane interne rend nécessaire la présence de transporteurs spécifiques. Ces protéines, au sein de la membrane interne, constituent une famille, celle des transporteurs mitochondriaux. Ils contrôlent les échanges entre la matrice et le cytoplasme des acides aminés, des ions, de l'ATP et de nombreux métabolites. Ce sont donc des régulateurs du métabolisme mitochondrial.

Les membres de cette famille protéique partagent plusieurs caractéristiques, comme une structure primaire constituée de trois domaines homologues d'une centaine d'acides aminés formant chacune deux hélices- α transmembranaires et une masse moléculaire d'une trentaine de kilo-daltons (Fig. 10). Un sous-groupe de cette famille est celui des protéines découplantes (UCP).

2.1/ UCP1 et le découplage

Le tissu adipeux brun (TAB) est un organe spécialisé dans la production de chaleur sans contraction musculaire, il s'agit de la thermogénèse sans frisson. Ce tissu est spécifique des mammifères homéothermes et est localisé entre autre dans les régions périaortiques, périrénales et interscapulaires. Le TAB est responsable d'une thermogénèse sans frisson lors d'une exposition au froid. Ce tissu est fortement irrigué et innervé par le système nerveux sympathique. Ainsi, la stimulation adrénergique augmente l'activité du TAB et le flux sanguin permet la propagation de la chaleur produite vers les organes. Ce tissu est donc essentiel chez les animaux de petites tailles comme les petits rongeurs, chez les animaux hibernants et chez tous les mammifères nouveaux-nés y compris chez l'homme (Smith et Horwitz, 1969).

Le TAB est constitué d'adipocytes bruns d'aspect multi-oculaires comparés à des adipocytes blancs constitués d'une seule vacuole lipidique (Nicholls et Locke, 1984). Outre les nombreuses gouttelettes lipidiques, les adipocytes bruns présentent un

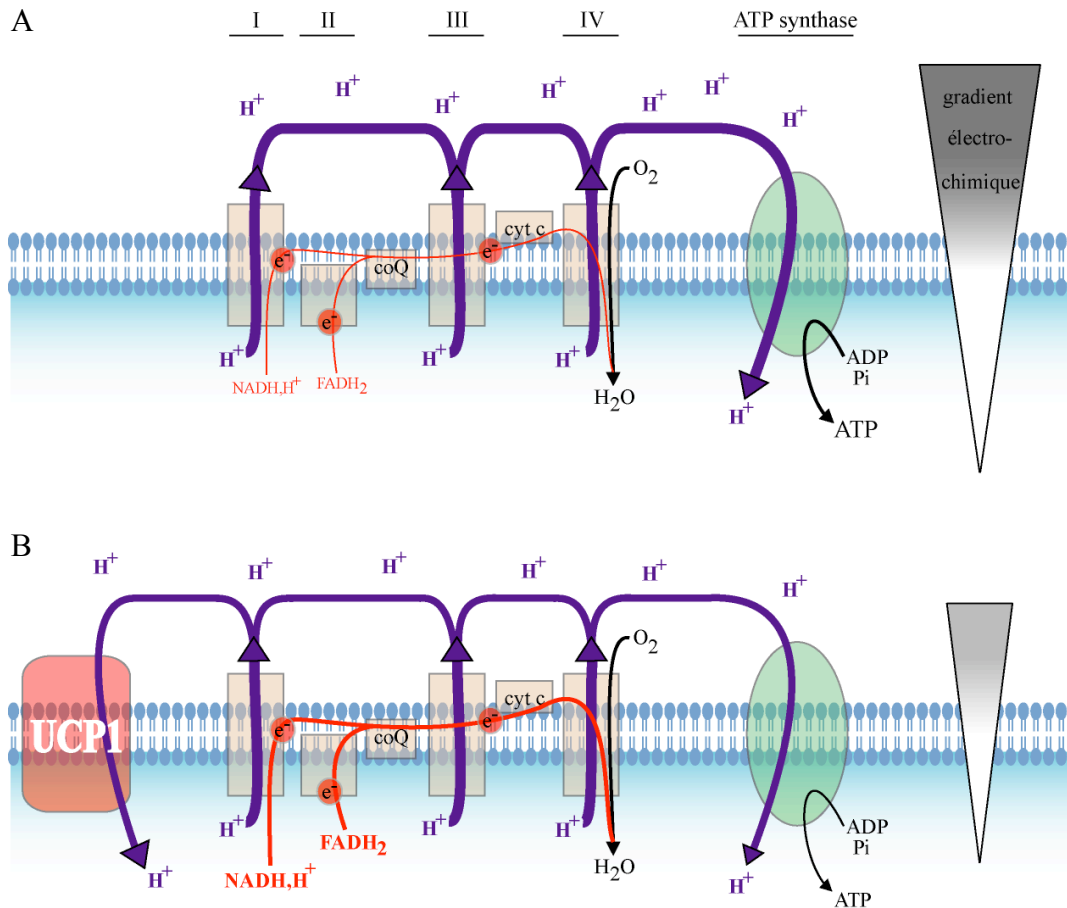


Figure 11 : Le découplage.

(A) La réoxydation des coenzymes libère des électrons qui réduisent l'oxygène en eau par le complexe IV. Ce phénomène s'accompagne d'un pompage de protons par les complexes I, III et IV, établissant un gradient électrochimique. Cette force protomotrice est utilisée pour la synthèse d'ATP par la F_0/F_1 -ATP synthase.

(B) $UCP1$ découple la respiration de la synthèse d'ATP puisqu'elle constitue une voie alternative de retour des protons dans la matrice. Pour lutter contre la diminution du potentiel de membrane causée par $UCP1$, la cellule puise dans ses réserves. Les réactions métaboliques sont ainsi augmentées pour alimenter la chaîne en coenzymes réduits. Elles s'accompagnent d'une production de chaleur.

grand nombre de mitochondries ayant une membrane interne extrêmement développée. Dans les mitochondries de TAB, la respiration est fortement découplée de la synthèse d'ATP. Le responsable de cette activité est la protéine découplante UCP1 (Nicholls et Locke, 1984).

UCP1, est la première protéine découplante découverte. Elle est spécifique du tissu adipeux brun (Ricquier et Kader., 1976 ; Heaton et al., 1978, Bouillaud et al., 1985). Elle permet un retour des protons à travers la membrane interne sans passer par la F₀/F₁-ATP synthase. Cette voie alternative de retour des protons dans la matrice n'est donc pas couplée à la synthèse d'ATP (Fig. 11). Le découplage provoque une diminution du gradient électro-chimique. Par conséquent, l'activité de la chaîne respiratoire augmente afin de maintenir le potentiel membranaire et la synthèse d'ATP. Cette augmentation d'activité nécessite un apport de substrats assuré par les lipides contenus dans les gouttelettes lipidiques des adipocytes bruns. L'oxydation des acides gras fournit ainsi les co-enzymes qui alimentent la chaîne respiratoire. Cette augmentation des réactions métaboliques dans la cellule participe à la production de chaleur.

2.2/ UCP2

UCP1 est spécifique du TAB où son activité découplante est régulée. Par contre, un couplage imparfait de la phosphorylation oxydative n'est pas spécifique du TAB. En effet, l'existence d'une fuite de protons a été décrite dans les mitochondries de muscle, de thymocytes ou d'hépatocytes, entre autre (Stuart et al. 2001).

2.2.1/ La famille des UCP

L'existence d'homologues d'UCP1 était donc une hypothèse naturelle pour expliquer la fuite de protons. Les recherches ont conduit à l'identification de plusieurs gènes, parmi lesquels UCP2 et UCP3 (Fleury et al., 1997 ; Vidal-Puig et al., 1997). UCP4 (Mao et al., 1999) et BMCP1 (Sanchis et al., 1998) sont des homologues présents dans le cerveau et KMCP1 (Haguenauer et al., 2005) est exprimé dans le rein. Outre les mammifères, la famille des UCP a des représentants chez les oiseaux avUCP (Raimbault et al., 2001), chez les poissons (Stuart et al., 1999) et dans le règne végétal StUCP (Laloi et al., 1997).

Le gène Ucp2 a été cloné en 1997. Il est situé sur le chromosome 7 de la souris

et sur le chromosome 11 de l'homme dans une région liée à l'hyperinsulinémie et l'obésité (Fleury et al., 1997). UCP2 comporte 309 acides aminés pour une masse moléculaire de 33 kDa. L'homologie protéique entre UCP2 et UCP1 est de 59%. Les gènes Ucp2 et Ucp3 sont adjacents et espacés de 7 kb chez l'homme (Solanes et al., 1997 ; Pecqueur et al., 1999). UCP3 présente 72% de similarité avec UCP2 et 57% avec UCP1. Elle est exprimée dans le muscle squelettique chez l'homme et le TAB (Vidal-Puig et al., 1997; Ricquier et Bouillaud., 2000 ; annexe 1).

2.2.2/ La distribution et la régulation de l'expression d'UCP2

2.2.2.1/ Distribution

La présence de l'ARNm et de la protéine UCP1 est restreinte au TAB, contrairement à UCP2 dont l'ARNm est ubiquitaire. Quant à la protéine, son expression tissulaire est plus variable. En effet, UCP2 n'est détectée que dans certains tissus, ceux exprimant fortement l'ARNm, comme la rate, le poumon, l'intestin, l'estomac et le tissu adipeux blanc (Pecqueur et al., 2001). Pour ce qui est des autres organes où l'ARNm est moins abondant, la protéine n'est pas exprimée ou non détectable comme dans le foie ou le rein (Pecqueur et al., 2001).

Au niveau cellulaire, UCP2 a été mis en évidence dans les cellules β -pancréatiques, mais aussi dans les macrophages (Pecqueur et al. 2001, Kizaki et al., 2002).

2.2.2.2/ Régulation

Une stimulation par le LPS ou un jeûne induisent la protéine UCP2 respectivement dans le poumon et l'intestin, et ce sans augmentation de l'ARNm (Pecqueur et al., 2001). Ceci témoigne d'une forte régulation traductionnelle. En fait, l'étude de l'ARNm a montré une longue région 5' non traduite qui inhibe la phase ouverte de lecture (ORF) codant pour UCP2 (Pecqueur et al., 2001 ; Hurtaud et al., 2006).

2.2.3/ L'activité physiologique

La forte homologie entre UCP1 et UCP2 laissait penser à une activité biochimique similaire. Cependant, les recherches ont abouti à des implications physiologiques éloignées du rôle d'UCP1 et de la thermogenèse.

2.2.3.1/ La sécrétion d'insuline

La surexpression d'UCP2 dans des îlots de Langerhans du pancréas de rats inhibe la sécrétion d'insuline en réponse au glucose sans modifier le contenu en insuline des îlots (Chan et al., 1999). Ce rôle d'UCP2 sur la production d'insuline est confirmé par l'analyse des îlots des souris Ucp2-KO. En effet, ces îlots ont une meilleure capacité à sécréter de l'insuline en réponse au glucose (Zhang et al. 2001). Ces observations *ex vivo* sur le contrôle de la sécrétion d'insuline sont confirmées *in vivo* puisque les souris Ucp2-KO sont hypo-glycémiques et hyper-glycémiques en phase post-prandiale (Zhang et al., 2001). D'autre part, chez les souris obèse ob/ob, l'inactivation d'Ucp2 corrige leur hyperglycémie grâce à une augmentation de la production d'insuline (Zhang et al., 2001). Plus récemment, il a été montré que la modulation de l'expression ou de l'activité d'UCP2 permettait de modifier la sécrétion d'insuline *in vitro* et *in vivo* (Bordone et al., 2006 ; Zhang et al. 2006 ; De Sousa et al., 2007). Ces publications suggèrent ainsi un rôle potentiel d'UCP2 dans le diabète de type 2.

A l'inverse, d'autres études sont en contradiction directe avec les publications précédemment citées. Les souris qui surexpriment UCP2 spécifiquement dans les cellules β -pancréatiques ont une glycémie et une insulïnémie normale (Produit-Zengaffinen et al., 2007). Dans cette publication, les îlots de ces souris ainsi que des cellules INS-1 surexprimant UCP2 ont une production d'insuline en réponse au glucose similaire aux sauvages (Produit-Zengaffinen et al., 2007). Dans une autre étude la surexpression d'UCP2 dans les îlots favorisent la sécrétion d'insuline (Wang et al., 1999). Dans notre laboratoire et nos conditions d'élevage, aucune des mesures de glycémie post-prandiale effectuées n'a pu mettre en évidence de différence entre les souris sauvages et les souris Ucp2-KO.

Néanmoins chez l'homme, il existe toute une littérature de l'influence d'UCP2 sur le diabète de type 2 basée sur des études génétiques. En effet, il existe différents polymorphismes affectant le niveau d'expression d'UCP2. L'un d'eux est le polymorphisme -866G/A (Esterbauer et al., 2001). L'allèle A est associé à une augmentation de l'ARNm d'UCP2 et l'allèle G à une diminution (Krempler et al. 2002; Sasahara et al., 2004). Les îlots de personnes saines porteurs de l'allèle A (plus forte expression d'UCP2) sécrètent moins d'insuline que les porteurs de l'allèle G (Sesti et al., 2003). Un risque accru de développer un diabète de type 2 ou des complications dues au diabète a été rapporté pour les porteurs de l'allèle A (D'Adamo et al., 2004 ;

Gable et al., 2006 ; Sasahara et al., 2004 ; Yamasaki et al., 2006).

2.2.3.2/ L'immunité

Loin de l'endocrinologie et de la sécrétion d'insuline, UCP2 a également été impliquée dans la réponse immunitaire.

Lors d'une infection par le toxoplasme (*Toxoplasma gondii*), les souris sauvages succombent en trois semaines, tandis que les souris Ucp2-KO survivent à l'infection (Arsenijevic et al., 2000). Cette meilleure microbicité *in vitro* des macrophages Ucp2-KO a été attribuée à une production accrue de ROS (Arsenijevic et al., 2000). L'implication d'UCP2 dans la production de ROS est confirmée par l'étude de macrophages surexprimant UCP2 (Kizaki et al., 2002 ; Ryu et al., 2004). Dans l'étude de Kizaki et al, la présence d'UCP2 est également associée à une diminution de l'induction de la NO synthase inductible (Kizaki et al., 2002). Ce contrôle des ROS par UCP2 est aussi observé dans les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Vogler et al., 2006). Par ailleurs, l'expression d'UCP2 a été associée à une diminution de la production de cytokines en réponse à une injection de LPS (Horvath et al., 2003) et à une diminution de la capacité de migration des macrophages (Ryu et al., 2004).

Dans le modèle murin de la sclérose en plaque, une maladie inflammatoire : l'encéphalo-myélite autoimmune expérimentale (EAE), les souris Ucp2-KO développent des scores cliniques plus sévères que les sauvages (Vogler et al., 2006). L'analyse des lymphocytes T montrent que les cellules Ucp2-KO prolifèrent, s'infiltrent et produisent plus de cytokines inflammatoires que les sauvages. De même, la réponse des lymphocytes B est également plus forte chez les souris Ucp2-KO (Vogler et al., 2006).

Dans un autre modèle de maladie inflammatoire chronique, l'athérosclérose, les plaques d'athéromes développées par les souris Ucp2-KO sont plus larges et plus instables que celles des souris sauvages. Une accumulation plus importante de macrophages est observée au sein des plaques des souris Ucp2-KO, ainsi qu'un stress oxydatif plus élevé (Blanc et al., 2003).

Ces études montrent un rôle de régulation négative d'UCP2 sur la réponse immunitaire, en particulier dans les macrophages.

2.2.3.3/ L'activité neuronale

Un troisième domaine d'intérêt est le fonctionnement neuronal.

L'étude des souris Ucp2-KO et sauvages a mis en évidence qu'un rôle découplant d'UCP2 dans le noyau arqué de l'hypothalamus serait essentiel dans le maintien de l'appétit en situation de jeûne (Coppola et al., 2007). D'autre part, la surexpression d'UCP2 spécifiquement dans les neurones à hypocrotine de l'hypothalamus augmente la température de ces cellules. Cette augmentation locale conduit à une diminution de la température corporelle des souris, prolongeant ainsi leur durée de vie (Conti et al., 2006).

Le contrôle d'UCP2 sur la production de ROS a également été impliquée dans le cerveau. Ainsi, UCP2 protège de la mort cellulaire induite par un stress oxydatif *in vitro* et *in vivo* (Diano et al., 2003 ; Andrews et al., 2005) ou dans des expériences d'ischémie cérébrale (Mattiasson et al., 2003).

2.2.4/ L'activité biochimique

Nous avons vu qu'UCP2 est impliquée dans des cellules et des situations physiologiques extrêmement variables. Néanmoins, nous pouvons postuler que le mécanisme biochimique sous-jacent à ces différentes activités est identique, quel que soit le type cellulaire.

2.2.4.1/ Le découplage

La découverte d'UCP2 provient de la recherche d'homologues d'UCP1, pouvant expliquer le découplage observé dans les tissus autres que le TAB. Une activité de découplage de la respiration a ainsi été observée dans les premières expériences utilisant des systèmes d'expression recombinante comme les levures (Fleury et al., 1997 ; Rial et al., 1999). Cette activité découplante a été confirmée en comparant les mitochondries isolées de tissus de souris Ucp2-KO et sauvages (Echtay et al., 2002 ; Krauss et al., 2003) ou dans des cellules entières comme les thymocytes et les cellules β -pancréatiques (Zhang et al., 2001 ; Krauss et al., 2002 ; Zhang et al., 2006). Le découplage serait activable en réponse au ROS (Echtay et al., 2002 ; Krauss et al., 2003 ; Zhang et al., 2006) et inhibable par la génipine, molécule issue d'une plante de la médecine chinoise (Zhang et al., 2006).

Une activité découplante permet d'expliquer le phénotype thermogénique (Conti et al., 2006 ; Coppola et al., 2007), les différences de production de ROS (Arsenijevic et

al., 2000 ; Kizaki et al., 2002 ; Vogler et al., 2006) mais aussi la modification de la sécrétion d'insuline. En effet, la sécrétion d'insuline est contrôlée par le rapport ATP/ADP dans les cellules β -pancréatiques. Ainsi, une activité découplante d'UCP2 pourrait diminuer le rapport ATP/ADP et limiter la sécrétion d'insuline (Chan et al., 2001 ; Zhang et al., 2001 ; Zhang et al. 2006).

Cependant, ces résultats sont fortement controversés. En effet, certaines expériences n'ont pas pu être reproduites comme pour le rapport ATP/ADP dans les cellules β (Produit-Zengaffinen et al., 2006) et le découplage sur mitochondries isolées à partir de rate de souris Ucp2-KO et sauvages (Couplan et al., 2002). Par ailleurs, l'activité découplante décrite dans le rein (Krauss et al., 2003) est pour le moins étrange puisque la protéine n'y est pas détectable (Pecqueur et al., 2001 ; Couplan et al., 2002). D'autre part, deux résidus histidine (His-145 et His-147) essentiels à l'activité protonophore d'UCP1 (Bienengraeber et al., 1998) n'existent pas dans UCP2.

Un autre argument en défaveur du découplage est le biais introduit lors des expériences de sur-expression d'UCP2 dans les levures et les bactéries (Fleury et al., 1997 ; Rial et al., 1999 ; Jaburek et al., 1999). En effet, dans ces conditions, UCP2 est très fortement exprimée, à des niveaux qu'on ne retrouve pas physiologiquement. Il faut préciser ici que le niveau d'UCP2 dans le tissu où il est le plus exprimé (la rate) est 100 fois plus faible que celui d'UCP1 dans le TAB (Pecqueur et al., 2001). Il en est de même dans la plupart des études de surexpression d'UCP2 dans les cellules β -pancréatiques (Wang et al., 1999 ; Suh et al., 2004). D'autre part, un artefact de sur-expression a été particulièrement décrit dans le cas d'UCP3 (Harper et al., 2002) où la renaturation de la protéine est incorrecte, introduisant un biais expérimental qui résulte en une activité découplante d'UCP3. De la même manière, les résultats de sur-expression obtenus dans le cadre d'UCP2 peuvent être sujets à un artefact expérimental, ne renseignant que peu sur la nature réelle de l'activité physiologique. Par ailleurs, tous les membres de la famille des transporteurs mitochondriaux sont capables de découpler dans des conditions de sur-expression. L'activité découplante de l'échangeur ADP/ATP quand il est sur-exprimé est connue depuis bientôt 15 ans (Brustovetsky et Klingenberg, 1994), c'est-à-dire avant même la découverte d'UCP2. La fonction découplante d'UCP2 est donc encore très débattue.

L'activité biochimique d'UCP1 est le transport de protons. Cependant, dans certaines conditions *in vitro*, elle est également capable de transporter d'autres molécules telles que le pyruvate et l'ion chlorure (Jezek et al., 1990 ; Nicholls, 1979).

Ainsi, une activité biochimique d'UCP2 pourrait certes être un découplage dans certains cas, mais n'est probablement pas sa fonction principale.

2.2.4.2/ Le transport de métabolites

L'homologie de séquence avec UCP1 a d'abord orienté les recherches vers le découplage. Cependant, les transporteurs mitochondriaux sont avant tout des régulateurs du métabolisme. Ainsi, UCP2 peut être impliquée dans un échange de métabolite(s) entre le cytoplasme et la matrice mitochondriale. Par conséquent, l'absence ou la surexpression d'UCP2 aurait des conséquences métaboliques pour la cellule et l'organisme. Ainsi, un rôle d'UCP2 dans la régulation de la quantité de glutathion mitochondrial a été proposé dans les macrophages après stimulation au LPS (de Bilbao et al., 2004). Par ailleurs, selon qu'il s'agisse de neurones sauvages, Ucp2-KO ou surexprimant UCP2, la présence d'UCP2 est associée à une augmentation du nombre de mitochondries (Diano et al., 2003, Andrews et al., 2005).

Un autre argument en faveur d'un transport de métabolite est la récente implication d'UCP3 dans le transport de pyruvate (Mozo et al., 2006). Plus précisément, UCP3 n'aurait pas pour fonction principale un découplage de la respiration mais l'exportation du pyruvate mitochondrial vers le cytoplasme. Cet export passif est sous le contrôle du potentiel membranaire et contribuerait à l'inhibition de la glycolyse aérobie (Mozo et al., 2006).

Au final, hormis un consensus sur le contrôle de la production de ROS, les activités biochimiques et physiologiques d'UCP2 sont pour le moins controversées.

II/ LES MACROPHAGES

1/ Généralités

La découverte des macrophages remonte aux années 1880 lorsque Mechnikoff décrivit la phagocytose. Leur nom vient du grec « makros » pour grand et « phagein » pour manger. Les macrophages constituent une famille de leucocytes mononucléaires présents dans tous les tissus de l'organisme. Ils sont issus de la différenciation d'une cellule souche hématopoïétique. Sous l'action de diverses cytokines, ce précurseur se divise puis se différencie en monocytes. Ces derniers quittent la moelle osseuse pour circuler dans le sang. Ils sont ensuite distribués aux différents tissus de l'organisme où ils se différencient en macrophages.

Selon le tissu et l'influence de l'environnement local, les macrophages résidents acquièrent des phénotypes morphologiques et fonctionnels propres au tissu (Gordon et Taylor, 2005). On peut ainsi différencier entre autres les cellules de Küpffer (foie), les macrophages alvéolaires (poumon), les ostéoclastes (os) et la microglie (cerveau). Cependant, quelle que soit leur localisation, les macrophages ont pour fonction de maintenir l'homéostasie tissulaire. Ils assurent cette fonction grâce aux multiples molécules présentes à leur surface et capables de détecter la présence de corps étrangers. Outre cette fonction de défense de l'hôte, les macrophages éliminent les cellules apoptotiques, les débris cellulaires ou divers déchets du métabolisme.

2/ L'activation

2.1/ Les molécules de surface

Les molécules à la surface des macrophages sont impliquées dans une grande variété de fonctions, telles que la reconnaissance des micro-organismes, la différenciation, la survie, la migration, la phagocytose ou encore l'activation cellulaire. Ces molécules sont nombreuses et varient en fonction de l'état d'activation du macrophage et de son environnement.

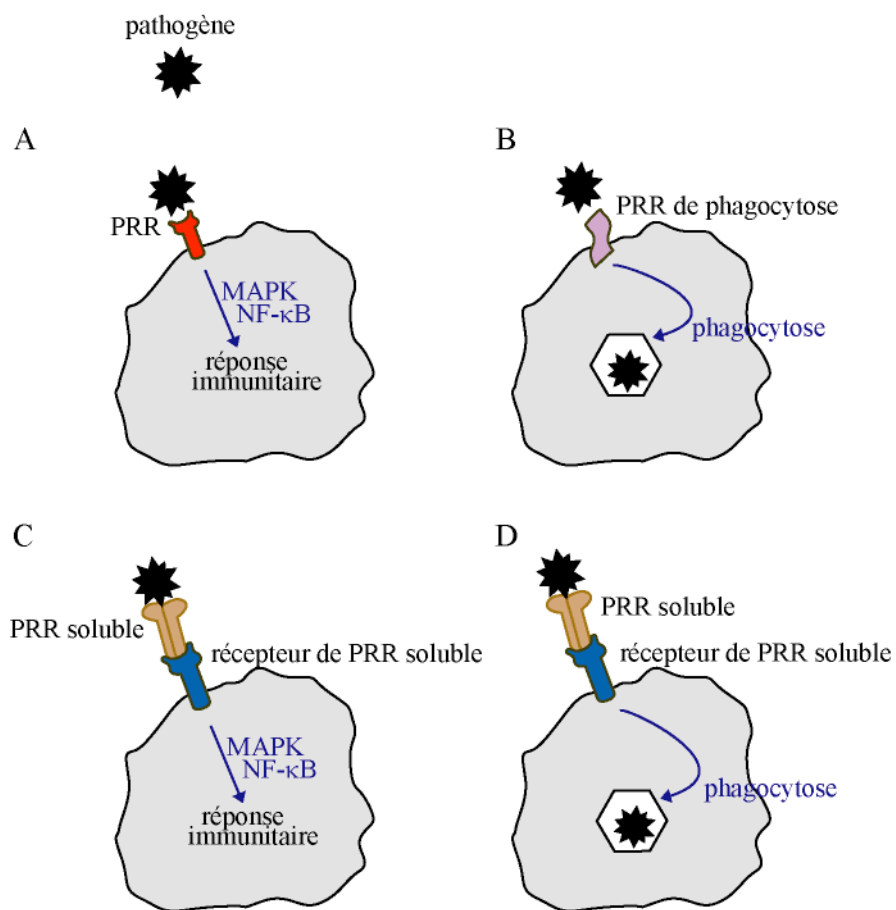


Figure 12 : Les PRR.

Les récepteurs aux PAMP peuvent :

(A) déclencher une cascade de signalisation MAPK ou NF- κ B.

(B) permettre la reconnaissance du micro-organisme et donc sa phagocytose.

Les PRR sécrétés agissent comme des protéines accessoires entre les PAMP et les PRR membranaires de signalisation (C) ou servent à opsoniser les micro-organismes (D).

2.1.1/ Pattern Recognition Receptor

La stratégie de reconnaissance de l'immunité innée est basée sur la détection de structures moléculaires conservées produites par les microbes mais pas par l'organisme hôte. Certaines voies métaboliques, uniques au métabolisme microbien, ont des rôles physiologiques essentiels. Les produits de ces voies sont communs à différentes classes de pathogènes et sont appelés PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern), c'est-à-dire des motifs moléculaires associés aux pathogènes. Les PAMP ayant des fonctions essentielles pour les micro-organismes, les pathogènes sont donc limités dans leur capacité à muter ou perdre leurs PAMP afin d'échapper au système immunitaire. Ce sont donc les cibles du système immunitaire inné et les récepteurs responsables de leur reconnaissance sont dénommés PRR (Pattern Recognition Receptor).

Les PRR peuvent être répertoriés en plusieurs catégories. Un premier groupe correspond aux PRR activant la signalisation cellulaire (Fig. 12A), c'est-à-dire des voies de signalisation de la voie MAP kinase (MAPK, Mitogen activated protein kinase) et de NF- κ B (Nuclear Factor- κ B), responsables de l'induction de gènes pro-inflammatoires. Les membres les plus connus de cette classe sont les TLR (Toll-like Receptor). Un deuxième groupe correspond aux PRR impliqués dans la phagocytose (Fig. 12B). Ils sont localisés sur la membrane plasmique et se fixent directement sur le pathogène pour initier la phagocytose. Ils peuvent être localisés sur la membrane plasmique ou bien être intracellulaires. Une dernière catégorie regroupe les PRR sécrétés. Ils servent à activer les facteurs du complément, opsoniser les micro-organismes ou agissent comme des protéines accessoires entre les PAMP et les récepteurs membranaires, induisant une signalisation intracellulaire (Fig. 12C) ou la phagocytose (Fig. 12D).

2.1.1.1/ Les lectines

Les lectines sont des protéines qui lient les sucres à la surface des micro-organismes, initiant leur phagocytose. Parmi les lectines, nous pouvons citer les récepteurs au mannose et au β -glucane (Taylor et al., 2005).

2.1.1.2/ Les récepteurs « Scavenger »

Les récepteurs « scavenger » sont des glycoprotéines capables de lier une variété de ligands microbiens tel que le LPS mais également des LDL modifiés (oxydés ou acétylés) ou des cellules apoptotiques (Taylor et al., 2005). Ces récepteurs permettent

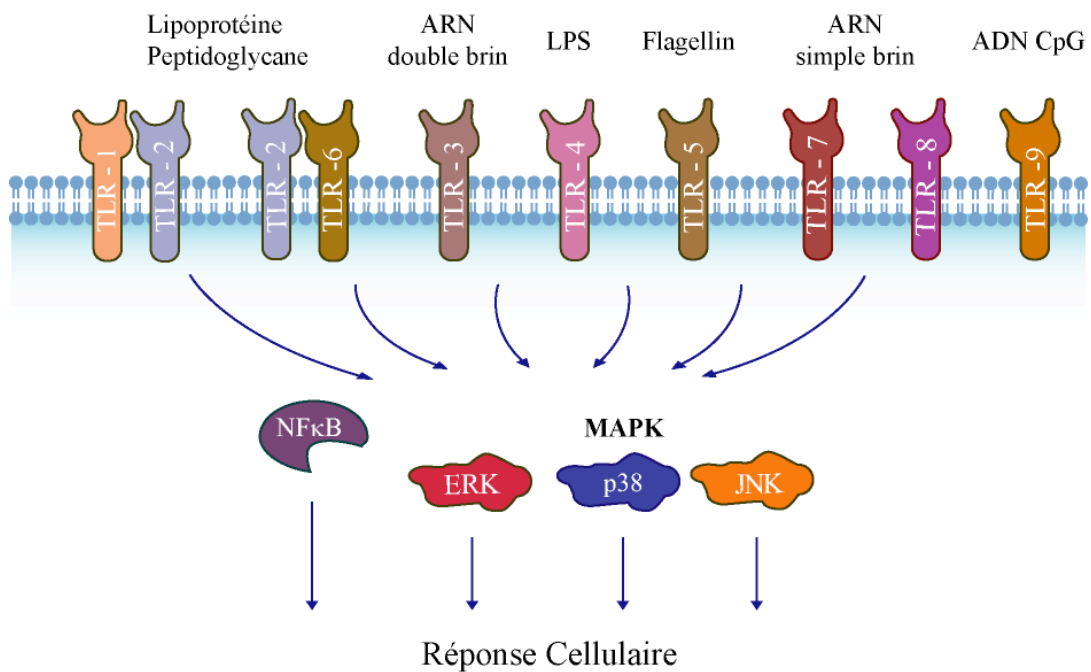


Figure 13 : Les TLR et leurs ligands

Les récepteurs Toll-like sont des récepteurs transmembranaires reconnaissant une grande variété de molécules.

ainsi au macrophage de participer à l'élimination du LPS de la circulation sanguine (Haworth et al., 1997). Par contre, leur capacité à capter les LDL modifiés peut s'avérer délétère puisque c'est un des événements précoces participant à l'élaboration de la plaque d'athérome (Suzuki et al., 1997).

2.1.1.3/ Les Toll-like Receptor et leurs ligands

Les récepteurs Toll constituent une famille de récepteurs transmembranaires dont le premier membre a été découvert chez la drosophile (Keith et Gay, 1990). Leur partie extra-cellulaire comporte de nombreuses régions riches en leucine, impliquées dans la reconnaissance du ligand. Quant à la partie intra-cellulaire, elle contient un domaine TIR (Toll/IL-1 Receptor) homologue au domaine intra-cellulaire des récepteurs de la famille de l'IL-1. La plupart des protéines contenant ce domaine TIR sont impliquées dans la défense de l'hôte aussi bien chez les animaux que chez les plantes.

A ce jour, plus d'une dizaine de TLR sont connus chez les mammifères (10 chez l'homme et 13 chez la souris) et tous sont impliqués dans l'immunité innée (Kawai et Akira, 2006). Ils diffèrent dans leur expression (par exemple, TLR-3 n'est pas exprimé dans les macrophages), leur localisation ou encore vis-à-vis de leur spécificité au ligand. Le TLR-4, récepteur au LPS, est un des membres le plus connu et étudié (Fig. 13). Les voies de signalisation contrôlées par les TLR sont présentées dans la partie 4.

2.1.2/ Les récepteurs impliqués dans la phagocytose d'éléments opsonisés

La phagocytose peut se faire soit par la reconnaissance de la cible directement par des PRR (voir ci dessus 2.1.1), soit la reconnaissance d'une cible opsonisée par des récepteurs spécifiques (Taylor et al., 2005).

Les macrophages reconnaissent les particules opsonisées, c'est-à-dire des particules recouvertes d'Ig ou de molécules du complément, grâce à leurs récepteurs au complément ou au fragment Fc des immunoglobulines. L'opsonisation a pour objectif de faciliter la phagocytose.

2.1.3/ Les récepteurs aux cytokines et aux molécules d'adhésion

Les macrophages possèdent divers récepteurs aux facteurs de croissance (comme le M-CSF ou le GM-CSF) et aux cytokines (tels IL-1, IL-6, IL-10, TNF-, IFN-),

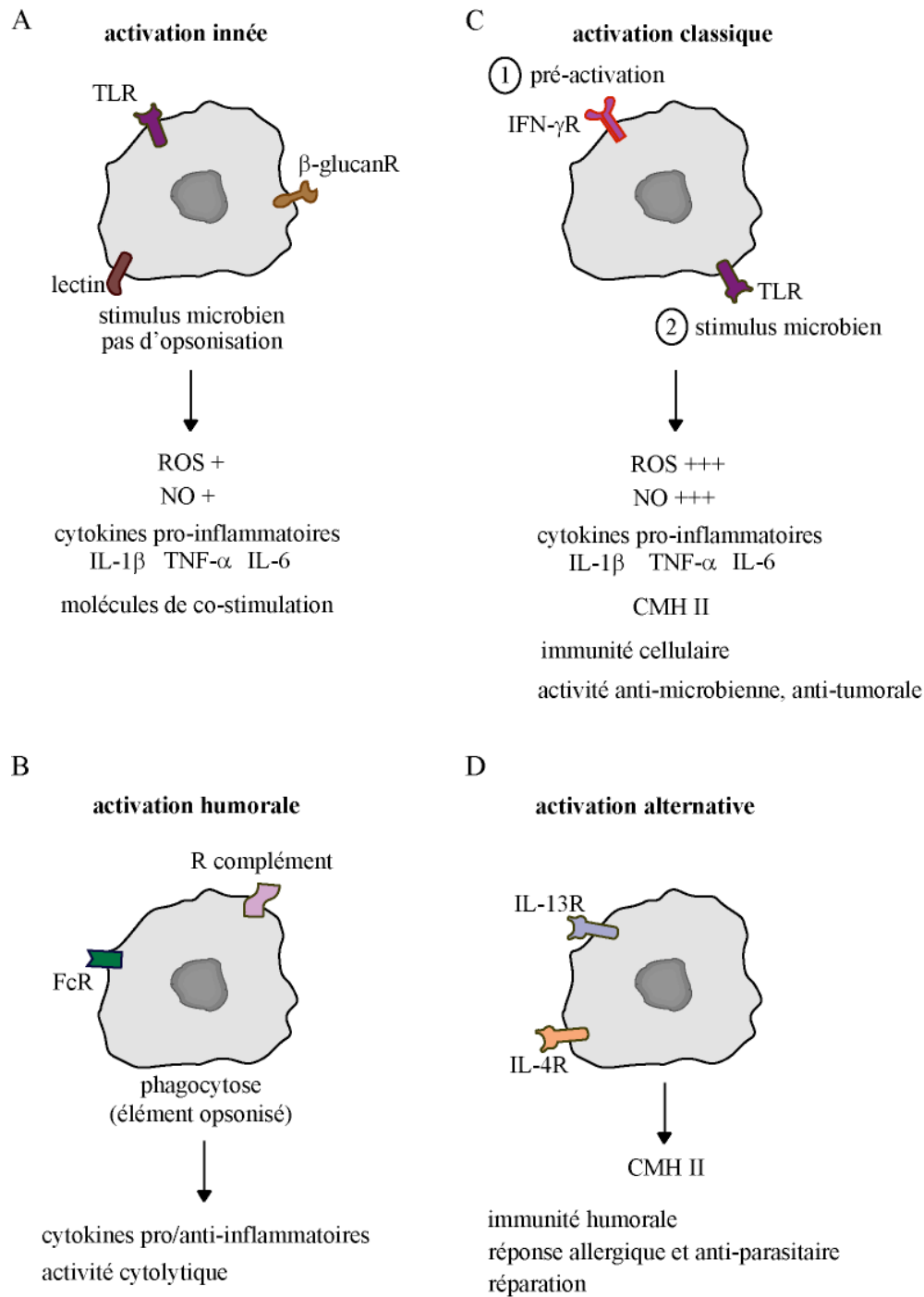


Figure 14 : Les différents modes d'activation des macrophages.

(A) Activation innée. Un stimulus microbien est reconnu par différents PRR conduisant à sa phagocytose. La signalisation qui en découle induit la production de cytokines pro-inflammatoires de ROS et de NO.

(B) Activation humorale. Lorsque la cible est opsonisée, la phagocytose est grandement facilitée.

(C) Activation classique. Le priming du macrophage par l'IFN- γ est suivi d'un stimulus microbien qui déclenche l'activation cellulaire. Dans ce cas, la réponse est beaucoup plus forte que dans l'activation innée, conduisant à une forte activité cytotoxique et la présentation de molécules du CMH de classe II.

(D) Activation alternative. L'IL-4 et l'IL-13 sont responsables de cette voie.

impliqués dans la modulation de leur activité. La présence de récepteurs aux chimiokines favorise leur migration vers le site inflammatoire.

Les intégrines et les sélectines favorisent l'adhésion des macrophages aux cellules environnantes ou à la matrice extra-cellulaire. Ainsi, ils vont permettre aux monocytes sanguins d'interagir avec les cellules endothéliales activées et favoriser leur extravasation (Muller et al., 1999). Ces molécules permettent aussi une bonne communication entre macrophages et lymphocytes lors de la présentation d'antigènes.

2.1.4/ Le complexe majeur d'histocompatibilité

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II permettent la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Le TCR (T Cell Receptor) des lymphocytes cytotoxiques reconnaît le CMH I qui présente les peptides endogènes alors que les peptides exogènes sont présentés par le CMH II aux lymphocytes T auxiliaires. Les macrophages au repos expriment peu de molécules du CMH II, mais cette expression augmente après phagocytose de produits bactériens. La présentation de ces peptides exogènes par le CMH II permet de générer une réponse immunitaire spécifique envers la cellule ou la protéine dont ils dérivent.

2.2/ Les modes d'activation du macrophage

Quatre modes d'activation du macrophage peuvent-être distingués selon les récepteurs impliqués.

2.2.1/ L'activation innée

La reconnaissance des PAMP par les PRR conduit à la phagocytose du pathogène et à une signalisation intracellulaire aboutissant à l'activation dite innée du macrophage (Fig. 14A).

2.2.2/ L'activation humorale

Lorsque la phagocytose est facilitée par l'opsonisation de la cible, il s'agit de l'activation humorale (Fig. 14B). Après la destruction du pathogène phagocyté, les macrophages présentent les antigènes microbiens aux lymphocytes via leur CMH de classe II (chapitre II.3.3/ ; Blander et Medzhitov, 2006).

2.2.3/ L'activation classique

L'activation classique est obtenue par une stimulation à l'IFN- γ suivie d'une stimulation microbienne. L'IFN- γ produite par les lymphocyte T et NK, permet une pré-activation du macrophage (ou priming) en induisant une multitude de gènes (Ramana et al., 2002). Quant au stimulus microbien (le LPS, par exemple), il déclenche l'activation à proprement parler. L'IFN- γ permet d'augmenter à la fois la sensibilité au LPS et l'intensité de la réponse. Par exemple, le LPS provoque une internalisation de son récepteur TLR-4, peu après la stimulation de la cellule. A l'inverse l'IFN- γ seul induit une augmentation de TLR-4 à la membrane et après LPS, le TLR-4 n'est pas internalisé. Ainsi la signalisation en aval est augmentée dans les macrophages pré-activés à l'IFN- γ (Bosisio et al., 2002 ; Fig. 14C).

2.2.4/ L'activation alternative

Les cytokines de type Th2, IL-4 et IL-13, contrôle l'activation alternative des macrophages (Gordon et Taylor, 2005). L'activation alternative est impliquée dans la lutte contre les parasites. Elle a également été proposée comme un mécanisme de la réponse Th2 permettant d'atténuer une réponse inflammatoire excessive et la réparation tissulaire (Fig. 14D).

3/ Les fonctions

Les macrophages participent à la réponse immunitaire innée de différentes façons. Ils sont capables de phagocyter, de produire des molécules effectrices, diverses cytokines pour le recrutement de nouvelles cellules ou la stimulation de la réparation tissulaire. Les macrophages sont aussi des cellules présentatrices d'antigène, ils jouent donc un rôle dans l'activation des lymphocytes, liant immunité innée et adaptative.

3.1/ La phagocytose

La phagocytose permet aux cellules d'ingérer des particules de plus de 0.5 μ m de diamètre. Les macrophages, phagocytes professionnels, ont pour cibles aussi bien des micro-organismes que des débris cellulaires ou des cellules modifiées (apoptotiques,

infectées, tumorales).

La phagocytose est initiée par la reconnaissance de la cible par l'intermédiaire des PPR, des récepteurs scavenger ou des lectines (Taylor et al., 2005). Il se peut également que la particule à phagocyter soit opsonisée. Dans ce cas, l'élément à phagocyter est reconnu par les récepteurs du complément des macrophages ou au fragment Fc des immunoglobulines.

L'interaction ligand/récepteur déclenche une signalisation responsable de changements dans la membrane et le cytosquelette. La membrane plasmique s'invagine et forme des pseudopodes qui fusionnent autour du micro-organisme afin de l'isoler du milieu extracellulaire à l'intérieur d'une vésicule intracellulaire, le phagosome. Par fusion successive avec des endosomes puis des lysosomes, le phagosome mature en phagolysosome. Au cours de sa maturation, le pH du phagosome diminue progressivement grâce à l'action de pompes à protons afin d'atteindre les conditions optimales pour la destruction de la particule ingérée. Ainsi, les différentes enzymes contenues dans le lysosome sont activées et l'explosion oxydative déclenchée.

La phagocytose est un phénomène très important dans l'immunité innée. Outre l'élimination du micro-organisme, elle permet l'activation du macrophage. En effet, alors que rien n'indique une participation des TLR à l'initiation de la phagocytose, ils sont tout de même recrutés à la membrane du phagosome afin d'initier un signal d'activation (Underhill et Gantner, 2004).

3.2/ Les molécules produites

L'activation du macrophage par des produits microbiens conduit à l'activation de nombreux gènes et à la production de molécules impliquées dans la réponse inflammatoire et immunitaire.

3.2.1/ Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les ROS peuvent être produits par une enzyme spécifique : la NADPH oxydase. Dans les macrophages, la NADPH oxydase des phagocytes (NOX-2) est responsable de la production d'une quantité massive de ROS appelée explosion oxydative (ou burst oxydatif) capable de tuer les micro-organismes contenus dans le phagosome. L'explosion oxydative a été mise en évidence en 1933 par Baldrige et Gerrard lorsqu'ils ont observé que les neutrophiles augmentaient leur consommation d'oxygène pendant la

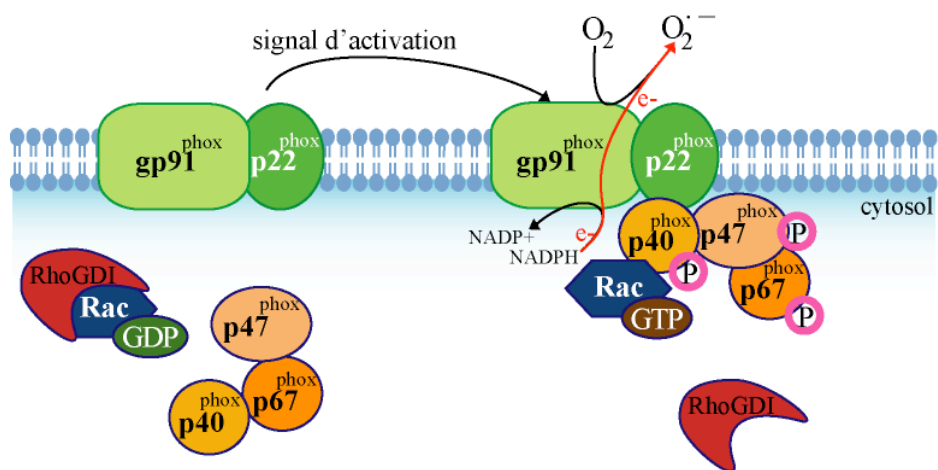


Figure 15 : La NADPH oxydase.

NOX-2, la NADPH oxydase des phagocytes est un complexe protéique. Dans la cellule au repos, NOX-2 est inactive. L'activation du macrophage provoque la phosphorylation des sous-unités cytosoliques et leur recrutement à la membrane plasmique. NOX-2 génère de fortes quantités de superoxyde au cours du burst oxydatif, permettant la destruction des pathogènes.

phagocytose de bactéries (Baldrige et Gerrard., 1933).

La NADPH oxydase est un complexe multi-protéique composé de 5 sous-unités (Fig. 15). Dans un macrophage au repos, la NADPH oxydase est inactive puisque toutes les sous-unités ne sont pas associées. Les sous-unités gp91^{phox} et p22^{phox} sont présentes dans la membrane plasmique où ils forment une flavo-hémo-protéine connue sous le nom de cytochrome b558 (Rotrosen et al., 1993). Les 3 autres sous-unités p40^{phox}, p47^{phox} et p67^{phox} constituent un complexe dans le cytosol (Wientjes et al., 1996). Les sous-unités gp91^{phox} et p22^{phox}, associées l'une à l'autre, contiennent les composants nécessaires à la production d'anion superoxide. Après stimulation du macrophage par des agents microbiens ou inflammatoires, p47^{phox} et p67^{phox} sont phosphorylées puis transloquées avec p40^{phox} à la membrane plasmique où elles s'associent au cytochrome b558 pour former la NADPH oxydase active (Heyworth et al., 1991). Outre les sous-unités cytosoliques, la petite protéine G Rac-1 (ou Rac-2 pour les neutrophiles) est requise pour l'activation de la NADPH oxydase. Au repos, celle-ci est localisée dans le cytoplasme, associée à son inhibiteur Rho GDP dissociation inhibitor (GDI).

Une déficience de l'explosion oxydative due à un défaut génétique de NOX-2 est responsable de la granulomatose chronique (Heyworth et al., 2003).

3.2.2/ Le monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote (NO) est un messager cellulaire impliqué dans divers phénomènes physiologiques et pathologiques. Il joue entre autre un rôle dans le système cardiovasculaire et la relaxation de l'endothélium (Furchgott et Zawadzki, 1980). En ce qui concerne le système nerveux central, le NO est un neuromédiateur qui agit par diffusion sur les neurones environnants. Le NO est également une molécule très importante dans la réponse immunitaire grâce à son action anti-microbienne et anti-tumorale.

Le NO est produit par la NO synthase (NOS) dont il existe trois isoformes : la NOS endothéliale (eNOS), la NOS neuronale (nNOS) et la NOS inducible (iNOS). La nNOS et la eNOS sont constitutivement exprimées dans divers types cellulaires tels que l'endothélium, les neurones mais aussi les macrophages. Ces deux isoformes sont activées en réponse au calcium. A l'inverse, l'activité de l'iNOS est calcium-indépendante (MacMicking et al., 1997) et les quantités de NO produites sont nettement supérieures.

En absence de stimulation, la iNOS n'est pas exprimée. La iNOS est induite lors

de l'activation du macrophage par différentes cytokines (TNF- α , IL-1 α , IFN- γ), par des agents microbiens (LPS) ou par un stress oxydatif. D'autres cellules induisent également la iNOS en réponse aux cytokines, telles que les cellules intestinales ou les cellules β -pancréatiques. Les mécanismes intracellulaires responsables de la synthèse de la iNOS concernent les voies MAPK et de facteurs de transcription tels que NF- κ B, ATF-2 ou encore AP-1.

Le NO est un radical fortement réactif, d'où ses propriétés anti-microbiennes et anti-tumorales. Le NO peut aussi bien endommager l'ADN qu'inhiber sa synthèse. En réagissant avec différentes enzymes ou protéines, il peut altérer le bon fonctionnement des pathogènes mais également celui de la cellule. Les altérations qu'il engendre peuvent induire l'apoptose ou la nécrose de la cellule. Ainsi, le revers de la médaille à son action anti-microbienne et anti-tumorale est une dégradation du tissu et un dysfonctionnement des organes en cas de production excessive ou incontrôlée.

3.2.3/ Les enzymes

La destruction des éléments phagocytés s'effectue grâce aux enzymes lysosomales. Ces enzymes sont des protéases, lipases, polysaccharidases ou autres desoxyribonucléases. Le plus connu est le lysozyme.

3.2.4/ Les cytokines et les facteurs de croissance

Les cytokines ont pour rôle de réguler la réponse innée et la réponse adaptative, agissant sur la prolifération, la différenciation, la migration et la fonction des cellules, mettant ainsi le macrophage au coeur de la réponse immunitaire.

Les macrophages sont la source de cytokines pro-inflammatoires extrêmement importantes : le TNF- α , l'IL-1 α/β et l'IL-6. Toutes induisent la fièvre et favorisent la production des protéines de la phase aiguë.

Le TNF- α (comme l'IL-1) augmente l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales et les leucocytes pour favoriser leur extravasation vers le site inflammatoire. D'autre part, le TNF- α et l'IL-1 participent localement à la destruction tissulaire pour faciliter le déplacement des leucocytes sur le site inflammatoire. Le TNF- α augmente aussi la capacité de phagocytose des macrophages, leur cytotoxicité et la production de différentes cytokines et chimiokines. Enfin, il peut promouvoir la réparation des vaisseaux et la coagulation. La production de TNF- α et d'IL-1 à forte

dose est fatale, responsable du choc septique. L'IL-1 et l'IL-6 favorisent l'activation et la maturation des macrophages, des cellules NK et des lymphocytes T et B.

Les macrophages produisent aussi de l'IL-12. Cette cytokine fait le lien entre l'activation des macrophages par des agents microbiens (réponse innée) et l'activation des lymphocytes Th1 (réponse adaptative). En réponse à l'IL-12, les lymphocytes T naïfs se différencient en lymphocytes Th1 producteurs d'IFN- γ . De la même manière, les cellules NK sont activées par l'IL-12 et produisent aussi l'IFN- γ . L'IFN- γ , comme nous l'avons vu au chapitre 2.2/, active les macrophages et leurs fonctions effectrices.

L'IL-10 exerce une action immuno-suppressive en inhibant l'activation des macrophages et par conséquent la production d'IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 et de TNF- α . En revanche, l'IL-10 favorise la réponse Th2 en bloquant la production d'IL-2 et d'IFN- γ par les lymphocytes Th1.

Les macrophages produisent aussi des facteurs de croissance (M-CSF, G-CSF, GM-CSF) permettant la prolifération de précurseurs hématopoïétiques.

Les chimiokines favorisent le recrutement leucocytaire. D'une part en les attirant sur le site inflammatoire grâce au gradient de chimiokines produites. D'autre part, elles stimulent l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales. Parmi les chimiokines produites par les macrophages, nous pouvons citer l'IL-8, les MCP (Monocyte Chemoattractant Protein), les MIP (Macrophage Inflammatory Protein) et l'IP-10 (Interferon-inducible Protein).

3.3/ La présentation d'antigène

Comme nous l'avons vu au chapitre 2.1.4/, les macrophages sont également des cellules présentatrices d'antigène (APC). La digestion des particules phagocytées produit une grande variété de peptides antigéniques. Combinés aux molécules du CMH de classe II, ils sont présentés aux lymphocytes auxiliaires (Th). La fonction APC des macrophages est restreinte aux lymphocytes auxiliaires et aux lymphocytes mémoires, pas aux lymphocytes naïfs. Les macrophages sont des acteurs importants dans l'amplification de la présentation d'antigènes. En effet, une fois l'antigène présenté, le lymphocyte activé va produire de l'IFN- γ . Cette cytokine va augmenter les capacités de phagocytose des macrophages ainsi que l'expression des molécules du CMH de classe II à la surface des macrophages et des cellules dendritiques. De cette manière, le nombre

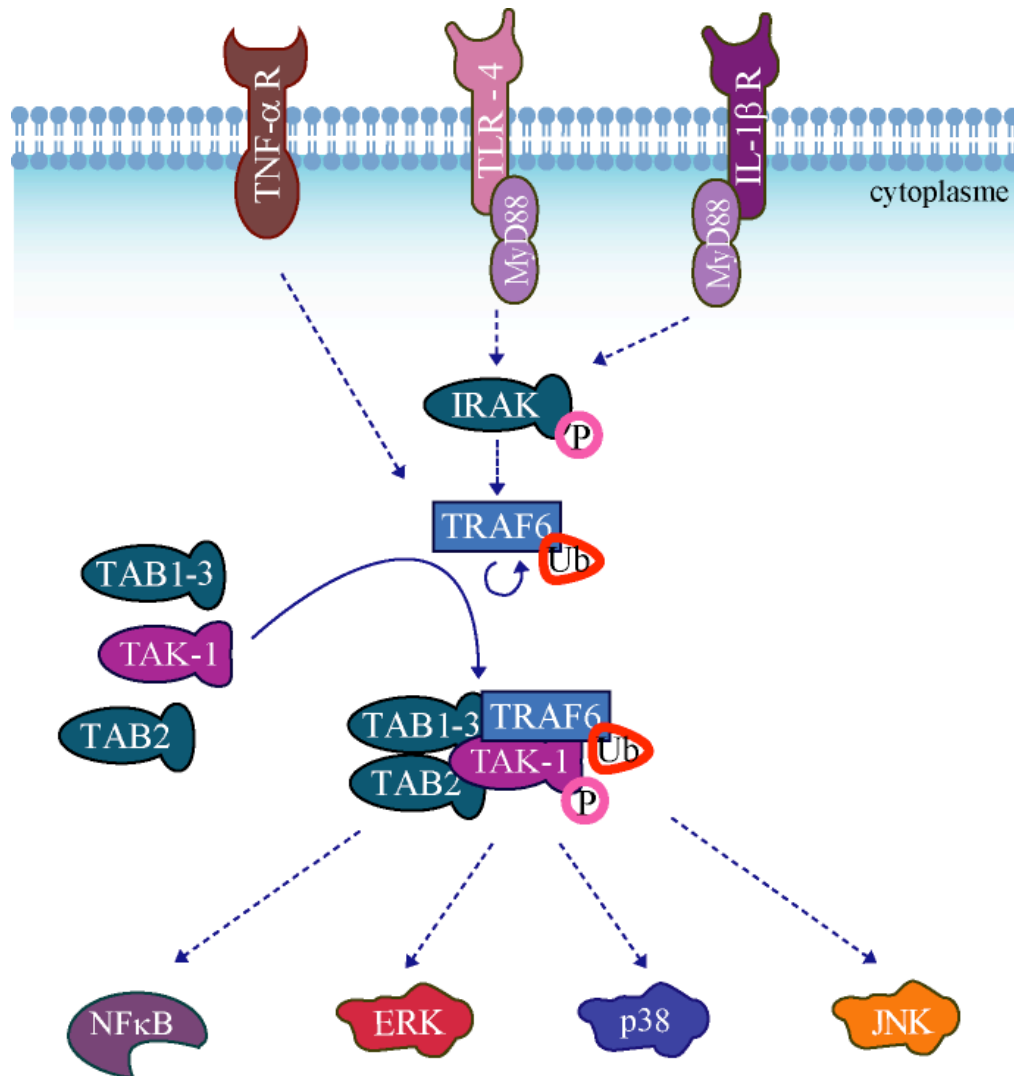


Figure 16 : La signalisation par les récepteurs TLR, IL-1 β R et TNF-R.

Lors de l'activation des macrophages, une cascade de signalisation est déclenchée. La voie commune aux récepteurs TLR et à l'IL-1 β est la voie MyD88-dépendante. TRAF-6 est un carrefour avec la voie du récepteur au TNF- α , qui est MyD88-indépendante. L'ubiquitinylation de TRAF-6 permet l'activation de TAK-1 grâce au recrutement des protéines TAB. La MAPKKK TAK-1 active les voies ERK, p38 et JNK et celle du facteur de transcription NF- κ B.

d'APC sera considérablement augmenté et la réponse adaptative d'autant plus amplifiée.

4/ La signalisation par les TLR

La signalisation des différents récepteurs est basée sur des réactions en chaîne qui aboutissent à la transcription de gènes ou à des modifications post-transcriptionnelles ou post-traductionnelles de protéines impliquées dans la réponse immunitaire.

La stimulation des TLR par leurs ligands, active des voies diverses et complexes qui sont loin d'être complètement élucidées. C'est pourquoi, ne sera présenté qu'un aspect simplifié de la signalisation, commun à tous les TLR et centré sur les éléments étudiés au cours de la thèse (Fig. 16).

Les TLR et les récepteurs de l'IL-1 partagent les mêmes acteurs pour leurs voies de signalisation intracellulaire. Ainsi, la signalisation qui découle de leur stimulation est commune et aboutit à l'activation des voies de signalisation des MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) et du facteur NF- κ B (Nuclear Factor- κ B). Plusieurs protéines sont recrutées et activées, telles que la protéine adaptatrice MyD88 (MYeloid Differentiation primary response protein 88), les sérine/thréonine kinases IRAK (IL-1 Receptor-Associated Kinase), l'ubiquitine ligase TRAF-6 (TNF Receptor-Associated Factor-6) ou la kinase TAK-1 (TGF-Activated Kinase-1) (Medzhitov et al., 1998 ; Muzio et al., 1977 ; Cao et al., 1996a ; Cao et al., 1996b ; Wang et al., 2001).

La liaison du ligand sur son récepteur provoque sa dimérisation ou son oligomérisation puis un changement conformationnel. MyD88 va interagir grâce à son domaine TIR (Toll/Interleukin-1 Receptor) avec le domaine TIR du récepteur. Ensuite, le domaine de mort de MyD88 interagit avec celui de IRAK. Le recrutement d'IRAK au récepteur entraîne son auto-phosphorylation et son détachement du récepteur. Dans le cytosol, IRAK phosphorylé active TRAF-6 qui s'auto-ubiquitinye. Son ubiquitinylation ne conduit pas à une dégradation par le protéasome. En revanche, les chaînes de poly-Ubiquitine permettent le recrutement de protéines adaptatrices TAB (TAK-1 Binding protein), nécessaires à l'activation de la MAPKKK TAK-1 (Chen, 2005). S'ensuit tout un jeu de phosphorylation aboutissant à l'activation des voies MAPK et NF- κ B (Fig. 16). Un point intéressant à signaler est que TRAF-6 constitue un carrefour entre la

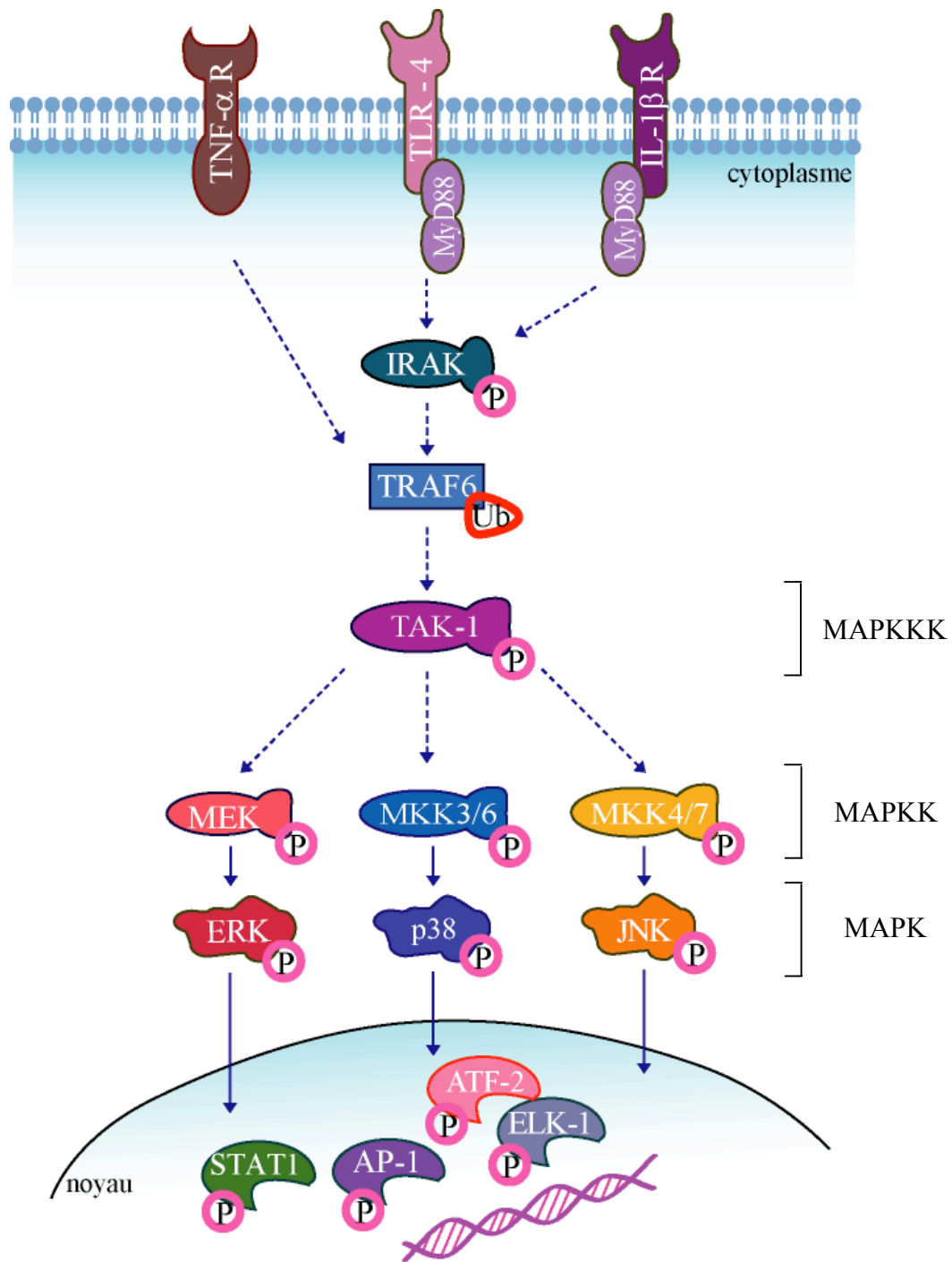


Figure 17 : Les MAPK.

Les voies MAPK sont des cascades de phosphorylation aboutissant à l'activation de plusieurs facteurs de transcription contrôlant les gènes de la réponse immune.

signalisation des TLR/IL-1R et celle de TNF-R. Il est le seul membre de la famille TRAF commun à ces voies d'activation (Cao et al., 1996).

Connaissant le déroulement de cette cascade, il est aisé de comprendre les phénotypes des souris déficientes pour ces protéines. Leurs études ont montré la suppression de l'activation des MAPK et de NF- κ B chez les souris TRAF-6-KO (Lomaga et al., 1999) en réponse à l'IL-1 β et au LPS. Il en est de même des souris TAK-1-KO en réponse à différents ligands des TLR (Sato et al., 2005, Shim et al., 2005). Dans les macrophages de souris MyD88-KO, IRAK-4-KO et IRAK-1-KO, l'activation des MAPK et de NF- κ B est fortement diminuée et retardée dans le temps (Kawai et al., 1999 ; Suzuki et al., 2002 ; Kanakaraj et al., 1998). Ces défauts ou diminutions de signalisation conduisent à une incapacité totale ou partielle des macrophages à produire des cytokines et/ou du NO (Kawai et al., 1999 ; Kanakaraj et al., 1998 ; Suzuki et al., 2002). En ce qui concerne les souris MyD88-KO, le défaut de signalisation et de production de cytokines et de NO leur permet de résister au choc septique (Kawai et al., 1999).

La signalisation décrite ici, commune à tous les TLR/IL1-R, correspond à la voie MyD88-dépendante. Néanmoins, il existe une voie indépendante de MyD88 qui est spécifiques à certains TLR mais les mécanismes sont encore mal définis (Kawai et Akira, 2006).

4.1/ Les voies MAPK

Les MAPK doivent leur nom au fait que ce sont des protéines activées par des mitogènes (Mitogen-Activated Protein Kinase). Les protéines ERK furent les premières MAPK identifiées, c'est pourquoi elles sont souvent référées comme MAPK. Depuis la mise en évidence d'autres kinases impliquées dans différentes cascades de phosphorylation, le terme MAPK sert à désigner la famille protéique.

La famille des MAPK est composée des protéines ERK (Extracellular Signal-Related Kinase), p38 et JNK (c-Jun NH₂-terminal Kinase) également appelée SAPK (Stress-Activated Protein Kinase). Chaque voie de signalisation agit selon une simple cascade, bien que cela ne soit pas toujours aussi simple, puisqu'une MAP kinase kinase kinase (MAPKKK) phosphoryle et active une kinase de MAP kinase kinase (MAPKK) qui a son tour phosphoryle et active une MAP kinase (Fig. 17). Divers signaux ou molécules contrôlent l'activation des MAPKKK mais ils restent mal identifiés. Une des

difficultés vient du fait que ces signaux varient en fonction du stimulus et du récepteur activé. Parmi ces activateurs la PKC, Ras, Raf, Rac, cdc42, Ask-1 et bien d'autres seraient impliqués. Cependant, à l'heure actuelle, le seul activateur clairement identifié et partagé par la signalisation des récepteurs aux PAMP et à l'IL-1 β , est la MAPKKK TAK-1 (Sato et al., 2005 ; Ono et Han., 2000 ; Zhang et al., 2000 ; Shim et al., 2005).

4.1.1/ La cascade ERK

Comme leur nom l'indique, la phosphorylation des ERK (Extracellular Signal-Related Kinase) est déclenchée par l'activation d'un récepteur cellulaire. Il existe cinq ERK, 1 à 5. Seul le rôle de ERK1/2 a réellement été documenté dans les macrophages. ERK1 et ERK2 sont respectivement des protéines de 44 et 42 kDa. C'est la MAPKK appelé MEK (pour MAP/ERK Kinase) qui les phosphoryle sur les résidus Tyr/Thr du motif Thr-Glu-Tyr, augmentant ainsi leur activité kinase. Plusieurs isoformes de MEK existent, cependant seules les kinases MEK1 et MEK2 ont un rôle dans la cascade ERK.

L'activation de ERK1/2 conduit à la phosphorylation de nombreux substrats qui sont aussi bien des kinases Mnk-1, Msk1/2 et p90^{Rsk} que des facteurs de transcription tels que c-Fos, c-Myc, Elk-1 ou Stat1/3 (Blanchette et al., 2003 ; McCubrey et al., 2006). Les kinases Msk1/2 et p90^{Rsk} pourront à leur tour phosphoryler d'autres facteurs de transcription comme CREB ou ATF-1 (McCubrey et al., 2006) tandis que l'activation de Mnk-1 permet la modulation de la traduction d'ARNm dans le cytoplasme (Ueda et al., 2004).

4.1.2/ La cascade p38

Le groupe p38 est composé de 4 membres qui sont $\alpha/\beta/\gamma/\delta$. p38 a initialement été décrite dans des macrophages stimulés au LPS (Han et al., 1993 ; Han et al., 1994). La phosphorylation des protéines p38 sur les résidus Tyr/Thr du motif Thr-Gly-Tyr est sous le contrôle de MKK3 et MKK6 (Wysocki et al., 1999 ; Lu et al., 1999).

L'activation de p38 conduit à la phosphorylation de kinases comme MAPKAK (MAPK-Activated Kinase) qui contrôlent l'activation de facteurs de transcription. Les protéines p38, comme ERK, contrôlent la traduction via Mnk-1. Enfin, les facteurs de transcription, tels Stat-1, p53, ATF-2, Elk-1 ou CREB sont des cibles directes de p38 (Guha et Mackman., 2001, Dong et al., 2002). p38 est également impliquée dans la maturation du phagosome (Blander et Medzhitov, 2006).

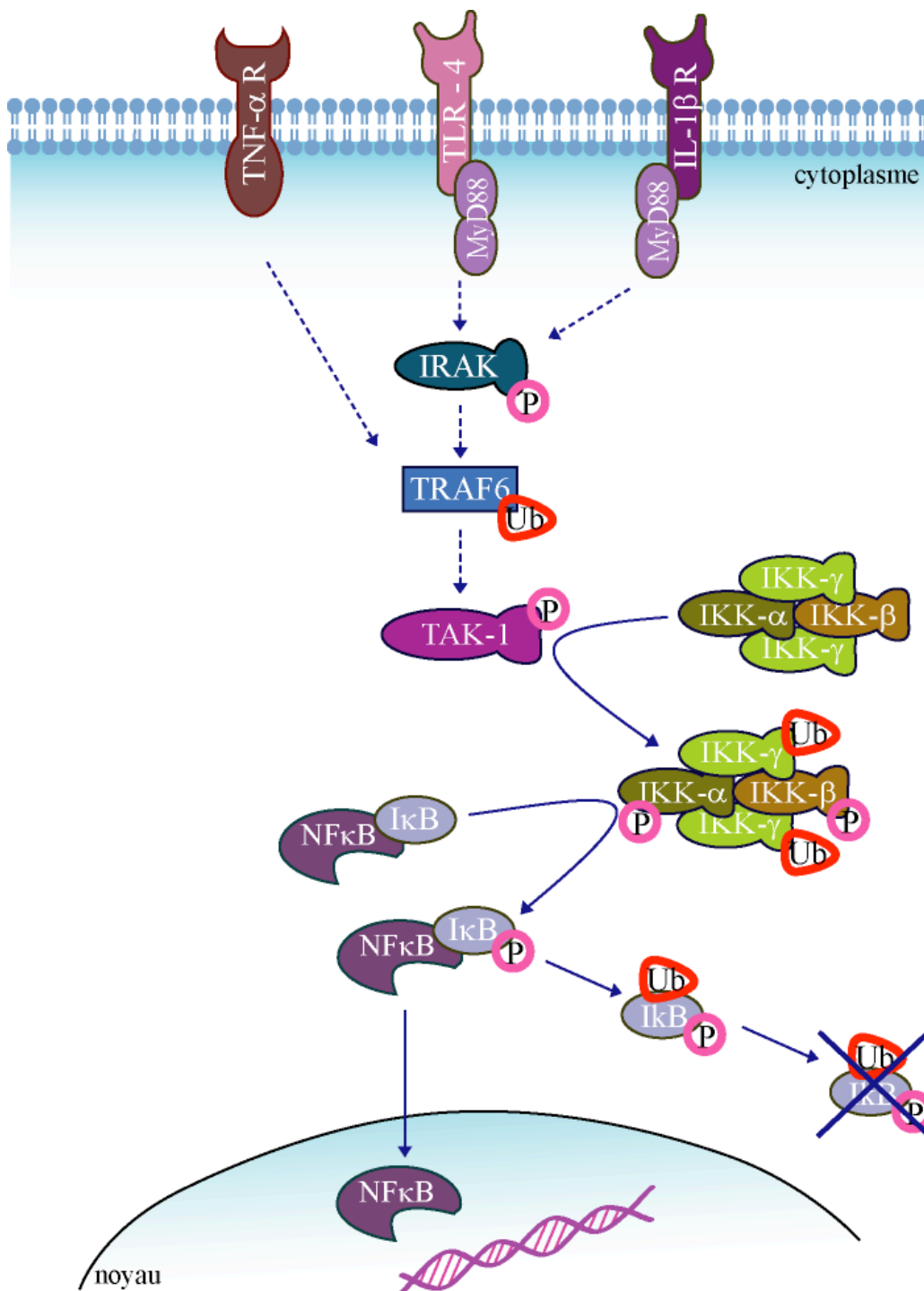


Figure 18 : NF-κB.

La voie NF-κB est inhibée par I-κB. TAK-1 active le complexe IKK, responsable de la phosphorylation d'I-κB. Ainsi, I-κB sera ubiquitinylé puis dégradé par le protéasome, libérant NF-κB. Une fois transloqué dans le noyau, NF-κB active la transcription de gènes impliqués dans la réponse immune.

4.1.3/ La cascade JNK

JNK (c-Jun NH2-terminal Kinase) tient son nom de sa fonction à phosphoryler la partie N-terminal du facteur de transcription c-jun. Il en existe deux isoformes, de 46 et 54 kDa. MEKK1/4 phosphorylent JNK sur les résidus Tyr/Thr du motif Thr-Pro-Tyr (Davis et al., 1999). La voie JNK contrôle elle aussi différents facteurs de transcription comme c-jun, ATF-2, Elk-1 ou p53 (Guha et Mackman, 2001, Dong et al., 2002).

4.2/ La voie NF- κ B

NF- κ B joue un rôle primordial dans la réponse inflammatoire et immunitaire (Fig. 18). Il a initialement été décrit dans les lymphocytes B comme un facteur important pour la transcription des chaînes légères kappa des immunoglobulines (Sen et al., 1986).

Comme c'est le cas pour de nombreux facteurs de transcription, NF- κ B appartient à une famille protéique. Chez les mammifères, elle est constituée de 5 membres NF- κ B (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB et c-Rel. NF- κ B et NF- κ B2 sont synthétisés sous forme de précurseurs qui sont respectivement p105 et p100. Une maturation post-traductionnelle aboutit à p50 et p52, les sous-unités capables de lier l'ADN.

Les 5 membres possèdent une région commune conservée de 300 acides aminés dans leur région N-terminale, signature de la famille NF- κ B, appelée domaine RHD (Rel-Homology Domain). L'importance de cette région est évidente puisqu'elle contient une séquence de localisation nucléaire et qu'elle est impliquée dans la dimérisation et la liaison à l'ADN. A l'extrémité C-terminale de RelA, RelB et c-Rel se trouve un domaine de transactivation, nécessaire pour l'activation de la transcription de gènes possédant un élément de réponse pour NF- κ B. Ce domaine de transactivation est absent de p50 et p52. Les protéines NF- κ B s'associent pour former des hétéro ou des homodimères. Les combinaisons différentes font que chaque dimère possède une capacité différente de régulation de la transcription et par conséquent des réponses biologiques propres. Les dimères contenant RelA ou RelB sont des activateurs de la transcription. A l'inverse, ne possédant pas de domaine de transactivation, les dimères composés uniquement de p50 et/ou p52 ont un rôle répressif sur la transcription. Le dimère p50/p65, association la plus connue, est appelé NF- κ B.

En l'absence de stimulation, les protéines NF- κ B sont retenues dans le cytosol sous forme inactive à cause de leur association avec I- κ B (Inhibitor of κ B) dont il existe plusieurs isoformes. Les I- κ B, inhibiteurs spécifiques de NF- κ B, se lient à leur domaine RHD, masquant ainsi la séquence de localisation nucléaire. Par conséquent, les protéines NF- κ B sont bloquées dans le cytoplasme.

La signalisation via les récepteurs TLR/IL-1 β -R/TNF-R aboutit à l'activation du complexe IKK (I- κ B Kinase). La forme classique de ce complexe comporte deux sous-unités catalytiques IKK- α et IKK- β et deux sous-unités régulatrices IKK- γ également connue sous le nom de NEMO (NF- κ B Essential Modulator).

Deux voies d'activation de NF- κ B, classique ou alternative, existent. Dans la signalisation qui nous intéresse, il s'agit de l'activation classique. Le complexe IKK activé par TAK-1 catalyse la phosphorylation de I- κ B sur les résidus Ser32 et Ser36 (Brown et al., 1995). S'ensuit une poly-ubiquitinylation des Lys21 et Lys22 d'I- κ B, servant de signal à sa dégradation par le protéasome (Scherer et al., 1995). Les dimères de NF- κ B ainsi libérés sont transloqués vers le noyau où ils activent la transcription de gènes cibles. La voie d'activation alternative est indépendante de IKK- α et β . Elle implique uniquement IKK- γ (Senftleben et al., 2001a). Son implication a été rapportée dans le développement d'organes lymphoïdes secondaires, mais pas dans la signalisation par les TLR.

L'étude des souris déficientes pour les IKK a permis de montrer l'importance du complexe IKK dans l'activation de NF- κ B. En effet, chez ces souris l'activation de NF- κ B est complètement inhibée conduisant à une sensibilité accrue aux infections (Li et al., 2000 ; Rudolph et al., 2000). Les mêmes phénotypes sont également obtenus chez les souris RelA (p65)-KO et IKK- γ -KO (Alcamo et al., 2001 ; Senftleben et al., 2001b).

4.3/ En aval des voies de signalisation

Nous avons donc vu que les MAPK et NF- κ B conduisent à l'activation de protéines et la transcription de gènes contrôlant la réponse du macrophage. Ces voies sont donc responsables des fonctions décrites dans le chapitre 3/, à savoir la production de cytokines et de chimiokines, l'expression de molécules d'adhésion ainsi que l'expression et l'activation d'enzymes (iNOS, NADPH oxydase).

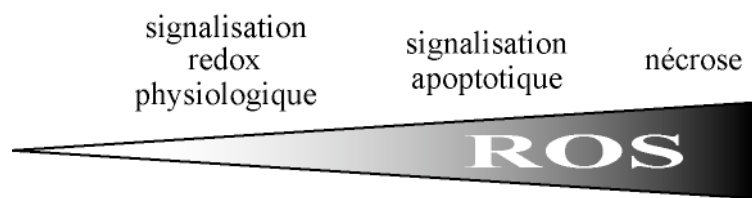


Figure 19 : L'effet biologique des ROS.

Relation entre la quantité de ROS cellulaire et les effets biologiques.

4.4/ La régulation

La réponse inflammatoire est basée sur des vagues de production de cytokines et de mécanismes de régulation permettant un contrôle étroit de l'initiation, de l'intensité et de la durée de la réponse. La régulation du signal s'effectue à plusieurs niveaux. Il peut s'agir de protéines induites ou activées par la signalisation des TLR. Par exemple, IRAK-M est une isoforme non fonctionnelle d'IRAK. Sa fixation à IRAK1/4 bloque l'activation de TRAF-6 et par conséquent la signalisation en aval (Kobayashi et al., 2002). Un autre mécanisme de régulation est l'internalisation des récepteurs membranaires après l'initiation de la signalisation. Enfin, l'intensité et la durée de l'activation des MAPK sont contrôlées par des phosphatases spécifiques, telles que les phospho-Tyr phosphatases ou les phospho-Ser/Thr phosphatases (Lang et al., 2006 ; Farooq et Zhou, 2004).

5/ Les ROS et la signalisation

5.1/ Origine

Comme cela a été précédemment décrit, les mitochondries (chapitre I/1.2) et la NADPH oxydase des phagocytes (chapitre II/3.2.1) sont des sources de production importantes de ROS. Une grande différence existe entre elles : la production mitochondriale est «involontaire», il s'agit d'électrons qui s'échappent de la chaîne respiratoire. A l'inverse, la NADPH oxydase est une enzyme dédiée spécialement à la génération de l'ion superoxyde grâce à un transport d'électrons à travers la membrane plasmique.

Il existe plusieurs isoformes de la NADPH oxydase, NOX-1/-2/-3/-4/-5/DUOX-1/-2. Ces isoformes diffèrent par leur distribution tissulaire. Comme nous l'avons déjà dit, NOX-2 est spécifique des phagocytes et représente l'unique isoforme responsable de l'explosion oxydative (chapitre II.3.2.1/). La présence des autres isoformes est variable. Par exemple, NOX-1 est exprimée dans les cellules du colon et NOX-5 par les cellules des tissus lymphoïdes. Une autre différence concerne la régulation de leur activation qui est dépendante soit du calcium intracellulaire, soit de la phosphorylation de ses sous-unités (Bedard et Krause., 2007).

Bien que les ROS soient catalogués comme principaux contributeurs aux dommages des organismes (cf Fig. 8), l'effet des ROS est fonction de la quantité produite et de la durée d'exposition (Fig. 19). Ainsi, les ROS générés par les

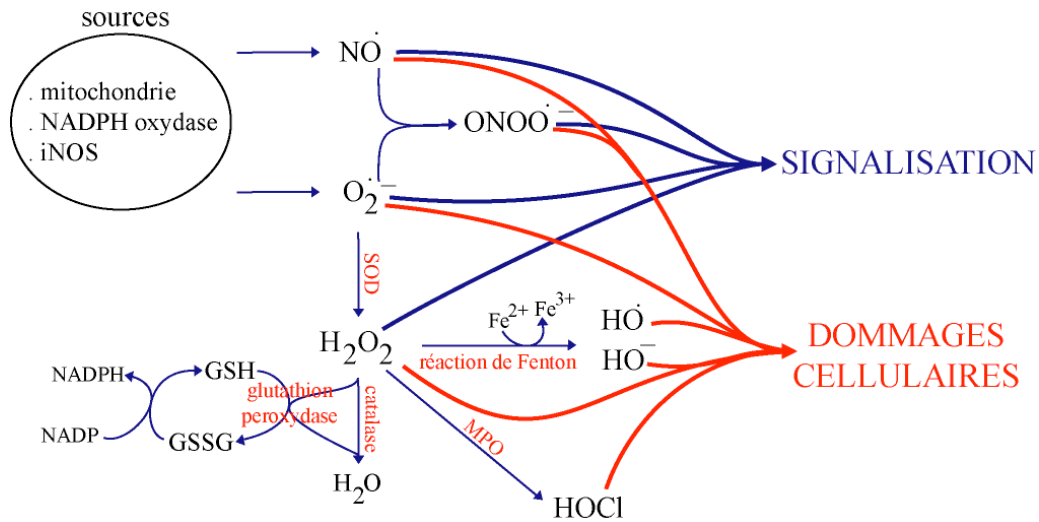


Figure 20 : Les conséquences cellulaires des ROS.

Les ROS et le NO ont des origines diverses. La quantité produite et la durée d'exposition ont un impact sur la cellule. Les réactions des ROS et du NO avec les protéines cellulaires permettent de moduler la signalisation cellulaire. Par contre, des concentrations fortes et une exposition prolongée sont responsables de dommages irréversibles, aboutissant à la mort de la cellule.

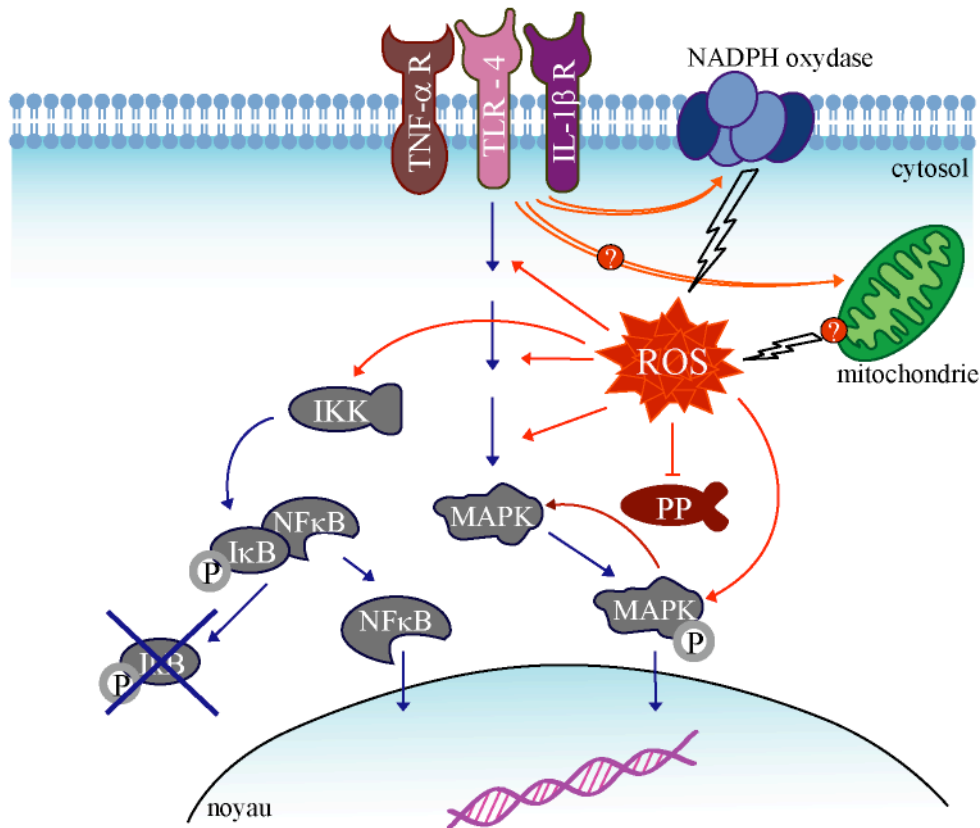


Figure 21 : La signalisation par les ROS.

L'interaction ligand-récepteur déclenche une cascade de signalisation aboutissant aux MAPK et à NF- κ B. En parallèle, il y a une légère production de ROS dont l'origine est débattue. Alors que l'implication de la NADPH oxydase ne fait pas de doute, celle de la mitochondrie n'est pas réellement démontrée. Ces ROS sont d'une importance capitale : ils agissent comme une voie de signalisation secondaire qui potentialise l'activation des MAPK et de NF- κ B.

mitochondries et les NOX jouent un rôle primordial dans les cellules, ce sont des modulateurs de la signalisation cellulaire (Fig. 20).

5.2/ Le rôle des ROS dans la signalisation cellulaire

H₂O₂ est le ROS le plus stable. Diffusant facilement à travers les membranes, il agit à l'intérieur comme à l'extérieur de la cellule ou de la mitochondrie, exposant de cette manière les cellules voisines non-productrices. Ainsi, il existe une quantité basale de ROS dans l'organisme. Celle-ci diffère en fonction des cellules ou des tissus. Par exemple, la concentration en H₂O₂ est de 35 μ M dans le plasma humain et de 100 μ M dans les urines (Halliwell et al., 2000)

Différentes conditions modifient les quantités de ROS comme les radiations UV, l'exposition aux métaux lourds ou à des toxines, l'ischémie suivie d'une reperfusion (Herrling et al., 2003 ; Leonard et al., 2004) mais aussi la fixation de ligands sur leur récepteur membranaire.

5.2.1/ La mise en évidence

Beaucoup d'études ont montré un rôle activateur des ROS sur les voies MAPK et NF- κ B et ce dans tout type cellulaire, immunitaire ou non (Gloire et al., 2006 ; McCubrey et al., 2006 ; Verweij et Gringhuis, 2002) (Fig. 21).

Ce rôle dans la signalisation est supporté par trois arguments. Tout d'abord, la fixation de tout ligand (cytokines, facteurs de croissance) sur son récepteur induit une faible production de ROS. Par exemple, c'est le cas d'EGF, PDGF, VEGF, IL-1 α , TNF- α sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins (Cakir et Ballinger, 2005) ou de l'activation du TCR dans les lymphocytes T (Kwon et al., 2003). Mais il en est de même dans les macrophages lors de la fixation du LPS sur le TLR-4, comme nous le verrons plus loin (chapitre II.5.3/).

Deuxièmement, l'ajout de ROS ou de molécules pro-oxydantes induisent l'activation des voies MAPK/NF- κ B aussi bien dans les cardiomyocytes que les hépatocytes, les astrocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les macrophages ou les lymphocytes pour ne citer que ceux-là (McCubrey et al., 2006).

Enfin, l'activation des voies de signalisation est diminuée ou même supprimée par des composés antioxydants.

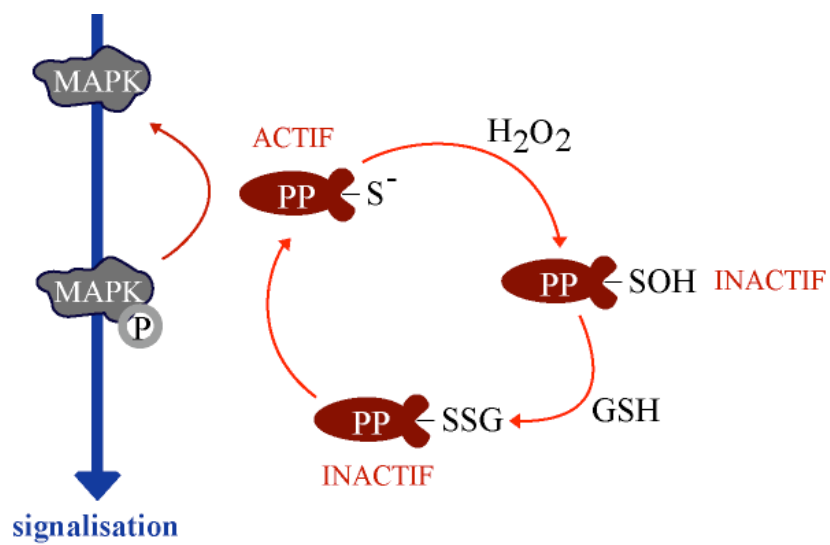


Figure 22 : L'action des ROS sur l'activité des phosphatases.

Les phosphatases sont en charge de déphosphoryler des MAPK pour arrêter la transduction du signal. Elles possèdent un résidu cystéine dans leur site actif. Celui-ci réagit avec H_2O_2 , rendant l'enzyme inactive. Le glutathion réduit facilement la phosphatase oxydée. La réaction avec une nouvelle molécule de glutathion restaure le site actif et donc la fonction de la phosphatase.

5.2.2/ Le niveau d'action

La plus connue des voies par laquelle les ROS et le NO régulent la fonction cellulaire passe par les groupements thiols des protéines. Une modification du statut redox intracellulaire conduit à la formation d'acide sulfénique au niveau des résidus cystéines ou de ponts disulfures lors d'interactions inter-protéïques ou protéine/glutathion. Cette action conduit à un changement conformationnel qui peut, par exemple, affecter l'activité enzymatique ou la capacité de fixation à l'ADN. A faible concentration de ROS, cette réaction est réversible grâce aux enzymes du système anti-oxydant. Cependant, lorsque les quantités de ROS sont trop élevées, les systèmes anti-oxydants ne sont plus suffisantes, les modifications sont dans ce cas irréversibles (cf Fig. 19).

Parmi les protéines à résidus cystéine redox-sensible, nous retrouvons des facteurs de transcription, des caspases, des phosphatases ou des petites protéines G (Nakamura et al., 1997 ; Finkel, 1998). Un exemple intéressant sont les phosphatases dont la région catalytique contient des résidus cystéine (Fig. 22). Ainsi, leur oxydation les inactivent et maintient la signalisation MAPK/NF- κ B en mode activé (Salmeen et Barford, 2005 ; Denu et Tanner, 1998). Signalons enfin que les ROS sont capables d'activer les protéines tyrosine et sérine/thréonine kinase par un processus de transactivation des récepteurs en l'absence de ligands (Chen et al., 2001a).

Ainsi, les ROS agissent tout le long de la cascade de signalisation, aussi bien au niveau des récepteurs que sur les phosphatases et les facteurs de transcription (Fig. 21-22).

5.3/ Les ROS et la signalisation dans les macrophages en réponse au LPS

La signalisation du LPS conduit à l'activation des MAPK et de NF- κ B dans les macrophages. En parallèle, une production rapide de faible quantité de ROS est observée (Ndengele et al., 2005 ; Woo et al., 2004, Ryan et al., 2004). Une stimulation des macrophages au LPS n'induit pas une explosion oxydative. La quantité de ROS produite en réponse au LPS n'est ainsi en rien comparable avec les très fortes quantités libérées lors de l'explosion oxydative.

Pour comprendre le rôle de cette production dans la signalisation de TLR-4, une stratégie employée fut l'utilisation de molécules anti-oxydantes. La plus connue est la

N-acétyl-cystéine (NAC). La NAC, précurseur du glutathion, contient un groupe thiol lui permettant de réduire les radicaux libres. Ainsi, des macrophages traités au LPS et au NAC ont une activation réduite, voire supprimée, de NF- κ B, p38 ou ERK (Victor et al., 2003 ; Ryan et al., 2004 ; Woo et al., 2004 ; Hsu et Wen, 2002). L'utilisation de la catalase, le sodium formate (pour l'hydroxyl) ou d'un mimétique de la MnSOD aboutit également aux mêmes résultats (Dokka et al., 2001 ; Ndengele et al., 2005). Bien entendu, les suppressions des voies MAPK et/ou NF- κ B provoquent une diminution de production de cytokines et de NO. Dans d'autres études, l'addition de ROS à des macrophages traités au LPS augmente leur capacité de réponse en favorisant l'activation de NF- κ B et/ou des MAPK (Lu et Wahl., 2005 ; Xiao et al., 2006).

Ces résultats proviennent d'études réalisées sur des monocytes/macrophages aussi bien humains que murins, tant dans des cultures primaires que des lignées immortalisées. Cette diversité montre bien l'étendue du rôle des ROS dans l'activation des macrophages par le LPS.

L'origine de ces ROS est également une question importante. Une multitude de publications existent sur le rôle de la NADPH oxydase dans l'activation des voies MAPK et NF- κ B par le LPS (Torres, 2003 ; Forman et Torres, 2001). Par exemple, Koay et al ont montré que l'activation de NF- κ B en réponse au LPS de macrophages p47-KO était fortement diminuée (Koay et al., 2001). Par ailleurs, une interaction entre TLR-4 et Nox-4 serait requise pour l'activation de NF- κ B (Park et al., 2004). Le DPI (diphényleneiodonium chloride), décrit comme un inhibiteur de la NADPH oxydase (Hancock et Jones, 1987), a donc souvent été utilisé pour impliquer cette enzyme dans la signalisation par les ROS. Ainsi, dans des macrophages traités au LPS, le DPI bloque l'activation de ERK et p38 (Thakur et al., 2006 ; Woo et al., 2004). Cependant, il faut savoir que le DPI est aussi un inhibiteur de la production de ROS mitochondriaux dans les monocytes/macrophages (Li et Trush, 1998). Les conclusions des études utilisant ce produit doivent donc être limitées à une participation des ROS à la signalisation et non pas étendues à leur source.

Si l'implication de la NADPH oxydase dans la production de ROS ne fait ainsi aucun doute, la mitochondrie ne doit pas être négligée comme source potentielle. Par exemple, Woo et al. ont montré une production de ROS mitochondriaux par le LPS nécessaire à l'activation de p38 (Woo et al., 2004). D'autres publications, comme celles citées précédemment qui utilisent le DPI, suggèrent aussi une participation de la

mitochondrie. Par ailleurs, la mitochondrie étant une source naturelle de ROS, son implication dans la signalisation du LPS est logiquement envisageable (Janssen-Heininger et al., 2000 ; Flohe et al., 1997, Kamata et Hirata, 1999). Cependant, l'absence d'inhibiteurs spécifiques ou de molécules de détection spécifique des ROS mitochondriaux font défaut pour une démonstration définitive.

Les organismes ont développé des systèmes de défense contre les ROS issus de leur métabolisme. Ces enzymes anti-oxydantes peuvent être considérées comme des régulateurs de la signalisation par les ROS, au même titre que les phosphatases régulent les voies MAPK.

Les ROS sont proposés avoir une double fonction : destructrice de pathogènes ou activatrice de voies de signalisation. En fait, ce sont la durée d'exposition et les quantités produites qui décident de l'effet biologique (Fig. 19). A faible dose, les ROS jouent un rôle dans la signalisation, interférant avec les voies MAPK ou NF- κ B. Néanmoins, lorsque les quantités de ROS sont trop importantes, les systèmes de défense ne sont plus capables de contrôler cette production et il en résulte des dommages cellulaires irréversibles (chapitre II.5.2.2/), comme durant l'explosion oxydative. Nous pouvons donc proposer que lorsque les ROS sont volontairement produits à des fins destructrices, une de leurs fonctions est de perturber la signalisation normale du micro-organisme en forçant une signalisation inadaptée.

III/ LE DIABÈTE DE TYPE 1

Le diabète de type 1 est une maladie inflammatoire chronique causée par la destruction sélective des cellules β pancréatiques productrices d'insuline au sein des îlots de Langerhans. Le diabète de type 1 est associé à l'apparition d'une auto-immunité humorale et cellulaire contre les îlots (Atkinson et Eisenbarth, 2001). Une déficience de la régulation immunitaire semble aussi impliquée (Mathis et Benoist, 2004). L'incidence de la maladie est très variable selon les populations. Elle varie de 0-1 pour 100000 par an dans la région Zunyi en Chine à plus de 40 pour 100000 en Finlande (Atkinson et Eisenbarth, 2001), preuve de son hétérogénéité.

Le modèle actuel du développement du diabète de type 1 consiste en plusieurs étapes. Chez des personnes pré-disposées génétiquement, se développe une auto-immunité sans symptôme, appelée phase pré-clinique. Des auto-anticorps et des lymphocytes T auto-réactifs sont observés. Finalement, se déclare un diabète clinique, caractérisé par une hyperglycémie et une destruction de 80% des cellules β .

L'origine de la maladie reste cependant inconnue. L'hypothèse privilégiée propose un facteur initial déclenchant une réaction immunitaire, responsable de la réaction auto-immune anti-cellules β . Le facteur initial est recherché dans l'environnement (infectieux ou nutritionnel) des patients développant la maladie. Cependant, à ce jour, aucun agent environnemental n'a encore été découvert.

1/ Les modèles d'étude

La compréhension de la pathologie nécessite l'étude de modèles animaux où certains aspects de la maladie sont observables.

1.1/ La souris NOD

La souris NOD (non obese diabetic) a été développée en croisant successivement la descendance d'une souris qui avait spontanément développé une cataracte. Chez ces souris, une insulite est observable dès l'âge de 4-5 semaines, suivie d'une destruction

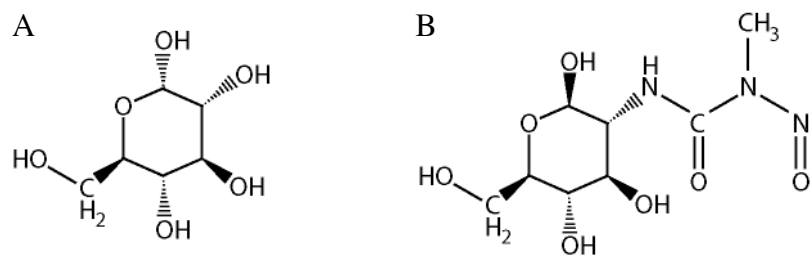


Figure 23 : La streptozotocine.

Formules développées du glucose (A) et de la streptozotocine (B).

des cellules β . Le diabète apparaît vers l'âge de 12-16 semaines. L'élevage de ces animaux dans des conditions exemptes de pathogènes augmente l'incidence de la maladie alors qu'elle diminue dans des conditions moins "stériles". D'autre part, il y a une grande différence dans l'incidence de la maladie en fonction du sexe puisqu'environ 80% des femelles développent le diabète pour seulement 30% des mâles, contrairement à l'homme.

Les études menées sur ces animaux ont permis la mise en évidence de régions génétiques associées au diabète mais aussi la compréhension de la physiopathologie.

1.2/ Le rat BB

Le rat BB (Bio-Breeding) dérive d'une lignée de rats Wistar. Il existe deux types de rats BB, les DB (Diabetes Prone) sont susceptibles de développer le diabète alors que les DR (Diabetes Resistant) sont résistants. Les rats BB-DB développent le diabète en 12 semaines et l'incidence entre les mâles et les femelles est identique. Ils partagent avec la pathologie humaine une acido-cétose, contrairement à la souris NOD. Par contre, les rats BB-DB ont une lymphopénie sévère. Ils possèdent seulement 10% du nombre normal de lymphocytes T, à l'inverse des souris NOD qui ont un système immunitaire normal. Le développement du diabète chez le rat BB-DB est également dépendant de l'état sanitaire de l'animalerie.

1.3/ La streptozotocine

Avant la découverte des modèles animaux spontanés, les modèles consistaient en l'injection de streptozotocine (STZ) à des souris normales ou à les infecter par des virus.

La streptozotocine est un antibiotique isolé à partir de *Streptomyces achromogenes* (Vavra et al., 1959). C'est une glucosamine-nitrosourée possédant une forte activité anti-néoplasique. La STZ est un analogue du glucose pour le récepteur GLUT2 (Fig. 23). Elle pénètre ainsi spécifiquement dans les cellules β où son pouvoir alkylant induit de nombreux dommages. Elle est ainsi utilisée dans le traitement des insulinomes (Brentjens et Saltz, 2001).

L'injection d'une forte et unique dose de STZ est suffisante pour induire une destruction des cellules β et donc un diabète insulino-dépendant, résultant d'effets toxiques directs.

Le modèle MLDS (Multiple Low-Dose Streptozotocin) consiste en l'injection répétées de faibles doses de STZ à des souris. Il s'agit dans ce cas d'un modèle de diabète médié par le système immunitaire, comme c'est le cas pour le diabète de type 1 humain (Like et Rossini, 1976). En effet, les souris athymiques sont résistantes au MLDS (Paik et al., 1987) et des immuno-suppresseurs bloquent le développement du diabète (Kolb et al., 1987).

2/ La génétique

L'auto-immunité contre les îlots ainsi que le diabète de type 1 se développent chez les individus génétiquement pré-disposés. 85% des nouveaux cas de diabètes sont sporadiques, c'est-à-dire que les patients n'ont pas de parents au 1^{er} degré souffrant de diabète de type 1. Cependant, les parents au 1^{er} degré de patients ont un risque accru de développer un diabète, suggérant que les facteurs génétiques sont importants dans la survenue de la maladie (Redondo et Eisenbarth, 2002).

A ce jour, seuls les gènes HLA de classe II et celui de l'insuline sont clairement identifiés comme des gènes de susceptibilité pour le diabète de type 1. Ces gènes se trouvent respectivement dans deux régions chromosomiques, IDDM1 et IDDM2 (Insulin-Dependent Diabetes Mellitus).

2.1/ Les gènes HLA – IDDM1

Chez l'homme, IDDM1 est situé sur le chromosome 6 dans la région des gènes HLA de classe II. Les gènes HLA de classe II sont supposés contribuer à hauteur de 50% du risque génétique. Ainsi, chez les caucasiens, l'auto-immunité envers les îlots et le diabète de type 1 est fortement associé aux haplotypes HLA DR3 et DR4. Un point intéressant est que certains haplotypes confèrent un risque alors que d'autres sont protecteurs (Redondo et Eisenbarth, 2002). Ainsi, moins de 1% des enfants diabétiques de type 1 portent l'haplotype DR2 (Atkinson et Eisenbarth, 2001).

2.2/ Le gène de l'insuline – IDDM2

Au sein du second locus de susceptibilité (IDDM2), se trouve le gène de l'insuline sur le chromosome 11. C'est le mini-satellite VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) situé dans le promoteur du gène de l'insuline qui contribue pour 10% de la susceptibilité (Bennett et Todd, 1996). Trois classes d'allèles VNTR peuvent être distinguées selon leur taille, les allèles de classe I (26 à 63 répétitions), les allèles de classe II (en viron 80) et les allèles de classe III (140 à 200). L'homozygotie pour les allèles de classe I pré-dispose au diabète alors que ceux de classe III confèrent un effet protecteur dominant (Redondo et Eisenbarth, 2002). La variation de la taille du VNTR de l'insuline est corrélée à l'expression de l'insuline dans le pancréas et le thymus, les allèles de classe III étant associées à une meilleure expression. Ainsi, des différences déterminées génétiquement de l'expression de l'insuline dans le thymus pourraient influencer la susceptibilité à l'auto-immunité. Une forte expression thymique conduirait à une sélection négative des lymphocytes T auto-réactifs. A l'inverse, une expression faible serait responsable d'une tolérance centrale déficiente contre l'insuline (Mathis et Benoist, 2004 ; Vafiadis et al., 1997). Il ne faut pas oublier que ce polymorphisme module également l'expression de l'insuline dans les cellules β , influençant leur fonctionnalité (Le Stunff et al., 2000).

2.3/ Les autres loci

Il existe d'autres loci de susceptibilité (IDDM 3-18), autres que les gènes HLA et de l'insuline, à avoir été associés à une risque de diabète. Cependant, ces données nécessitent confirmation. Ces loci contiennent entre autre les gènes de CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte-Associated protein 4; Nistico et al., 1996 ; Awata et al., 1998), de l'IL-12 (Morahan et al., 2001), du récepteur de l'IL-1 (Metcalfé et al., 1996) ou du récepteur de la vitamine D (Hypponen et al., 2001).

3/ La physiopathologie

Chez des personnes génétiquement pré-disposées, l'apparition d'une phase pré-clinique requiert l'exposition à un facteur environnemental déclencheur qui altère la fonction immune, initiant ainsi la destruction des cellules β . Les facteurs supposés incluent les virus (enterovirus, rubéole congénitale ; Robles et Eisenbarth, 2001), les toxines environnementales (nitrosamines ; Dahlquist, 1994) ou l'alimentation (protéines du lait de vache, céréales ; Dahlquist, 1994 ; Virtanen et al., 2000). Néanmoins, à ce jour, une forte relation n'a été observée qu'avec la rubéole (Robles et Eisenbarth, 2001).

L'activation inadéquate de la réponse immune médiée par les lymphocytes T conduit à une réponse inflammatoire dans les îlots (insulite) chez des individus susceptibles ainsi qu'à une réponse humorale (auto-antigènes).

3.1/ Les auto-antigènes

Une preuve initiale de l'auto-immunité dans le diabète de type 1 vient d'études d'immuno-fluorescence, qui ont montré la réaction entre les anticorps du sérum de patients récemment diabétiques avec des îlots pancréatiques. La recherche a abouti à la découverte de trois auto-antigènes majeurs qui sont GAD65, l'IA-2 et l'insuline.

3.1.1/ L'acide glutamique décarboxylase

Deux isoformes de l'acide glutamique décarboxylase existent. Dans l'îlot, la forme majoritaire est GAD65, protéine de 65 kDa. Sa fonction au sein de l'îlot est inconnue et son expression n'est pas spécifique aux cellules β . 60 à 70% des patients récemment diagnostiqués pour le diabète de type 1 ont des anticorps contre GAD65. Chez la souris NOD, des lymphocytes T auto-réactifs contre GAD65 sont décrits très précocément. Par ailleurs, le développement d'une tolérance envers GAD65 prévient le développement du diabète auto-immun (Kaufman et al., 1993).

3.1.2/ La tyrosine phosphatase

Le second auto-antigène, IA-2 ou ICA512 (Islet Cell Antibody 512), appartient à la famille des protéines tyrosine phosphatase. IA-2 se trouve dans les vésicules

sécrétrices des cellules endocrines et neuronales (Solimena et al., 1996) et pourrait jouer un rôle dans la sécrétion de l'insuline (Saeki et al., 2002). 60 à 70% des patients expriment également des anticorps contre IA-2 (Payton et al., 1995).

3.1.3/ L'insuline

La majorité des anticorps dirigés contre l'insuline reconnaît la chaîne B de l'insuline. 30 à 50% des jeunes diabétiques expriment des anticorps contre l'insuline (Atkinson et Eisenbarth, 2001). Comme pour GAD65, l'administration intra-thymique d'insuline dans le thymus prévient la survenue du diabète chez la souris NOD (Cetkovic-Cvlje et al., 1997).

La présence d'un ou plusieurs anticorps peut précéder l'apparition d'une phase clinique de plusieurs années. 90% des patients récemment diagnostiqués ont des anticorps contre au moins l'un de ces auto-antigènes.

3.2/ L'insulite

Une invasion des îlots par les mononucléaires lors d'une réaction inflammatoire est appelée insulite. Celle-ci peut être péri-insulaire ou invasive. Elle est composée de lymphocytes T, de macrophages, de cellules dendritiques mais rarement de lymphocytes B.

L'insulite est toujours observée avant l'apparition du diabète chez la souris NOD. Les macrophages et les cellules dendritiques y sont les premières cellules recrutées, suivis des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Cependant, l'événement initiant cette infiltration est encore inconnue.

3.3/ La destruction des cellules □

Certes les auto-anticorps ont une forte valeur prédictive, ils semblent néanmoins ne jouer qu'un rôle mineur dans la pathogenèse. Une réponse immunitaire à médiation cellulaire est privilégiée. Des cellules inflammatoires sont trouvées à l'extérieur comme à l'intérieur des îlots pancréatiques.

3.3.1/ Les lymphocytes T

La forte présence des lymphocytes T dans l'insulite et l'existence de lymphocytes T auto-réactifs placent ces cellules au cœur de la maladie. En effet, le transfert des lymphocytes de souris NOD diabétiques à des souris syngéniques induit un diabète chez toutes les souris receveuses (Christianson et al., 1993). D'autre part, une thymectomie néo-natale prévient la survenue du diabète chez les souris NOD.

Chez l'homme, la destruction des cellules β semble passer par les lymphocytes T CD8⁺, impliquant une interaction entre le lymphocyte T et la cellule β . La cytotoxicité est due à plusieurs phénomènes. Les lymphocytes T cytotoxiques sont producteurs de perforines et de granzymes qui induisent l'apoptose des cellules cibles. D'autre part, l'interaction de Fas ligand exprimé à la surface des lymphocytes avec Fas exprimé par les cellules β constitue également un signal pro-apoptotique. Enfin, la liaison du TNF membranaire des lymphocytes au récepteur au TNF- α des cellules β représente un troisième mécanisme de destruction.

La mort des cellules β est également causée par les médiateurs solubles sécrétés par les lymphocytes T CD4⁺ comme l'IFN- γ . Leur rôle est également indirect puisque l'IFN- γ active les macrophages et favorise leur production de cytokines, de NO et de ROS. L'IL-1 α et l'IFN- γ sont deux puissants signaux de mort pour les îlots. En effet, l'exposition prolongée *in vitro* d'îlots à ces cytokines provoque la mort des cellules β (Eizirik et Mandrup-Poulsen, 2001). Un des mécanismes est l'induction par la cellule β de la iNOS (Eldor et al., 2006). Ainsi, des souris transgéniques surexprimant la iNOS spécifiquement dans les cellules β développent spontanément un diabète insulino-dépendant (Takamura et al., 1998) tandis que les souris iNOS-KO sont résistantes au MLDS (Flodstrom et al., 1999). D'autre part, l'absence du récepteur à l'IL-1 α ralentit le développement de la maladie chez la souris NOD (Thomas et al., 2004).

3.3.2/ Et les macrophages ?

Outre l'importance des lymphocytes T, les macrophages jouent également un rôle crucial dans le diabète de type 1, notamment grâce à la sécrétion de cytokines (voir le paragraphe précédent) mais pas seulement.

Le recrutement des macrophages précède et est requis pour l'infiltration lymphocytaire (Hanenberget al., 1989). Chez la souris NOD, les macrophages sont impliqués dans l'initiation de l'insulite mais aussi dans la destruction des cellules β

(Jansen et al., 1994, Rosmalen et al., 2000a et 2000b). Ainsi, la déplétion des macrophages supprime le diabète dans le modèle MLDS (Kolb-Bachofen et al., 1988) et ralentit le développement de l'insulite chez la souris NOD (Papaccio et al., 1998). Plus exactement, chez la souris NOD, à cause de cette déplétion, les lymphocytes T CD8⁺ perdent leur capacité à se différencier en lymphocytes T cytotoxiques envers les cellules β (Jun et al., 1999a et 1999b). Cette observation témoigne de l'importance des macrophages dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes via leur CMH de classe II.

D'autre part, la production de ROS par les macrophages participe aux dommages contre les îlots (Horio et al., 1994). Ainsi, l'inhibition de l'activité des macrophages, incluant la production de NO, prévient la survenue du diabète à la STZ (Bleich et al., 1999 ; Takamura et al., 1999).

3.3.3/ L'organe cible

Il ne faut pas non plus oublier le rôle de l'organe cible, c'est-à-dire des cellules β , dans l'activation du système immunitaire. En effet, la destruction précoce des cellules β de souris NOD non diabétiques par un agent toxique prévient le développement de l'auto-immunité (Larger et al., 1995). Par ailleurs, des facteurs environnementaux peuvent être à l'origine de la libération d'auto-antigène des cellules β , comme c'est le cas dans le modèle MLDS. Une preuve supplémentaire est le rôle du VNTR de l'insuline dans la pré-disposition génétique.

Des facteurs génétiques ou environnementaux peuvent ainsi être à l'origine d'une expression altérée de certains auto-antigènes, résultant en une activation du système immunitaire.

BUT DU TRAVAIL

Les souris Ucp2-KO présentent des phénotypes intéressants concernant la réponse immunitaire, en particulier leurs macrophages. Ces souris Ucp2-KO sont capables de mieux éliminer le parasite *Toxoplasma gondii* grâce à une très forte production de ROS par leurs macrophages. Ce phénotype nous a conduit à étudier leur comportement suite à une infection par la bactérie *Listeria monocytogenes*.

L'importance des radicaux libres dans la signalisation en réponse au LPS est bien connue dans les macrophages. Les ROS jouent un rôle critique puisque leur blocage perturbe fortement l'activation cellulaire. Malgré certaines évidences, l'origine mitochondriale de celle-ci n'a jamais été clairement démontrée. Comme UCP2 régule la production de ROS, notamment dans les macrophages, nous nous sommes demandés si UCP2 n'était pas un régulateur de ce phénomène.

A la vue de nos résultats *in vitro* sur l'activation des macrophages Ucp2-KO et de l'implication d'UCP2 dans la sécrétion d'insuline, nous avons étudié le développement du diabète de type 1 chez les souris Ucp2-KO.

L'activité biochimique d'UCP2, c'est-à-dire son activité de transport, est fortement controversée, elle reste pour l'instant inconnue. Notre laboratoire a récemment démontré que la glutamine était un inducteur spécifique de l'expression d'UCP2. Par conséquent, l'impact de l'absence d'UCP2 sur le métabolisme de la glutamine fut recherchée en comparant les macrophages Ucp2-KO et Ucp2-WT.

Une dernière partie a concerné l'étude phylogénomique des UCP. Elle a été possible grâce à la disponibilité de génomes complets de nombreuses espèces. Une histoire de l'évolution des UCP de mammifères et aviaires est ainsi exposée.

RÉSULTATS

1/ Article 1 : The uncoupling protein 2 modulates the cytokine balance in innate immunity.

1.1/ Introduction

Mon travail de thèse a débuté avec le modèle d'infection de souris par *Listeria monocytogenes*.

Les souris Ucp2-KO étant résistantes à une infection par le parasite *T. gondii* (Arsenijevic et al., 2000), nous avons voulu étudier le comportement de ces souris envers une bactérie intra-cellulaire. Le choix s'est porté sur cette bactérie du fait de la proximité du laboratoire du Pr. X. Nassif qui étudie cette bactérie. Outre cet intérêt, l'avantage de *L. monocytogenes* est le court temps d'incubation *in vivo*. Il s'agit d'une bactérie Gram positif intracellulaire et opportuniste. *L. monocytogenes* est la seule espèce de listeria pathogène pour l'homme. Son ingestion provoque la listériose surtout chez les personnes immuno-déprimées, les femmes enceintes et les nouveaux-nés. Après ingestion, *L. monocytogenes* franchit la barrière intestinale en envahissant l'épithélium intestinal et accède aux organes internes. Lors d'une infection sévère, la barrière hémato-encéphalique est franchie et la bactérie infecte les méninges et le cerveau. Le franchissement de la barrière intestinale requiert la reconnaissance de l'intégrine A par son récepteur E-cadhérine à la surface des entérocytes. Une différence d'un seul acide aminé entre la séquence humaine et murine de la E-cadhérine est responsable de la faible efficacité d'une infection par inoculation orale chez la souris. Par conséquent la procédure utilisée chez la souris est une injection intra-veineuse de la bactérie, même si cela ne reflète pas la réalité du mode d'infection chez l'homme (Hamon et al., 2006).

Pour approfondir les connaissances sur UCP2 et la réponse immunitaire innée, nous avons étudié le comportement des souris Ucp2-KO et sauvages suite à une infection par *L. monocytogenes*.

1.2/ Manuscrit

The uncoupling protein 2 modulates the cytokine balance in innate immunity.

Rousset S.*¹, Emre Y.*¹, Join-Lambert O.², Hurtaud C.¹, Ricquier D.¹ and Cassard-Doulicier A.M.^{1,3}

Cytokine. (2006). 34, 135-42.

*These authors contributed equally to this work

¹ CNRS-UPR 9078, Faculté de Médecine Necker-Enfants Malades, 156 rue de Vaugirard, 75730 Paris Cedex 15, France.

² INSERM – U570, Faculté de Médecine Necker-Enfants Malades, 156 rue de Vaugirard, 75730 Paris Cedex 15, France.

³ present address, Institut Paris-Sud sur les cytokines, INSERM U764, 32 rue des carnets, 92140 Clamart, France. cassard.doulicier@u-psud.fr

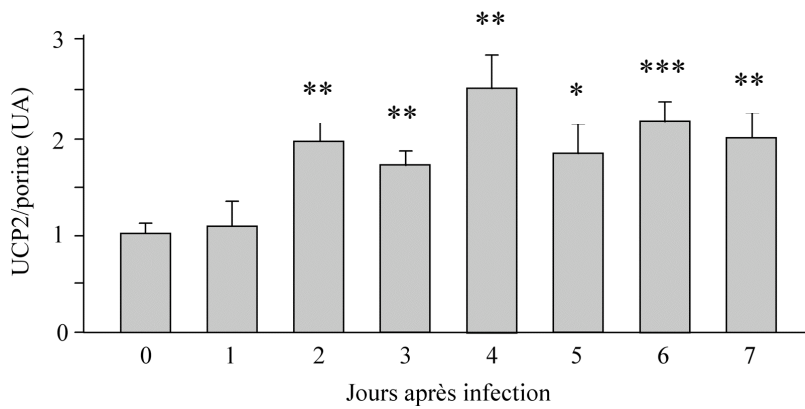


Figure 24 : L'expression d'UCP2 dans la rate après infection par *L. monocytogenes*.

Le rates de souris infectées par *L. monocytogenes* ont été prélevées et le niveau d'expression d'UCP2 dans les mitochondries a été analysé par western blot. Le signal a été normalisé à celui de la porine (n=5). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$ comparé au signal de la rate non infectée.

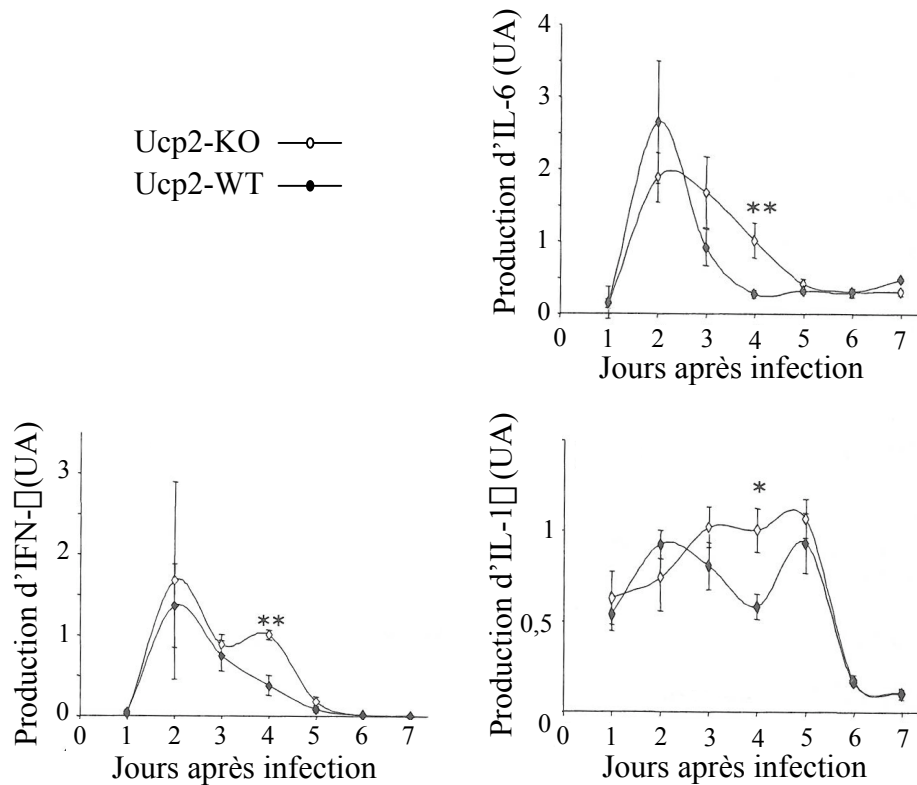


Figure 25 : La production de cytokines dans la rate après infection par *L. monocytogenes*.

La production d'IL-1 β , d'IL-6 et d'IFN- γ a été déterminée dans les homogénats de rate de souris infectées par *L. monocytogenes*. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

1.3/ Résultats complémentaires

1.3.1/ Expression d'UCP2

Une injection intra-péritonéale de LPS aux souris induit l'augmentation d'UCP2 dans différents tissus comme le poumon, la rate ou l'intestin (Pecqueur et al., 2001 ; Alces-Guerra et al., 2003). Nous avons voulu savoir ce qu'il en était après une infection par *L. monocytogenes*. Pour cela, 10^4 bactéries/souris ont été injectées à des souris (n = 5) puis sacrifiées tous les jours pendant sept jours. La figure 24 montre la modulation de l'expression de la protéine UCP2 dans la rate. Deux jours après injection, UCP2 est significativement augmentée dans la rate. Cette augmentation est corrélée à l'infiltration de monocytes/macrophages dans la rate (Fig. 3 de l'article 1).

1.3.2/ Production de cytokines

La figure 4 de l'article ne présente que la production d'IL-1 β , d'IL-6 et d'IFN- γ quatre jours après l'injection de *L. monocytogenes*. Les cinétiques de production de ces cytokines dans la rate sont présentées dans la figure 25. Ces données montrent que le pic de production est atteint en deux jours chez les souris Ucp2-KO comme chez les souris Ucp2-WT. La production des souris Ucp2-WT est rapidement diminuée. En revanche, cette diminution est plus lente chez les souris Ucp2-KO, résultant en une différence significative à J4.

1.4/ Conclusion et points de discussion

Cette étude souligne l'implication d'UCP2 dans le déroulement de la réponse immune innée. Les souris Ucp2-KO résiste mieux à une infection par *L. monocytogenes* que les souris sauvages. Ce phénotype s'accompagne d'une production accrue de cytokines et une meilleure mobilisation de cellules de l'immunité innée chez les souris Ucp2-KO.

Les résultats soulèvent également certaines interrogations. Comment expliquer que lors d'une infection *in vitro*, les macrophages Ucp2-KO éliminent 5-fois mieux *T. gondii* alors qu'aucune différence n'est observée avec *L. monocytogenes* ? De même, comment expliquer un phénotype de survie à une infection par listeria aussi discret ? Par ailleurs, les modulations de l'expression d'UCP2 dans la rate au cours de l'infection et le recrutement de cellules immunitaires permettront de discuter les modulations d'UCP2 observées *in vivo* au cours du stress inflammatoire.

2/ Article 2 : Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages.

2.1/ Introduction

Les macrophages Ucp2-KO ont une explosion oxydative plus forte suite à une infection *in vitro* par *T. gondii*, expliquant la meilleure élimination du parasite par les macrophages Ucp2-KO (Arsenijevic et al., 2000). Par la suite, il a été montré que des macrophages surexprimant UCP2 (Kizaki et al., 2002) ont une production de NO fortement diminuée par rapport aux macrophages Ucp2-WT. Nous nous sommes demandé s'il en était de même dans les macrophages Ucp2-KO ou si le contrôle de la production de NO n'était qu'un artefact de surexpression (Harper et al., 2002). La culture de macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris Ucp2-KO et Ucp2-WT a permis l'observation de phénotypes importants concernant l'activité des macrophages, comme la migration, la production de cytokines et de NO.

Au delà de cette description, une question demeurait. Comment l'absence d'une simple protéine mitochondriale peut expliquer de tels phénotypes ?

La signalisation principale induite par le LPS concerne les MAPK et NF- κ B. Une voie secondaire est enclenchée potentialisant les voies MAPK et NF- κ B, il s'agit de la voie des ROS dont l'origine mitochondriale a été proposée (chapitre III.5.3/). En se basant sur la seule partie de la littérature non controversée sur UCP2, à savoir le contrôle de la production de ROS, nous avons étudié l'influence d'UCP2 sur les ROS mitochondriaux. Ceci nous a d'une part permis de montrer que la mitochondrie participe à la signalisation par les ROS en réponse au LPS en modulant le niveau d'UCP2. D'autre part, nous avons découvert que la signalisation des voies p38 et ERK est plus rapide dans les macrophages Ucp2-KO, conduisant à une activité macrophagique plus forte.

Malheureusement, les phénotypes de la production de NO et de cytokines par les macrophages Ucp2-KO ont été publiés par un laboratoire concurrent avant la fin de ce travail (Bai et al, 2005).

2.2/ Manuscrit

**Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK
activation via uncoupling protein UCP2
in macrophages.**

Emre Y., Hurtaud C., Nübel T., Criscuolo F., Ricquier D. and Cassard-Doulier A.M*.

Biochemical Journal. (2007). 402, 271-8.

CNRS-UPR 9078, Faculté de Médecine Paris 5 Descartes-Necker, 156 rue de Vaugirard, 75730 Paris Cedex 15, France.

* present address, Institut Paris-Sud sur les cytokines, INSERM U764, 32 rue des carnets, 92140 Clamart, France. cassard.doulier@u-psud.fr

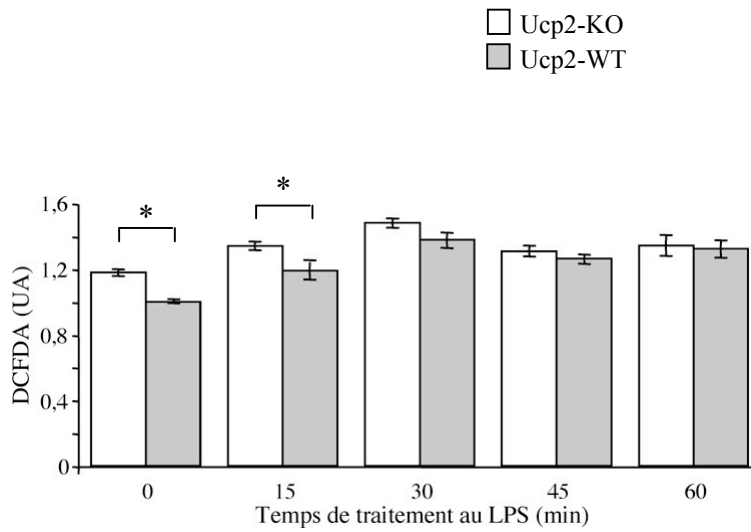


Figure 26 : La production de ROS cellulaires.

Les macrophages ont été traités au LPS (1 μ g/mL) pour les temps indiqués. Pour chaque temps, les 15 dernières minutes de traitement ont été réalisées en présence de DCFDA (5 μ M). La fluorescence a ensuite été analysée par cytométrie. *, $p < 0,05$ (n = 2).

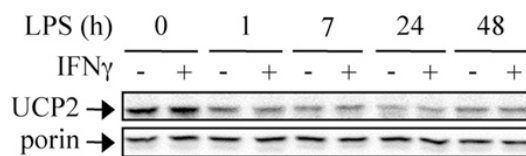


Figure 27 : L'influence de l'IFN- γ sur l'expression d'UCP2.

Les macrophages ont été traités une nuit avec de l'IFN- γ (100 U/mL) puis par le LPS (1 μ g/mL). Les mitochondries des cellules ont été extraites et le signal UCP2 a été analysé par western blot.

2.3/ Résultats complémentaires

2.3.1/ ROS cellulaires

La mesure du rapport fumarase/aconitase a révélé une différence basale de ROS mitochondriaux. Cette différence disparaît après une stimulation par le LPS. En fait, la production de ROS des mitochondries de macrophages Ucp2-WT augmente et atteint la production des mitochondries Ucp2-KO (Fig. 2 de l'article 2).

L'utilisation de la sonde DCFDA permet de détecter par cytométrie les ROS cellulaires (H₂O₂) et dans une moindre mesure le NO et HOCl (Tarpey et Fridovich, 2001), c'est à dire les productions mitochondriale et cytoplasmique. Cette méthode a permis de retrouver la différence basale de ROS obtenue en mesurant le rapport fumarase/aconitase (Fig. 2 de l'article 2). De même, après LPS, la différence de ROS entre les génotypes disparaît au niveau cellulaire (Fig. 26), comme cela était observé au niveau mitochondrial (Fig. 2 de l'article 2). Par contre, nous observons après LPS une augmentation des ROS cellulaires dans les macrophages Ucp2-KO comme Ucp2-WT alors que la production mitochondriale de ROS des macrophages Ucp2-KO (Fig. 2 de l'article 2) est inchangée. L'augmentation des ROS cellulaires reflète la production issue de la NADPH oxydase et de la mitochondrie. Ainsi, la signalisation par les ROS en réponse au LPS a pour origine la NADPH oxydase et la mitochondrie. A ces temps courts, la iNOS n'est pas encore présente. Ainsi, le signal obtenu avec le DCFDA est attribué uniquement aux ROS.

2.3.2/ Effet de l'IFN- γ ...

2.3.1.1/ ... sur l'expression d'UCP2

L'IFN- γ est un puissant médiateur de pré-activation des macrophages, responsable de l'induction et de la répression de multiples gènes (Ramana et al., 2002). Nous nous sommes donc intéressés à l'influence de l'IFN- γ sur l'expression d'UCP2. Une nuit de traitement à l'IFN- γ n'a aucune influence sur le niveau basal d'expression d'UCP2 (Fig. 27) et n'affecte pas non plus la cinétique d'inhibition de l'expression d'UCP2 en réponse au LPS (Fig. 27).

Il est également à noter que même après 48 heures de traitement par le LPS, en présence ou en l'absence d'IFN- γ le niveau d'UCP2 reste minimal. UCP2 n'est pas ré-induit *in vitro* (Fig. 27).

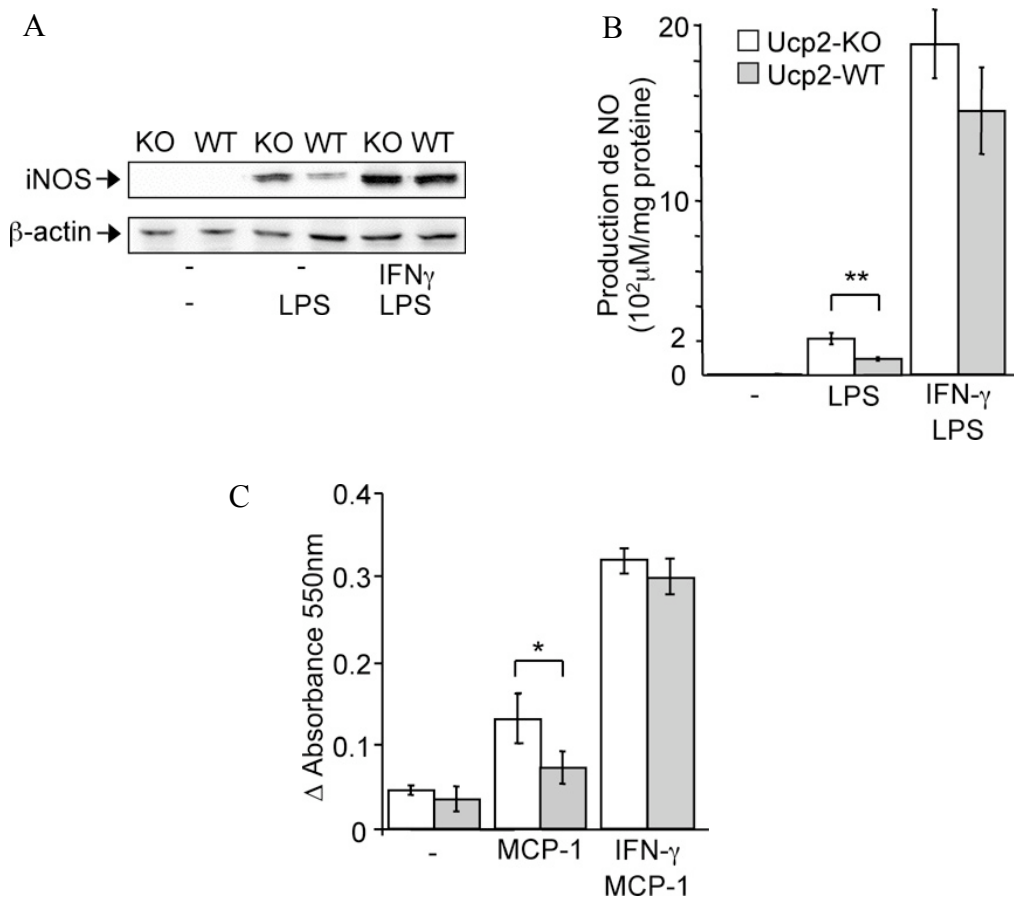


Figure 28 : L'influence de l'IFN- γ sur le phénotype des macrophages Ucp2-KO et Ucp2-WT.

Les macrophages ont été traités une nuit à l'IFN- γ (100 U/mL). Après 24 heures de stimulation par le LPS (1 μ g/mL), l'expression de la iNOS a été analysée par western blot (A) et la production de NO a été quantifiée avec le réactif de Griess (B). La migration de macrophages en réponse à MCP-1 (10 ng/mL) a été déterminée comme cela est indiqué dans l'article 2 (C).

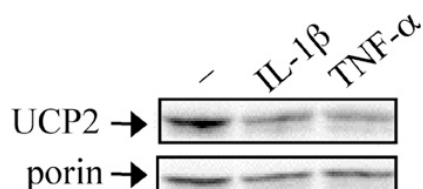


Figure 29 : L'influence du TNF- α et de l'IL-1 β sur l'expression d'UCP2.

Les macrophages ont été stimulés une heure au TNF- α (50 U/mL) ou à l'IL-1 β (50 U/mL). L'expression d'UCP2 a été analysée par western blot.

2.3.1.2/ ... sur les phénotypes Ucp2-WT/Ucp2-KO

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence d'une pré-activation à l'IFN- γ sur les phénotypes que nous avons décrits (Fig. 1 de l'article 2). L'IFN- γ gomme toutes les différences entre les macrophages Ucp2-KO et Ucp2-WT obtenus par un traitement unique au LPS (Fig. 28).

2.3.3/ TNF- α et IL-1 β

Le TNF- α et l'IL-1 β sont des cytokines qui ont la même voie de signalisation que TLR-4. Un traitement d'une heure avec ces cytokines induit également une diminution d'UCP2 (Fig. 29).

2.3.4/ Phagocytose

La phagocytose de bactéries *E. coli* inactivées et couplées au fluorochrome FITC a été évaluée au cytomètre. Les macrophages ont été incubés en présence de bactéries pendant 2 heures à des concentrations de 5 ou 20 bactéries/macrophage. A la dose de 5 bactéries/macrophage, environ 75% des macrophages ont phagocyté au moins une bactérie (Fig. 30A). Les résultats de l'incubation à une concentration de 20 bactéries/macrophage montrent que plus de 95% des macrophages ont phagocyté au moins une bactérie (Fig. 30B). Il n'y a aucune différence de phagocytose entre les macrophages Ucp2-KO et Ucp2-WT, comme c'était le cas après une infection par *T. gondii* ou *L. monocytogenes*.

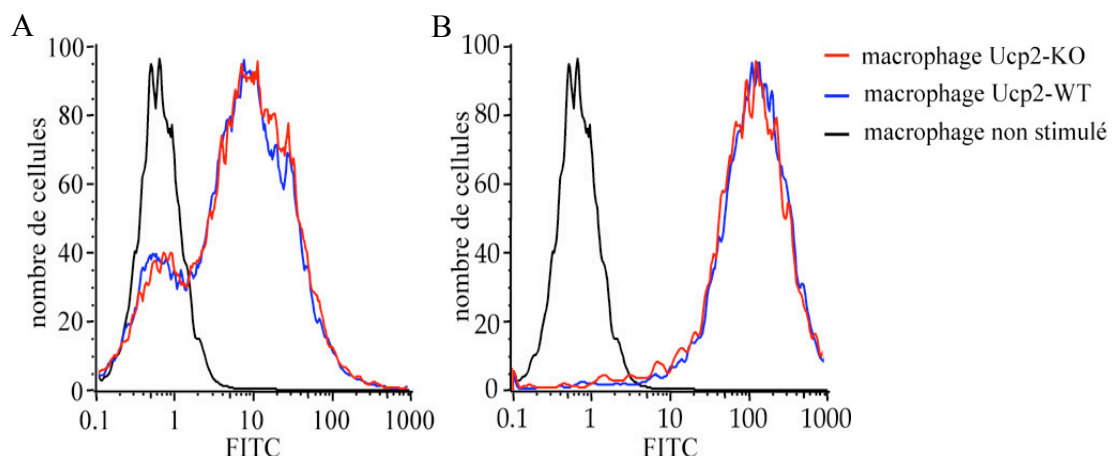


Figure 30 : La phagocytose de bactéries.

Les macrophages ont été incubés en présence de bactéries *E. coli* couplées au FITC à une concentration de 5 (A) ou 20 (B) bactéries/macrophage. Après 2 heures, la phagocytose a été mesurée au cytomètre.

2.4/ Conclusion et points de discussion

Cette étude démontre l'importance de la mitochondrie dans l'activation des macrophages. En fait, nous avons démontré qu'une partie de la signalisation par les ROS en réponse au LPS provient bien de la mitochondrie et qu'UCP2 est la protéine-clé de ce phénomène. Nous avons ainsi démontré que les macrophages Ucp2-KO ont une signalisation accrue des voies p38 et ERK après stimulation, expliquant leur plus grande capacité de migration et de production de NO et de cytokines.

Les résultats soulèvent ainsi quelques points. Quelle peut être l'activité d'UCP2 permettant d'expliquer cette production de ROS mitochondriaux ? Par ailleurs, nos résultats sont en désaccord sur certains points avec les conclusions de Bai et al., au sujet de (1) l'activation de la voie NF- κ B dans les macrophages Ucp2-KO et de (2) l'hypothétique état pré-activé des macrophages Ucp2-KO. Ces différents points seront abordés dans la discussion.

3/ Article 3 : Role of uncoupling protein UCP2 in cell-mediated immunity: how macrophage-mediated insulinitis is accelerated in a model of autoimmune diabetes

3.1/ Introduction

Nos résultats *in vitro* soulignent le rôle important d'UCP2 sur la vitesse d'activation des macrophages et leur activité. Ainsi, les macrophages Ucp2-KO ont une production accrue de NO, de certaines cytokines mais aussi une capacité de migration améliorée. Nous avons donc voulu confirmer *in vivo*, ces observations *in vitro*.

UCP2 est également présentée comme un acteur important de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose dans les cellules β -pancréatiques (Zhang et al. 2001). Le mécanisme proposé est une activité découplante d'UCP2 qui limiterait le rapport ATP/ADP. Par conséquent l'absence d'UCP2 se traduirait par une augmentation du rapport ATP/ADP et donc de la sécrétion d'insuline (Zhang et al., 2001 ; Zhang et al., 2006). Malgré les controverses concernant le contrôle par UCP2 de la sécrétion d'insuline (Produit-Zengaffinen et al., 2007), nous avons voulu étudier l'influence d'UCP2 sur une pathologie impliquant le système immunitaire et la cellule β . Notre choix s'est porté sur le diabète de type 1.

L'injection de doses multiples de streptozotocine induit un diabète auto-immun chez la souris (chapitre III.1.3/), il s'agit du modèle MLDS. Cette stratégie nous a permis de démontrer pour la première fois un rôle d'UCP2 dans le diabète de type 1.

3.2/ Manuscrit

**Role of uncoupling protein UCP2
in cell-mediated immunity:
how macrophage-mediated insulinitis is accelerated
in a model of autoimmune diabetes**

Emre Y.^{1*}, Hurtaud C.¹, Karaca M.², Nübel T.¹, Zavala F.³ and Ricquier D¹.

PNAS sous presse

¹ BIOTRAM, Université Paris 5 site Necker, CNRS UPR 9078, 156 rue de Vaugirard, 75730 Paris Cedex 15, France.

² LPPN, Université Paris 7, CNRS UMR 7059, PO Box 7126, 2, place Jussieu 75251 Paris Cedex 05, France.

³ CNRS UMR 8147, Université Paris 5 site Necker, 161 rue de Sevres, 75743 Paris Cedex 15, France.

* Corresponding author : yalinemre@gmail.com

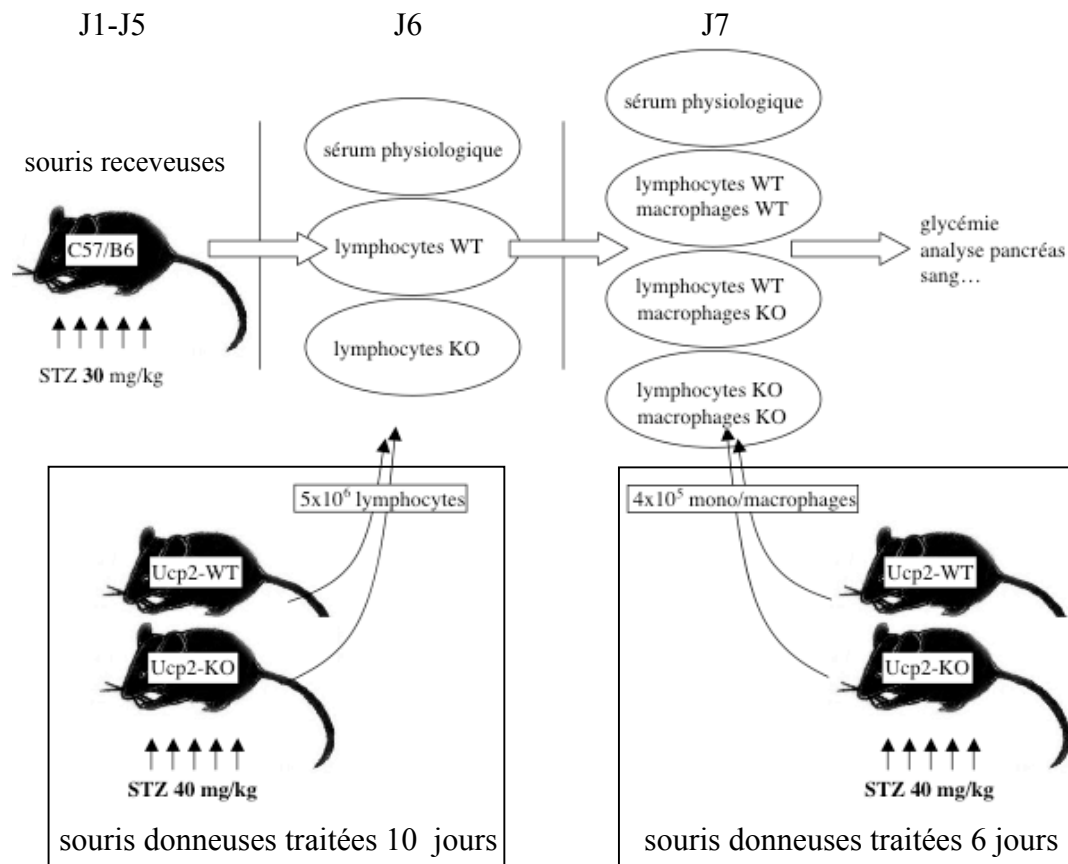


Figure 31 : Le transfert adoptif.

Les souris receveuses C57BL/6J ont reçu 5 injections de STZ (30 mg/kg). Les souris donneuses Ucp2-WT et Ucp2-KO ont reçu 5 injections de STZ (40 mg/kg). L'objectif était de sensibiliser les souris receveuses et de leur transférer les cellules pour potentialiser l'apparition du diabète.

A J6, 5×10^6 de lymphocytes par souris receveuses ont été injectées i.v.

A J7, 4×10^5 monocytes/macrophages par souris receveuses ont été injectées i.v.

Obtention des lymphocytes : après 10 jours de traitement, les souris donneuses Ucp2-KO et Ucp2-WT ont été sacrifiées et leur rate prélevée. Les lymphocytes ont été séparés par centrifugation différentielle dans du milieu lympholyte-M.

Obtention des monocytes/macrophages : après 6 jours de traitement, des souris donneuses Ucp2-KO et Ucp2-WT ont été sacrifiées et leur moelle osseuse prélevée. Une suspension cellulaire enrichie en la lignée monocytes/macrophages a été obtenue par sélection négative à l'aide de billes magnétiques couplées à un cocktail d'anticorps (anti-cd11c, anti-cd19, anti-Ter119, anti-cd4, anti-cd8 et anti-7-4).

Chaque groupe comporte 10 souris receveuses.

3.3/ Résultats complémentaires

Transfert adoptif

Nos études *ex vivo* sur les îlots de souris Ucp2-WT et Ucp2-KO ne montrent pas de différence d'induction de la iNOS, ni de mortalité cellulaire (Fig. 2 de l'article 3). De plus, nos résultats sur les macrophages (Fig. 3 de l'article 3 ; article 2) suggèrent fortement que la différence de développement du diabète chez les souris Ucp2-KO est un phénomène immunitaire.

Pour une démonstration définitive, nous avons réalisé un transfert adoptif dont la démarche est présentée dans la figure 31. Cette expérience a consisté à injecter à des souris sauvages receveuses traitées à la STZ, des lymphocytes et des macrophages isolés à partir des souris Ucp2-KO ou Ucp2-WT traitées à la STZ. L'hypothèse était que si notre phénotype résulte d'une activité accrue du système immunitaire des souris Ucp2-KO, les souris injectées avec des cellules Ucp2-KO devraient développer un diabète plus grave ou plus rapidement que les souris injectées avec des cellules Ucp2-WT.

L'expérience de transfert fut un échec. Aucune souris n'est devenue hyperglycémique y compris celles traitées uniquement à la STZ. Une première hypothèse serait que la dose de 30 mg/kg administrée aux souris receveuses est trop faible pour déclencher le diabète et que le transfert des cellules immunitaires issues de souris traitées ne suffit pas à déclencher la maladie. Une autre éventualité concerne les problèmes inhérents à l'animalerie, comme la présence d'*Helicobacter pylori* et les problèmes de température. En effet, les conditions sanitaires de l'animalerie sont déterminantes pour le développement du diabète de type 1 chez les souris NOD et les rats BB. D'autre part, à partir de J8, la température du module était descendue à 16-18°C pour une durée supérieure à une semaine, peut-être responsable de l'altération de la réponse des souris à la STZ.

3.4/ Conclusion et points de discussion

Cette étude démontre, pour la première fois, un rôle d'UCP2 dans le développement du diabète de type 1 puisque les souris Ucp2-KO ont un diabète accéléré comparé aux souris sauvages. Elle confirme ainsi *in vivo* le rôle central d'UCP2 sur l'activation et l'activité des macrophages. En effet, dans ce modèle de diabète, les

macrophages Ucp2-KO produisent plus d'IL-1 α et de NO et infiltrent en plus grand nombre les îlots de Langerhans.

Ces résultats permettent de discuter les conséquences de l'absence d'UCP2 sur le développement de pathologies en les comparant aux divers modèles infectieux ou inflammatoires précédemment utilisés. Il sera ainsi question de la vitesse de développement des pathologies ou de leur gravité. Par ailleurs, cette influence d'UCP2 sur le diabète de type 1 et l'infiltration des macrophages dans les îlots de Langerhans soulèvent des questions quant au rôle d'UCP2 dans le diabète de type 2 et des raisons de sa modulation au sein des îlots selon les modèles animaux de diabète de type 2 ou de régime alimentaire.

4/ Article 4 : Glutamine metabolism is altered in macrophages of Ucp2 knock-out mice.

4.1/ Introduction

UCP2 appartient à la famille des transporteurs de la membrane interne de la mitochondrie. Ces transporteurs sont nécessaires aux échanges de molécules entre la matrice et le cytoplasme, ce sont donc des régulateurs du métabolisme cellulaire. Ainsi, l'absence d'UCP2 devrait avoir des conséquences métaboliques pour la cellule. Certaines études montrent une activité biochimique découplante d'UCP2, résultant en une synthèse d'ATP inférieure dans les cellules Ucp2-WT par rapport aux cellules Ucp2-KO (Zhang et al., 2001 ; Krauss et al., 2002).

La glutamine est un inducteur de la protéine UCP2 dans différents types cellulaires, y compris les macrophages (Hurtaud et al., 2007). D'autre part, la glutamine est importante dans les cellules immunitaires en tant que substrat énergétique et pour son implication dans la production des ROS, de NO et de cytokines.

Nous avons voulu étudier ici les conséquences de l'absence d'UCP2 sur le métabolisme de la glutamine.

4.2/ Manuscrit

**Glutamine metabolism is altered in macrophages
of *Ucp2* knock-out mice.**

Nübel T.*, Emre Y.*, Rabier D.†, Ricquier D.*† et Bouillaud F.*¹

Manuscrit en préparation

* BIOTRAM, CNRS UPR 9078, Université René Descartes, Faculté de Médecine Necker-Enfants Malades, 156 rue de Vaugirard 75730 Paris, France.

† Laboratoire de Biochimie métabolique, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149 rue de Sèvres, 75743 PARIS CEDEX 15, France.

¹ Corresponding author bouillaud@necker.fr

4.3/ Conclusion et points de discussion

Dans cet article, nous avons montré qu'UCP2 affecte le métabolisme de la glutamine dans les macrophages. Plus précisément, la présence d'UCP2 est requise pour une oxydation correcte de la glutamine. Un autre aspect important est que nos résultats ne peuvent en aucun cas être le reflet d'une activité découplante d'UCP2.

Nos données permettent ainsi d'aborder l'activité d'UCP2 autrement que par une fonction découplante et amènent de nouvelles perspectives pour les activités des autres UCP. Par ailleurs, nous discuterons les conséquences de cette perturbation du métabolisme mitochondrial sur l'activation des macrophages et formulerons une hypothèse pour expliquer la différence de production de ROS mitochondriaux. Enfin, ce rôle dans l'oxydation de la glutamine permet également une nouvelle interprétation des modulations d'UCP2 précédemment observées chez l'animal au cours de stress inflammatoires ou infectieux.

5/ Article 5 : Avian UCP : the killjoy in the evolution of the mitochondrial uncoupling proteins

5.1/ Introduction

UCP1 a toujours été considérée comme une protéine apparue tardivement dans l'évolution (Cannon et Nerdergaard, 2004). En effet, elle est spécifique du tissu adipeux brun des mammifères où elle est responsable de la thermogénèse sans frisson. Jastroch et al. ont montré l'existence d'une UCP1-like chez les poissons (Jastroch et al., 2005), invalidant la théorie de l'apparition tardive.

Les progrès en génétique ont permis le séquençage du génome de nombreuses espèces. La disponibilité de ceux-ci nous ont permis de réaliser une analyse phylogénomique afin d'écrire une histoire de l'évolution des UCP. Ainsi, une UCP1-like est présente chez les insectes alors qu'UCP2 et UCP3 n'apparaissent que plus tard chez les premiers vertébrés, il y a 500 millions d'années.

Etrangement, une seule UCP est retrouvée chez les oiseaux, avUCP, faisant d'eux un cas particulier. En effet, au cours de l'évolution, les oiseaux ont perdu UCP1 et UCP2. Partant de cette observation, nous formulons quelques hypothèses sur l'activité de transport et les fonctions d'avUCP.

5.2/ Manuscrit

Avian UCP : the killjoy in the evolution of the mitochondrial uncoupling proteins

Emre Y.* , Hurtaud C.* , Ricquier D.* , Bouillaud F.* , Hughes J.# and Criscuolo F*¹.

Journal of Molecular Evolution. (sous presse).

* CNRS-UPR 9078, Faculté de Médecine Descartes Paris 5 - Necker, 156 rue de Vaugirard, 75730 Paris Cedex 15, France

Institute of Biomedical and Life Sciences, Division of Environmental and Evolutionary Biology, Graham Kerr Building, University of Glasgow Glasgow G12 8QQ.

¹ Corresponding author : criscuolo@wanadoo.fr

5.3/ Conclusion et points de discussion

Cet article apporte une nouvelle vision à la phylogénie et à l'évolution fonctionnelle des UCP. Les noms UCP1, UCP2 et UCP3 viennent de l'ordre dans lequel ces gènes/protéines ont été découverts. Cependant, l'idée générale était qu'UCP1 était une protéine récemment apparue au cours de l'évolution. Nos analyses phylogénomiques démontrent qu'en réalité ce sont UCP2 et UCP3 qui dérivent d'UCP1 lointaine. Par ailleurs, nous avons montré que, chez les oiseaux, seule une avUCP est présente. En fait, au cours de l'évolution, Ucp1 et Ucp2 ont été perdu ou éliminé du génome des oiseaux.

Ces données permettent d'aborder les activités de transport et les rôles physiologiques d'avUCP mais aussi de formuler des hypothèses sur l'évolution de l'activité de ces protéines.

DISCUSSION

Le but de la thèse était de mieux comprendre la fonction d'UCP2 dans le système immunitaire et en particulier dans les macrophages. Pour cela, nous nous sommes demandés de quelle manière les mitochondries et UCP2 interviennent dans l'activation des macrophages *in vitro* (article 2). Nos recherches se sont poursuivies avec des modèles *in vivo* comme l'infection par *L. monocytogenes* (article 1) et le diabète de type 1 (article 3). Par ailleurs, la mitochondrie étant avant tout un organe-clé du métabolisme cellulaire, l'étude d'éventuelles conséquences métaboliques associées à l'absence d'UCP2 dans les macrophages a été entreprise (article 4).

1/ Activité physiologique - UCP2 et la signalisation

La comparaison des macrophages Ucp2-KO et Ucp2-WT a mis en évidence comme phénotype une production accrue de cytokines et de NO des macrophages Ucp2-KO, une meilleure capacité de migration ainsi qu'une résistance à la mort induite par le NO (article 2). D'autre part, notre approche *in vitro* a permis de caractériser une fonction physiologique d'UCP2 dans les macrophages, le contrôle de la signalisation par les ROS.

1.1/ La mitochondrie et la signalisation par les ROS

A l'origine, le laboratoire avait décrit une meilleure élimination de *T. gondii* par les macrophages Ucp2-KO grâce à une explosion oxydative plus puissante comparé aux macrophages Ucp2-WT. A l'époque, UCP2 était considérée comme une protéine découplante, ce qui impliquait une fonction modulatrice de la production des ROS mitochondriaux (Skulachev et al., 1998). Par conséquent, la différence d'intensité de l'explosion oxydative fut implicitement attribuée à l'activité découplante d'UCP2 (Arsenijevic et al., 2000). Dans cette logique, les ROS mitochondriaux étaient considérés comme des effecteurs finaux responsables de l'élimination du toxoplasme. Cependant, comme cette hypothèse des ROS mitochondriaux « tueurs » ne prend pas en

compte les différences de production de cytokines et de NO, nous avons entrepris l'étude des voies de signalisation contrôlant ces paramètres.

1.1.1/ Les MAPK

Nous avons montré qu'UCP2 contrôle les ROS mitochondriaux en réponse au LPS (Fig. 2 de l'article 2). Ce résultat est important pour trois raisons : (1) La production basale de ROS est supérieure dans les mitochondries des macrophages Ucp2-KO comparées aux Ucp2-WT, (2) la production de ROS mitochondriaux augmente en réponse au LPS dans les macrophages Ucp2-WT, (3) suite au stimulus LPS, la production de ROS mitochondriaux des macrophages Ucp2-KO n'est pas augmentée. Ainsi la différence de ROS mitochondriaux entre les génotypes Ucp2-WT et Ucp2-KO est supprimée après LPS. En parallèle, le LPS induit une diminution rapide d'UCP2 (Fig. 3 de l'article 2), reliant l'augmentation de la production de ROS mitochondriaux à la quantité d'UCP2. L'analyse des voies MAPK et NF- κ B a révélé une meilleure activation des voies ERK et p38 dans les macrophages Ucp2-KO où le pic de phosphorylation est atteint plus rapidement. Par conséquent, la signalisation en aval est favorisée, comme on l'observe avec le facteur de transcription ATF-2, expliquant la plus forte induction de l'activité des macrophages Ucp2-KO.

A l'inverse, dans les macrophages surexprimant UCP2, une diminution des fonctions immunitaires est décrite (Kizaki et al., 2002 ; Ryu et al., 2004). Ces effets sont assimilables à ceux obtenus en supprimant la signalisation par les ROS (Victor et al., 2003 ; Ryan et al., 2004 ; Woo et al., 2004 ; Hsu et Wen, 2002 ; chapitre II.5.3/).

1.1.2/ Quels ROS ?

Précédemment, de fortes productions de ROS avaient été associées à de faibles quantités d'UCP2 (Arsenijevic et al., 2000 ; Kizaki et al., 2002 ; Ryu et al., 2004 ; article 1). Les méthodes employées (NBT, DCFDA, DHE) ne permettaient pas de déterminer l'origine exacte des ROS. Du fait de la localisation mitochondriale d'UCP2, la source fut naturellement considérée comme étant mitochondriale. Grâce au rapport fumarase/aconitase, nous avons été les premiers à montrer que les macrophages Ucp2-KO produisent plus de ROS mitochondriaux que les macrophages Ucp2-WT. Il s'agit en fait d'une production d'anion superoxyde puisque l'aconitase n'est pas sensible aux autres ROS ni au NO (Gardner et Fridovich, 1992 ; Gardner et al., 2002). L'anion superoxyde a une demie-vie extrêmement courte et ne peut donc pas traverser les

membranes. Il est rapidement dismuté en H_2O_2 , capable de traverser les membranes et agit comme un second messager. Dans le même temps, Bai et al. ont détecté une production de H_2O_2 supérieure par les mitochondries de rate de souris Ucp2-KO comparées aux sauvages (Bai et al., 2005), corroborant nos observations. L'utilisation d'une sonde détectant les ROS cellulaires (DCFDA, détectant l' H_2O_2) permet de retrouver la différence basale obtenue avec le rapport fumarase/aconitase. Ainsi, la différence de ROS mitochondriaux a une réelle conséquence dans le cytoplasme. Enfin, la NADPH oxydase n'est pas impliquée dans cette différence entre Ucp2-KO et Ucp2-WT puisque le recrutement à la membrane plasmique de ses sous-unités est similaire en basal comme après stimulation au LPS (Bai et al., 2005).

1.1.3/ Cible cytoplasmique des ROS

La régulation de la signalisation des MAPK implique des phosphatases, telles que MKP-1 (MAPK Phosphatase). Les MKP déphosphorylent les MAPK sur les résidus thréonine et tyrosine. Cette activité est très importante dans la régulation du système immunitaire. En effet, après stimulation, les voies MAPK activent les MPK pour inhiber la signalisation, il s'agit de la mise en place d'un rétro-contrôle négatif (Liu et al., 2007). Dans les macrophages, l'augmentation, même modérée, de la quantité de MKP-1 induit une diminution de l'activation de p38 et une diminution significative de la production de TNF- α et d'IL-6 (Chen et al., 2002 ; Zhao et al., 2005). A l'inverse, l'inhibition de MKP-1 prolonge la durée d'activation de p38 et l'augmentation de la production de cytokine (Zhao et al., 2005). Les phosphatases, comme MKP-1, sont inactivées par les ROS via les résidus cystéine présents dans leur site actif (cf Fig. 22), c'est de cette manière que les ROS favorisent les voies MAPK et NF- κ B (Salmeen et Barford, 2005 ; Denu et Tanner, 1998). Par ailleurs, les macrophages Mkp-1-KO n'ont pas d'activité basale MAPK ou NF- κ B, tout comme les macrophages Ucp2-KO. Il est donc envisageable que l'activation prolongée des voies ERK et p38 dans les macrophages Ucp2-KO résulte de l'inactivation de phosphatases spécifiques. Enfin, les souris Ucp2-KO ont un développement comparable aux souris sauvages, elles ne souffrent pas d'anomalies apparentes. C'est également le cas pour les souris Mkp-1-KO (Dorfman et al., 1996), ce qui renforce l'hypothèse d'une inhibition de phosphatases dans les souris Ucp2-KO.

1.2/ UCP2 et le mode d'activation des macrophages

Suivant les récepteurs impliqués, 4 modes d'activation des macrophages peuvent être distingués (chapitre II.2.2/).

Les études *in vitro* sur les macrophages n'ont pas révélé de différence dans leur capacité à phagocyter *L. monocytogenes* ou *E. coli* (cf Fig. 30), comme cela était décrit pour *T. gondii* (Arsenijevic et al., 2000). Une implication d'UCP2 dans l'activation cellulaire lors de la phagocytose est donc exclue.

Les récepteurs TLR, IL-1 α R et TNF- α R partagent une signalisation commune activant les MAPK. C'est pourquoi, dans ces trois cas, le traitement des macrophages par leur ligand induit une diminution rapide d'UCP2. A l'inverse, un pré-traitement à l'IFN- γ ne modifie pas le niveau d'expression d'UCP2 (cf Fig. 27). Dans ce cas, la voie de signalisation induite est celle des Jak/Stat, indépendante des MAPK (Hu et al., 2002) et donc des ROS modulés par UCP2. D'autre part, la pré-activation des macrophages à l'IFN- γ supprime toutes les différences Ucp2-KO et Ucp2-WT (cf Fig. 28). En fait, l'IFN- γ est un puissant signal qui modifie profondément l'état du macrophage, grâce à l'induction d'une multitude de gènes (Schroder et al., 2003), plaçant la cellule dans un état de réactivité supérieure (Bosisio et al., 2002). Les changements sont tels que l'influence subtile d'UCP2 dans l'activation innée n'est plus observable. Par exemple, l'utilisation d'IFN- γ augmente d'un facteur supérieur à 10 l'induction de la iNOS et la production de NO par les macrophages Ucp2-WT et d'un facteur 3 la capacité de migration (cf Fig. 28). Ainsi, nos résultats montrent que l'activation classique n'est pas influencée par UCP2.

Le rôle d'UCP2 dans la signalisation et les macrophages concerne uniquement l'activation innée.

1.3/ La signalisation par les ROS dans les cellules β -pancréatiques

Dans les cellules β -pancréatiques, l'induction de la iNOS et de la mort cellulaire par l'IL-1 α est contrôlée par les voies de signalisation MAPK (Eizirik et Mandrup-Poulsen, 2001 ; Eizirik et Darville, 2001) et particulièrement par p38 et ERK1/2 (Larsen et al., 1998). Une différence de mortalité ou de production de NO entre des cellules β Ucp2-KO et Ucp2-WT était donc attendue. Cependant, dans nos études *ex vivo*, les îlots

de souris Ucp2-WT et Ucp2-KO ne présentent ni de différence d'induction de la iNOS, ni de mortalité cellulaire en réponse à l'IL-1 β (Fig. 2 de l'article 3). Une explication est l'absence d'effet de la signalisation par les ROS sur la mort des cellules β induite par les cytokines. En effet, l'utilisation d'anti-oxydants ou la surexpression de la MnSOD ou de la catalase ne modifie pas la toxicité par les cytokines (Chen et al., 2005b).

L'importance de la signalisation par les ROS en réponse au LPS est bien connue (chapitre II.5.3/ ; cf Fig. 21). Jusqu'à présent, la part des mitochondries n'avait pas été suffisamment étudiée dans ce phénomène. Nos résultats montrent que la mitochondrie participe à cette signalisation par les ROS. Plus précisément, nous présentons UCP2 comme le régulateur de cette boucle de signalisation certes secondaire mais cruciale lors de l'activation du macrophage (Fig. 8A de l'article 2).

1.4/ NF- κ B et la pré-activation

Des différences de cytokines et de NO en réponse au LPS entre les macrophages de souris Ucp2-WT et Ucp2-KO ont été décrites (Bai et al., 2005 ; article 2). Malheureusement les explications à ces phénotypes sont divergentes.

1.4.1/ NF- κ B ?

Selon Bai et al., les phénotypes entre les macrophages Ucp2-WT et Ucp2-KO résultent d'une activation plus importante de NF- κ B (Bai et al., 2005) tandis que nous les attribuons aux MAPK et non pas à NF- κ B (article 2). Pour expliquer cette contradiction, il est important de noter que leur démonstration est basée sur un travail effectué sur des extraits de rate (environ 2-4% de monocytes/macrophages) et non pas sur des macrophages isolés.

Premièrement, l'activation de NF- κ B n'a été étudiée qu'à un temps unique : 3h après LPS. C'est un temps très tardif. En effet, l'injection de LPS à une souris provoque, par exemple, une libération très rapide de TNF- α . Le pic de TNF- α sérique est atteint en 30-60 minutes, donc regarder la vitesse de l'activation cellulaire primaire à 3h est trop tardif. A ce temps, ce n'est plus la phase de réponse précoce qui est observée mais déjà ses conséquences.

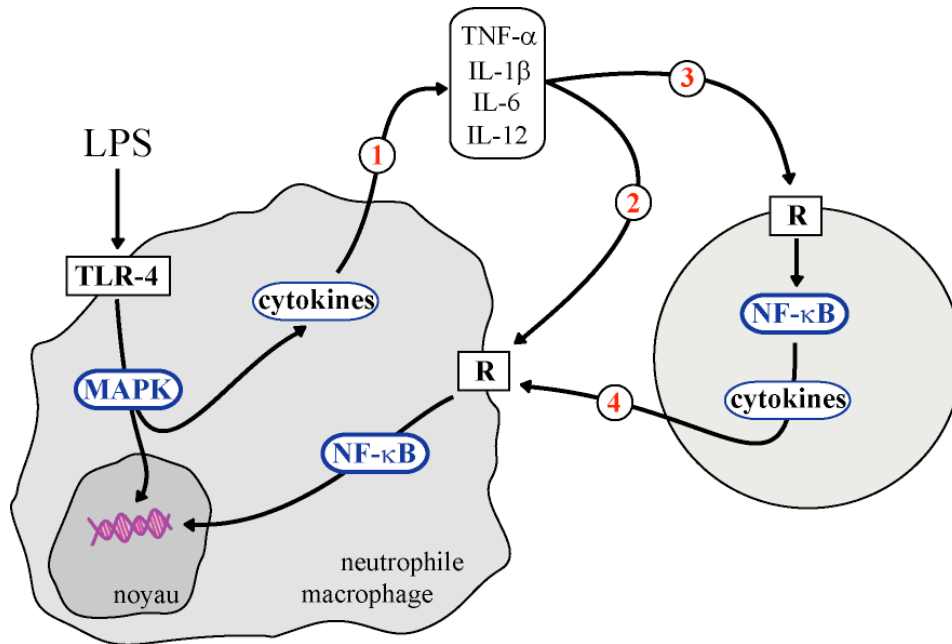


Figure 32 : Conséquences *in vivo* du LPS sur la rate.

Les macrophages et les neutrophiles possèdent le TLR-4. En réponse au LPS, les macrophages et les neutrophiles libèrent différentes cytokines (1). Celles-ci ont une action autocrine (2) et paracrine (3). Cette activation secondaire (2) ou des cellules voisines (3) emprunte les voies MAPK et NF- κ B. La libération secondaire de nouvelles cytokines entretient l'activation des voies de signalisations (4).

Chez les souris Ucp2-KO, la signalisation MAPK initiale des macrophages est plus forte que chez les sauvages, responsable d'une libération accrue de cytokines *in vitro* (emre 2007) et *in vivo* (Bai et al. 2005). Ainsi lorsque Bai et al. observent une différence d'activation de NF- κ B trois heures après injection, il s'agit d'une conséquence tardive des interactions entre les différentes cellules de la rate et non d'une signalisation propre aux macrophages de la rate qui ne représente que 2-4% des cellules immunitaires de la rate.



Figure 33 : La translocation nucléaire de NF- κ B.

(Bai et al., *J. Biol. Chem.*, 2005)

Après traitement des souris Ucp2-KO et Ucp2-WT au LPS (4 μ g/g) pendant 3 heures, les rates ont été récupérées pour la préparation des fractions nucléaires et cytoplasmiques. La translocation de p50 et de p65 en conditions basales est détectée par western blot. Les données représentent la moyenne \pm SE de deux expériences indépendantes (n = 4). *, p < 0,05.

Deuxièmement, nous avons montré que les cascades ERK et p38 sont activées plus rapidement et plus longtemps dans les macrophages Ucp2-KO, conduisant à une production accrue de cytokines dont le TNF- α (article 2). Bai et al. ont eux-mêmes décrit une production plus forte de TNF- α chez les souris Ucp2-KO après LPS. Ainsi, *in vivo*, les souris libèrent immédiatement du TNF- α (phase 1, Fig. 32) qui a une action autocrine et paracrine (phase 2/3, Fig. 32) conduisant à une stimulation supplémentaire activant les voies MAPK et NF- κ B. Par ailleurs, *in vivo*, il y a une amplification de tout phénomène à cause des interactions (via des cytokines, comme l'IFN- γ) entre les macrophages et les autres cellules environnantes (phase 4, Fig. 32) qui n'existent pas *in vitro*. Par conséquent, l'activation de NF- κ B plus forte chez les souris Ucp2-KO, 3 heures après injection de LPS, n'est probablement qu'un événement tardif, consécutif à plusieurs phénomènes imbriqués. Il aurait fallu réaliser une cinétique d'activation de NF- κ B en réponse au LPS au lieu de regarder uniquement le temps 3h. Un argument important en faveur de l'hypothèse de l'amplification est la forte production d'IFN- γ par les souris Ucp2-KO décrite par les auteurs. Cette cytokine est en effet essentielle pour l'activation et l'activité des macrophages.

Dans les macrophages, l'absence d'UCP2 affecte les voies de signalisation ERK et p38, pas celle de NF- κ B.

1.4.2/ La pré-activation ?

Nous avons montré qu'après stimulation, l'activation des macrophages Ucp2-KO est plus rapide que celle des sauvages. Par contre, en absence de stimulation, les signalisations MAPK et NF- κ B ne sont pas activées (article 2) dans les macrophages Ucp2-KO, illustrant l'importance d'un signal principal (LPS ou MCP-1) pour révéler le rôle des ROS mitochondriaux. Or Bai et al ont décrit une activation constitutive de NF- κ B dans les cellules Ucp2-KO, responsable de leur pré-activation.

Plus exactement, la sous-unité p50 serait plus présente dans le noyau des cellules des rates des souris Ucp2-KO. En revanche, il n'y a pas de différence pour p65 (Fig. 33). p50 seule n'a pas la capacité d'activer la transcription (chapitre II.4.2/). D'ailleurs, aucun gène-cible de NF- κ B (cytokines, iNOS) n'est activé. Les souris et les cellules Ucp2-KO en absence de stimulation, ne produisent ainsi ni cytokines ni NO et n'ont pas de capacité migratoire particulière (article 2 ; Arsenijevic et al., 2000). Ceci indique bien qu'en l'absence de stimulation, rien ne différencie les macrophages et les souris

Ucp2-WT des Ucp2-KO d'un point de vue « immunologique », comme c'est également le cas avec les macrophages surexprimant UCP2 (Kizaki et al., 2002 ; Ryu et al., 2004).

Par ailleurs, l'activation constitutive des voies MAPK ou NF- κ B est toujours associée et responsable de diverses conséquences physio-pathologiques, comme le cancer ou des problèmes de développement embryonnaire (Pacifico et Leonardi, 2006 ; Lu et Stark, 2004 ; Scholl et al., 2005). De telles perturbations ne sont pas observées chez les souris Ucp2-KO, ce qui montre bien que la notion de « pré-activation » est incorrecte.

Un dernier argument est la récente implication des ROS et d'UCP2 dans la transcription du gène de l'adiponectine dans les adipocytes blancs (Chevillotte et al., 2007). Dans cette étude, UCP2 contrôle l'expression génique de l'adiponectine via les ROS mais indépendamment de NF- κ B. Ce qui confirme nos résultats sur l'absence d'influence d'UCP2 sur la signalisation de NF- κ B. La voie des MAPK n'a pas été examinée dans cette étude.

La différence de signalisation entre les macrophages Ucp2-KO et Ucp2-WT est due à une production accrue de ROS mitochondriaux qui potentialise l'activation des MAPK après traitement mais qui n'a aucune incidence sur la signalisation en l'absence de stimulation (Fig. 4-5 de l'article 2).

1.5/ Caractéristiques d'UCP2

Un certain nombre d'éléments permettent de considérer UCP2 comme une protéine de stress. Sa demi-vie extrêmement courte de l'ordre de 30 minutes (Rousset et al., 2007) est une caractéristique partagée par différentes protéines de stress. La demi-vie de p53 est d'environ 30 minutes (Liu et al., 1994) comme celle de p21 (Bloom et al., 2003) ou de la cycline D1 (Campo et al., 2002). Par ailleurs, UCP2 est régulée au niveau de la traduction (Pecqueur et al., 2001 ; Hurtaud et al., 2006), comme de nombreuses protéines de stress ou de la réponse immunitaire, par exemple le TNF- α . Ainsi, la réponse cellulaire peut débiter sans la mise en place d'un long contrôle transcriptionnel. Dans les macrophages stimulés au LPS, les MAPK p38 et JNK sont responsables de la traduction de l'ARNm de TNF- α (Kontoyiannis et al., 1999 et 2001). C'est un parallèle intéressant puisque UCP2 est également contrôlée par p38 et JNK en

réponse au LPS (Fig. 6 de l'article 2). Dans le cas du TNF- α , ce sont des séquences ARE (AU-Rich Element) en 3'-UTR qui sont responsables de la régulation traductionnelle. Néanmoins, celles-ci sont absentes de l'ARNm d'UCP2. Il a été démontré que l'ARNm d'UCP2 contient une phase ouverte de lecture en amont de celle codant la protéine UCP2, inhibant la synthèse d'UCP2 (Pecqueur et al., 2001 ; Hurtaud et al., 2006). Cependant, les mécanismes de la mise en place de l'inhibition ou de sa levée restent inconnus.

Un autre point intéressant est le faible niveau d'expression d'UCP2. En effet, UCP2 est 160 fois moins abondante dans la rate, tissu où elle est la plus exprimée, qu'UCP1 dans le TAB (Pecqueur et al., 2001). UCP1 représente 5% des protéines mitochondriales dans le TAB de souris exposées au froid. Cela signifie qu'UCP2 ne représente au mieux que 0,03% des protéines mitochondriales dans la rate. La quantité d'UCP2 dans la mitochondrie est donc très faible. Cela renforce un rôle subtil d'UCP2, en adéquation avec une régulation fine dans la signalisation ou le métabolisme cellulaire.

Les protéines de signalisation, elles, sont reconnaissables grâce à leur mode d'activation ou de régulation. Il peut s'agir d'une modification covalente, comme les phosphorylations et les déphosphorylations dans les cascades des MAPK. La phosphorylation réversible est ainsi responsable d'un changement d'état (actif/inactif) qui contrôle la signalisation. La modification peut aussi être irréversible, comme dans la voie des caspases où la coupure protéolytique de la pro-caspase déclenche la signalisation. Par contre, dans le cas des récepteurs aux cytokines ou des TLR, la régulation concerne la localisation du récepteur à la surface de la cellule. Ainsi, après stimulation, les récepteurs sont rapidement internalisés pour bloquer l'initiation de la signalisation. C'est par exemple ce qui se produit avec TLR-4, un phénomène participant à la tolérance à l'endotoxine (Fan et Cook, 2004). Un dernier mode d'activation est la dégradation protéique. Ainsi, l'activation de la voie NF- κ B requiert la dégradation de son inhibiteur I- κ B. De la même manière, nous avons montré que l'activation de la voie de signalisation des ROS nécessite la diminution du taux d'UCP2. Cette diminution d'UCP2 dans les macrophages en réponse au LPS requiert environ une heure pour atteindre son niveau minimal (Fig. 3 de l'article 2). Il est donc possible que cette diminution ne soit pas une augmentation de la dégradation comme c'est le cas avec I- κ B, mais plutôt un simple arrêt de la traduction. Cet aspect fut étudié

dans les macrophages en utilisant des inhibiteurs de protéines contrôlant la traduction (mTOR et Mnk-1). Cependant, aucune ne s'est révélée être impliquée dans cette modulation (Fig. 6 de l'article 2). Le seul élément connu menant à la diminution d'UCP2 en réponse au LPS est qu'il est en aval et commun aux voies JNK et p38.

UCP2 est donc assimilable à une protéine de stress qui participe à la signalisation cellulaire grâce à son influence sur la production de ROS mitochondriaux (Fig. 8 de l'article 2).

1.6/ Les macrophages Ucp2-KO et la destruction des pathogènes

Dans l'article d'origine sur les souris Ucp2-KO (Arsenijevic et al., 2000), une activité anti-*T. gondii* des macrophages Ucp2-KO cinq fois supérieure aux macrophages Ucp2-WT avait été décrite. Lors de nos études sur *L. monocytogenes*, nous n'avons observé aucune différence dans l'élimination de la bactérie.

Les pathogènes qui parasitent les macrophages doivent survivre et se multiplier dans l'environnement hostile que constitue la cellule hôte. Les stratégies employées sont différentes selon les pathogènes. *T. gondii* inhibe l'activité des macrophages en bloquant les voies de signalisation NF- κ B et MAPK (Denkers et al. 2004a et 2004b). Ainsi, nous avons suggéré que la plus forte stimulation des voies de signalisation p38 et ERK dans les macrophages Ucp2-KO leur permet de contrer le développement normal de *T. gondii* et favorisent la lutte anti-parasitaire *in vivo* et *in vitro*. A l'inverse, dans le cas de *L. monocytogenes*, l'activation du macrophage est favorisée afin d'augmenter le nombre de cellules hôtes à infecter (Rosenberger et Finlay, 2003). Dans ce cas, une plus forte signalisation favorise l'activation cellulaire et la production de cytokines et de chimiokines (article 1).

Une autre explication est également envisageable. La phagocytose, la dégradation dans le phagolysosome, la production de NO et l'explosion oxydative sont des mécanismes effecteurs anti-microbiens très puissants. Pour survivre, les pathogènes ont ainsi développé différents subterfuges. Le devenir intracellulaire de *T. gondii* dans le macrophage est déterminé par la manière dont il entre dans la cellule hôte. L'invasion de la cellule par *T. gondii* est un processus actif lui permettant d'échapper à la voie phagolysosomale normale et de se développer dans une vacuole spécialisée (Mordue et al., 1999). Par ailleurs, *T. gondii* peut aussi entrer dans le macrophage par phagocytose,

se retrouvant dans le phagolysosome où il sera détruit (Mordue et Sibley, 1997). Dans le cas de *T. gondii*, la meilleure élimination du parasite est expliquée par une explosion oxydative plus importante dans les macrophages Ucp2-KO (Arsenijevic et al., 2000).

C'était là notre hypothèse de travail lorsque l'étude sur les macrophages et *L. monocytogenes* a débuté. La destruction du micro-organisme par les ROS nécessite un certain temps dans le phagosome. Pour se défendre, *L. monocytogenes* a développé une technique de défense qui consiste à s'échapper rapidement de sa vacuole. Peu après la phagocytose, *L. monocytogenes* perce la membrane de la vacuole qui la contient se retrouvant ainsi en moins de 30 minutes dans le cytoplasme des macrophages (Myers et al., 2003). C'est pourquoi, il ne peut pas être détruit par le processus habituel d'explosion oxydative contrairement au toxoplasme phagocyté. Il était donc normal de ne pas voir de différence d'élimination de *L. monocytogenes* dans ces conditions *in vitro*. A cause de ce phénomène d'évasion vacuolaire, les macrophages naïfs ne peuvent pas lutter efficacement contre *L. monocytogenes*. En conséquence, les études d'élimination bactérienne sont souvent réalisées sur des macrophages activés à l'IFN- γ et au LPS. Une pré-activation sur la nuit de macrophages péritonéaux à l'IFN- γ empêche l'accès de *L. monocytogenes* au cytoplasme (Dai et al., 1997), limitant ainsi la croissance de la bactérie. Pour les macrophages dérivés de la moelle osseuse, une stimulation supplémentaire au LPS est nécessaire (Myers et al., 2003), l'IFN- γ seul n'ayant pas un pouvoir suffisant (Tsang et al., 2000). C'est grâce aux productions de ROS et de NO (Myers et al., 2003) après activation à l'IFN- γ et au LPS que ces macrophages parviennent à contrôler *L. monocytogenes*. C'est pourquoi, *in vitro*, nous avons aussi regardé l'élimination de *L. monocytogenes* après un pré-traitement à IFN- γ et au LPS. Une nouvelle fois, le résultat de l'expérience fut une absence de différence d'élimination entre les macrophages Ucp2-KO et sauvages. La raison de ce second échec n'est apparue que plus tard lorsque nous avons démontré que l'IFN- γ est un signal tellement puissant qu'il supprime le rôle subtil d'UCP2 dans les macrophages et donc les différences entre les macrophages Ucp2-WT et Ucp2-KO. Ainsi, il est clair que *L. monocytogenes* ne constituait pas le modèle idéal pour étudier le rôle d'ucp2 dans les macrophages.

Par ailleurs, Arsenijevic et al. ont décrit que les macrophages Ucp2-KO éliminent également mieux *Salmonella typhimurium* (Arsenijevic et al., 2000). Cette bactérie reste dans sa vacuole et possède des superoxydes dismutases à sa surface et

des protéines de réparations pour lutter contre les dommages causés par les ROS (Linehan et Holden, 2003). Néanmoins, *S. typhimurium* est sensible à la mort par la NAPDH oxydase dans les premières heures qui suivent la phagocytose. De plus, elle est très sensible au NO. Ainsi, l'explosion oxydative et la production accrue de NO des macrophages Ucp2-KO peuvent expliquer la meilleure élimination de cette bactérie.

2/ Activité biochimique - UCP2 et le métabolisme

Le métabolisme est une imbrication de multiples voies biochimiques où le catabolisme des sucres, des acides gras et des acides aminés alimente le cycle de Krebs et par conséquent la chaîne respiratoire. Sachant que la glutamine est un inducteur de la traduction d'UCP2 dans divers types cellulaire dont les macrophages (Hurtaud et al., 2007), nous nous sommes intéressés au métabolisme de la glutamine dans les macrophages Ucp2-KO et Ucp2-WT.

2.1/ L'oxydation de la glutamine

Nos résultats montrent une utilisation différentielle de la glutamine en tant que substrat énergétique entre les macrophages Ucp2-WT et Ucp2-KO. Lorsque la glutamine est le seul substrat énergétique présent, il est oxydé (Fig. 10B de l'article 4), ce qui est confirmé par l'augmentation de la respiration (Fig. 8B de l'article 4) et il n'y a pas de production de lactate (Fig. 9B de l'article 4). Dans ces conditions, une accumulation des intermédiaires de la glutaminolyse est observée dans les macrophages Ucp2-KO (Fig. 4-7 de l'article 4). Les macrophages Ucp2-KO montrent un défaut d'oxydation (Fig. 10B de l'article 4) et donc de respiration (Fig. 8B de l'article 4) par rapport aux macrophages Ucp2-WT. Ces observations présentent un rôle d'UCP2 sur l'oxydation de la glutamine, c'est-à-dire sur le métabolisme cellulaire. Précisons tout de même que la glutaminolyse oxydative n'est pas complètement supprimée mais est seulement moins efficace que dans les macrophages Ucp2-WT (Fig. 10B de l'article 4). Ainsi, UCP2 n'est pas la protéine-clé de cette voie métabolique mais un acteur.

En réalité, l'influence d'UCP2 sur le métabolisme est plus complexe qu'une simple restriction sur la glutaminolyse. En présence de glucose et de glutamine, il est

intéressant de noter que l'oxydation de la glutamine est quasi-nulle dans les deux génotypes (Fig. 10A de l'article 4). Dans les macrophages Ucp2-WT, une partie du glucose est oxydée, comme le souligne les données de respiration (Fig. 8A, Fig. 10A de l'article 4) et une partie est transformée en lactate (Fig. 9A de l'article 4). Par contre, ces deux paramètres ne sont pas modifiés dans les macrophages Ucp2-KO (Fig. 8A et 9A de l'article 4). Ces résultats montrent ainsi qu'outre l'influence d'UCP2 sur le métabolisme de la glutamine, UCP2 affecte également celui du glucose.

2.2/ L'activité métabolique d'UCP2

Quelle est la portée de nos données métaboliques sur la nature du rôle d'UCP2 ?

En présence de glutamine, la respiration des macrophages Ucp2-WT est supérieure à celle des macrophages Ucp2-KO (Fig. 8 de l'article 4). Cependant, les données NADH/NAD⁺ montrent que l'état redox des macrophages Ucp2-WT est plus réduit que celui des Ucp2-KO (Fig. 12 de l'article 4) et que la production d'ATP est similaire entre les deux types de macrophages (Fig. 11 de l'article 4). Par conséquent, dans les macrophages, une activité découplante d'UCP2 est à exclure.

L'altération métabolique provoquée par l'absence d'UCP2 intervient en fin de glutaminolyse (Fig. 4-7 de l'article 4), UCP2 ne participe donc pas à l'entrée de la glutamine dans le macrophage. D'après les expériences de gonflement des mitochondries, la fonction d'UCP2 n'est pas non plus l'export de l'aspartate. L'activité de transport d'UCP2 n'est donc pas encore résolue.

L'absence d'UCP2 altère un flux métabolique ou bloque une voie biochimique. La déficience oxydative n'est observable qu'en présence de glutamine. Avec l'induction d'UCP2 par la glutamine (Hurtaud et al., 2007 ; article 4), nos résultats suggèrent qu'UCP2 est un senseur de la glutamine, permettant à la cellule de s'adapter au changement d'environnement, c'est-à-dire à un nouveau substrat énergétique. Malgré ce défaut, les cellules Ucp2-KO ou les souris Ucp2-KO ne souffrent pas de troubles « apparents », ni de défaut de synthèse d'ATP (Fig. 11 de l'article 4). L'absence d'UCP2 ne provoque qu'un subtil déficit de cette voie (glutaminolyse), qui est mineure dans le métabolisme cellulaire total. C'est pourquoi, les conséquences biologiques sont lentes à se révéler, nécessitant 3 heures pour observer une légère accumulation d'aspartate et même 16 heures pour la glutamine.

2.3/ Signalisation par les ROS ou par le métabolisme ?

Comment concilier l'impact d'UCP2 sur le métabolisme et son rôle sur les ROS mitochondriaux ? L'activation des macrophages, comme de toutes les cellules immunitaires, s'accompagne de nombreuses modifications au niveau de la transcription comme de la traduction. En général, seules les protéines effectrices de la fonction immunitaire sont mentionnées ou étudiées (cytokines, iNOS, NADPH oxydase, ...). Cependant, le métabolisme cellulaire connaît également de profonds remaniements.

2.3.1/ Théorie métabolique de la signalisation par les ROS

En l'absence de stimulation, les besoins énergétiques des macrophages proviennent du glucose à 62% et de la glutamine à 38% (Newsholme et al., 1999) dont une faible quantité de chacun est oxydée. Nous pouvons ainsi établir un rapport entre la quantité de glutamine oxydée et la quantité de glucose oxydé (GlnO/GlcO).

L'activation par le LPS se traduit par une augmentation de l'utilisation cellulaire du glucose (+50%) et de la glutamine. Cependant, seule l'oxydation du glucose est augmentée (+20%), celle de la glutamine reste inchangée (Costa-Rosa et al., 1995), donc le rapport GlnO/GlcO diminue. Le reste du glucose se transforme en lactate alors que la glutamine donne du glutamate, de l'aspartate et du lactate (Newsholme et al., 1999 ; Bustos et Sobrino, 1992). Ainsi, l'activité oxydative globale de la mitochondrie progresse, résultant en une augmentation de la production de ROS mitochondriaux. En parallèle, UCP2 est rapidement diminuée (article 2). Puisqu'UCP2 favorise l'oxydation de la glutamine (article 4), nous pouvons postuler qu'UCP2 contrôle ce rapport GlnO/GlcO. Par conséquent, la diminution d'UCP2 conduit à une diminution du rapport GlnO/GlcO.

Une fois activés au LPS, les macrophages Ucp2-KO et Ucp2-WT ont une production de ROS mitochondriaux similaire, suggérant (1) une capacité d'oxydation mitochondriale identique et (2) un rapport GlnO/GlcO proche. Nous savons que dans les macrophages Ucp2-KO non stimulés, l'oxydation de la glutamine est inférieure à celle des Ucp2-WT (article 4). Par conséquent, le rapport GlnO/GlcO des macrophages Ucp2-KO au repos est diminué. L'oxydation du glucose est inconnue mais nos données sur le métabolisme indiquent fortement qu'elle est modifiée. La production de ROS mitochondriaux plus forte des macrophages Ucp2-KO suggère que ces cellules ont une oxydation du glucose augmentée.

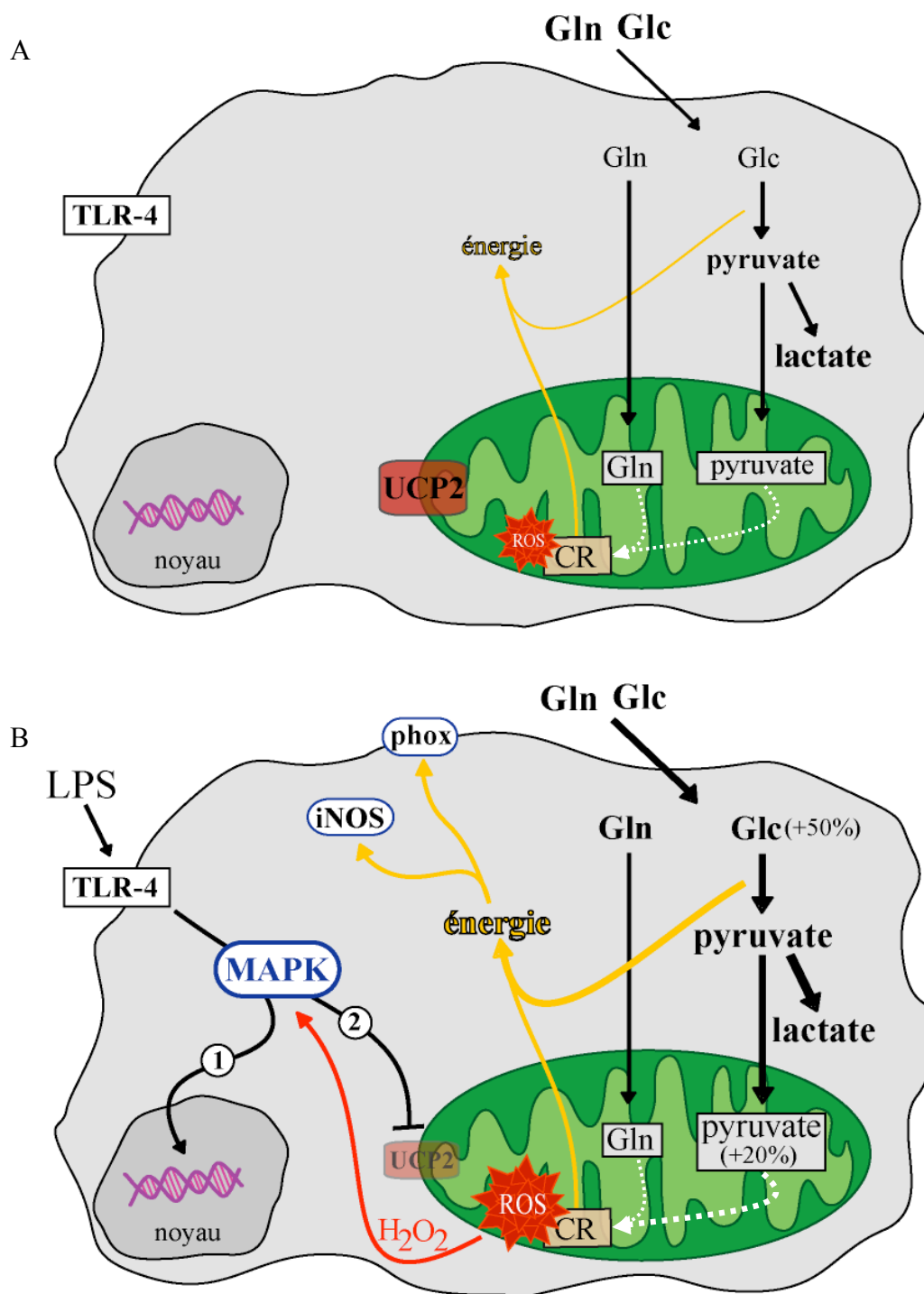


Figure 34 : Théorie métabolique de la signalisation par les ROS.

(A) Un macrophage au repos consomme de la glutamine et du glucose. Une certaine part des ces substrats sont oxydés. UCP2 participe au choix du substrat à oxyder. Elle contrôle la part de glutamine à oxyder par rapport à la quantité de glucose à oxyder. En sa présence, une oxydation supérieure de glutamine est favorisée.

(B) La stimulation des macrophages se traduit par une signalisation responsable de modulations transcriptionnelles (voie 1) et de modifications métaboliques (voie 2). L'entrée et l'utilisation du glucose et de la glutamine sont augmentées. Dans le même temps, la diminution d'UCP2 limite la part de glutamine oxydée par rapport au glucose, l'oxydation du glucose est ainsi favorisée.

L'augmentation de l'oxydation du glucose augmente la production de ROS mitochondriaux. Le superoxyde se dismute en H₂O₂ et traverse les membranes mitochondriales pour influencer sur la signalisation cellulaire, il s'agit de la signalisation par les ROS (article 2).

UCP2 participe certainement à la régulation du rapport GlnO/GlcO, c'est-à-dire qu'UCP2 contrôle la part de glutamine à oxyder par rapport à la quantité de glucose à oxyder.

L'activation des macrophages se traduit par une signalisation MAPK/NF- κ B, responsable de modulations transcriptionnelles (voie 1) et de modifications métaboliques (voie 2). Ainsi, la diminution précoce d'UCP2, après une stimulation par le LPS, est nécessaire pour modifier le métabolisme des macrophages, ce qui conduit à une augmentation de la production de ROS mitochondriaux. L'anion superoxyde produit par la chaîne se dismute en H₂O₂ et traverse les membranes mitochondriales pour influencer sur la signalisation cellulaire. Il s'agit de la signalisation par les ROS mitochondriaux en réponse au LPS, consécutif à la diminution d'UCP2 (Fig. 8A de l'article 2). Le métabolisme et la signalisation cellulaire sont ainsi liés (Fig. 34).

2.3.2/ Quelques précisions

Cette théorie concilie bien les observations sur le métabolisme et l'activation des macrophages. Le métabolisme cellulaire et la signalisation vont de paire. La modification de la production de ROS n'est dans ce cas qu'une conséquence d'un changement métabolique. La fonction d'UCP2 n'est donc pas d'être un frein ou un régulateur de la production de ROS. Néanmoins, son activité de transport n'est pas encore déterminée.

Bien évidemment, le changement complet du métabolisme cellulaire n'est pas instantané, c'est un processus long qui requiert la mise en place de divers paramètres comme la transcription de gènes, la synthèse ou la dégradation de protéines. Cependant certaines étapes sont rapides. Ainsi, la phosphorylation ou la déphosphorylation contribue à modifier certaines activités enzymatiques (comme pour la pyruvate kinase dans le foie) et nous proposons ici que la diminution rapide d'UCP2 participe à ce shunt métabolique dans les macrophages. Par ailleurs, l'IFN- γ n'accroît pas la consommation de glucose des macrophages (Costa-Rosa et al., 1995 ; Sato et al., 1995), contrairement au LPS (Costa-Rosa et al., 1995 ; Newsholme et al., 1999). UCP2 étant impliquée dans l'oxydation du glucose, son expression n'est ainsi pas influencée par une pré-activation des macrophages avec l'IFN- γ (cf Fig. 27).

Il est important de noter que la différence d'élimination du toxoplasme est observée dans du PBS+glucose. Ainsi, une différence d'oxydation du glucose est fortement envisageable. Par ailleurs, nos résultats sur la signalisation et la production de

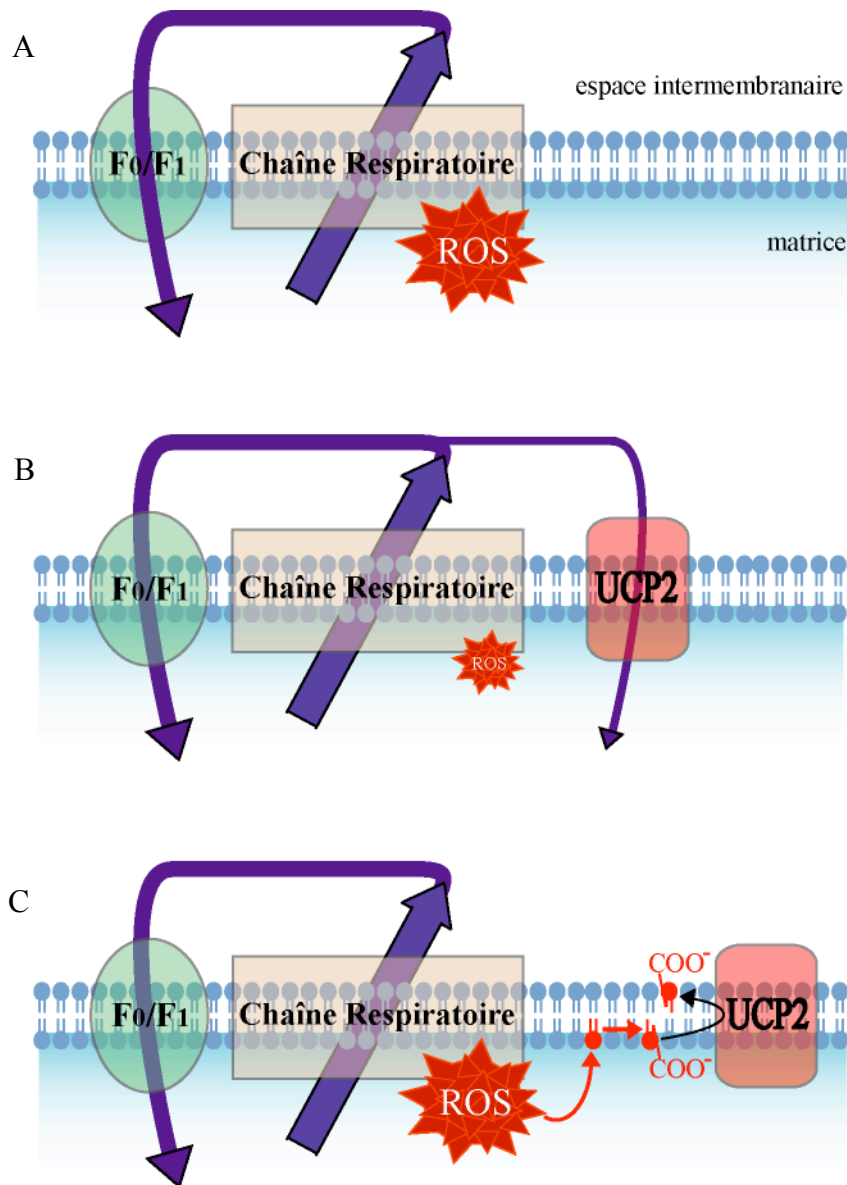


Figure 35 : Les modèles de lutte contre les ROS par UCP2.

(A) La chaîne respiratoire produit des ROS.

(B) UCP2 découple la respiration de la synthèse d'ATP en permettant le retour des protons dans la matrice. Cette activité découplante peut être activée par les ROS ou les lipides peroxydés. Ainsi, UCP2 diminue la production de ROS. (*Skulachev 1998; Brand et al. 2005*).

(C) Les ROS induisent des dommages dans les lipides de la face matricielle de la membrane interne. UCP2 exporte les lipides peroxydés pour détoxifier la membrane interne de ces acides gras endommagés. Dans ce cas UCP2 ne limite pas la production des ROS mitochondriaux mais combat leurs conséquences. (*Goglia et al. 2003; Brand et al. 2005*).

NO ont été obtenus dans du milieu RPMI complet. Dans ces conditions expérimentales, il n'y a aucune différence de respiration, d'acides aminés, de NADH ni de production de lactate. L'effet d'UCP2 est vraisemblablement masqué par les multiples voies biochimiques fonctionnant en parallèle dans la cellule dans un milieu fournissant plusieurs substrats énergétiques. Le métabolisme est un flux continu de métabolites provenant de diverses voies convergentes. Malheureusement, à ce jour, il n'existe pas de système suffisamment sensible permettant l'étude du métabolisme dans sa globalité et la détection de tous les intermédiaires à un instant donné.

Il serait intéressant de mesurer dans le futur l'oxydation du glucose \pm glutamine mais également de déterminer le pourcentage de lactate formé à partir du glucose et de la glutamine. Ceci permettrait de clarifier le rôle d'UCP2 sur le métabolisme du glucose.

2.4/ La production de ROS mitochondriaux et l'activité découplante

La fonction découplante d'UCP1 est indiscutable. A cause de l'homologie de séquence avec UCP2 et des premières expériences de surexpression d'UCP2 (Fleury et al., 1997), les études se sont trop souvent focalisées sur UCP2 en tant que vraie protéine découplante (chapitre I.2.2.4.1/).

2.4.1/ Les théories découplantes et la production de ROS

Deux modèles tentent d'expliquer le contrôle des ROS mitochondriaux par une activité découplante (Fig. 35). L'une consiste en un découplage modéré de la respiration mitochondriale. L'argument est qu'un découplage modéré permet d'accélérer la vitesse de la chaîne respiratoire, ce qui diminue la durée de vie des intermédiaires radicalaires en son sein. Par conséquent, la production de ROS est diminuée (Fig. 35B ; Skulachev 1998). La seconde propose qu'UCP2 exporte à travers la membrane interne des acides gras peroxydés, de la matrice vers l'espace intermembranaire. Si l'acide gras peroxydé de l'espace intermembranaire y est protoné et qu'il retourne dans la matrice, cela constitue un transport de proton (Fig. 35C ; Goglia et Skulachev, 2003). Dans ce cas, l'activité découplante s'intègre dans un phénomène de détoxification de la membrane interne et pas à la diminution de la production de ROS.

2.4.2/ Les arguments opposables

Un découplage partiel de la respiration par UCP2 pourrait expliquer les différences de ROS mitochondriaux (Skulachev, 1998). Cette hypothèse semble être à première vue en adéquation avec le mécanisme d'action d'UCP2 sur la signalisation (Fig. 8 de l'article 2). Néanmoins, cette activité n'est pas physiologiquement pertinente. En effet, en état 4, lorsque la synthèse d'ATP par la mitochondrie est absente, la production de ROS est favorisée puisque la durée de vie des intermédiaires de la chaîne respiratoire augmente. Ainsi, un retour de protons vers la matrice, via une protéine découplante, accélère la chaîne et permet de diminuer la production de ROS. Malheureusement, il est souvent occulté que l'influence d'un découplage sur la production de ROS ne peut avoir lieu qu'en état 4, où il n'y a pas de synthèse d'ATP. Or, dans des conditions cellulaires physiologiques, les mitochondries sont constamment en état 3, c'est-à-dire que la chaîne respiratoire synthétise de l'ATP, elle fonctionne à une vitesse donnée. Par conséquent, un découplage ne diminuera pas la production de ROS mais diminuera la synthèse d'ATP. Une activité découplante d'UCP2 ne peut donc pas expliquer les différences de production de ROS décrites (Arsenijevic et al., 2000 ; Kizaki et al., 2002 ; article 1 et 2). Par ailleurs, ce modèle n'est pas compatible avec nos données puisque nous n'avons pas observé d'activité découplante d'UCP2 dans les macrophages (article 3). Auparavant, dans notre laboratoire, aucune activité découplante n'avait été mise en évidence dans les mitochondries de rate ou de poumon (Couplan et al., 2002).

L'hypothèse de l'export d'acides gras peroxydés n'est pas en accord avec nos observations sur la signalisation. D'une part, nous n'avons pas détecté d'activité découplante dans les macrophages. D'autre part, selon cette théorie, UCP2 participerait à l'élimination de molécules endommagées et délétères pour l'activité mitochondriale. Dans ce cas, la production même des ROS n'est pas affectée par UCP2. Or, l'influence d'UCP2 sur la signalisation nécessite une production de H₂O₂ (article 2 ; Bai et al., 2005).

2.5/ Les autres UCP et le métabolisme

2.5.1/ UCP1

La thermogenèse sans frisson dans le TAB, basée sur le découplage de la respiration, est spécifique de certains mammifères. Ainsi, cette fonction est apparue tardivement dans l'évolution. Cependant, UCP1, la protéine responsable de cette

activité chez les mammifères est, quant à elle, très ancienne puisque nous avons pu la retrouver chez les insectes, comme le moustique (*Anopheles gambiae*) et l'abeille (*Apis mellifera*). Nous n'avons pas de données biochimiques pour argumenter sur une activité découplante thermogénique. Elle semble néanmoins peu probable. D'autant plus que cette UCP1-like est principalement exprimée dans le foie de la carpe (*Cyprinos carpio*) où elle est fortement diminuée lors d'une exposition au froid (Jastroch et al., 2005). Ces informations suggèrent qu'UCP1 n'a pas de fonction thermogénique chez la carpe.

Certes, UCP1 découple la respiration, le mécanisme exact n'est cependant pas encore élucidé. Deux écoles s'opposent, un transport net de proton et le cycle de l'acide gras protoné (Garlid et al. 1998). Dans ce second modèle, l'acide gras protoné diffuse librement à travers la membrane interne et le proton est libéré dans la matrice mitochondriale. Puis, UCP1 transloque la forme anionique à travers la membrane. Nous pouvons donc supposer que l'activité de l'UCP1 originelle concernait le métabolisme lipidique (un simple transport d'acide gras) qui a par la suite évolué vers le cycle de l'acide gras protoné.

2.5.2/ UCP3

Les discussions sur UCP3 rencontrent les mêmes difficultés que celles sur UCP2 quant à sa fonction découplante. Outre le découplage, UCP3 a été impliquée dans l'oxydation des lipides (Schrauwen et al., 2006) ou dans le maintien d'un équilibre entre la production d'ATP par la voie aérobie et la voie anaérobie (Mozo et al. 2006). Trois théories majeures concernent sa fonction biochimique. UCP3 exporterait les acides gras non-métabolisables hors de la mitochondrie (Schrauwen et al., 2006), expulserait les acides gras peroxydés (Goglia et Skulachev, 2003 ; Brand et Esteves, 2005), ou exporterait le pyruvate (Mozo et al., 2006).

2.5.3/ avUCP

Les oiseaux sont la seule classe des vertébrés à ne posséder qu'une seule UCP, avUCP. Les analyses phylogénomiques montrent qu'avUCP est plus proche d'UCP3 que d'UCP2 (article 5). Il semble qu'UCP1 et UCP2 aient été perdues au cours de l'évolution des oiseaux. Cependant, avUCP semble pouvoir cumuler plusieurs des fonctions des UCP. En effet, elle est exprimée dans le muscle, comme UCP3, où une fonction découplante UCP1-like lui est attribuée (Talbot et al., 2004). Son rôle dans le muscle concerne aussi le contrôle du métabolisme lipidique, comme UCP3 (Collin et

al., 2003). De plus, elle est induite au cours du jeûne (comme UCP3) ou d'une exposition au froid, comme UCP1 (Talbot et al., 2004 ; Collin et al., 2003 ; Raimbault et al., 2001).

Comme UCP2 et UCP3, avUCP est impliquée dans le contrôle de la production de ROS mais en l'absence d'une activité découplante (Criscuolo et al., 2005). La présence d'avUCP dans la moelle osseuse, la rate et les lymphocytes du poulet (comme UCP2) suggère un rôle similaire à UCP2 dans les cellules immunitaires aviaires. Ainsi, une implication d'avUCP dans le métabolisme glucidique et de la glutamine est à envisager.

AvUCP semble posséder plusieurs fonctions ou plutôt, qu'au cours de l'évolution, les fonctions et l'expression des trois UCP de mammifères se soient retrouver en avUCP.

3/ Aspects *in vivo* et interprétations

3.1/ UCP2 et le système immunitaire

Nous avons donc vu que la signalisation par les ROS affecte l'activation et l'activité de macrophages *in vitro*. Quelles sont les conséquences sur l'organisme entier ?

3.1.1/ La distribution cellulaire

Dans le système immunitaire, l'expression d'UCP2 n'est pas exclusive aux macrophages et nous l'avons détectée dans les lymphocytes T et B, mais également dans les neutrophiles et les cellules dendritiques (Fig. 6 de l'article 1). Il est ainsi naturellement envisageable que les résultats obtenus sur la modulation des voies de signalisation dans les macrophages puissent se retrouver dans ces autres types cellulaires. En effet, des TLR sont présents à la surface des polynucléaires, des cellules dendritiques mais aussi des lymphocytes. La signalisation par les ROS est importante dans l'activation de chacune de ces cellules (Asehoune et al., 2004 ; Williams et Kwon, 2004). Enfin, l'activation des lymphocytes via la stimulation de leur TCR ou de leur BCR est dépendante des voies MAPK et des ROS (Williams et Kwon, 2004).

3.1.2/ Les cytokines

Le modèle *L. monocytogenes* a permis de mettre en évidence *in vivo* une implication d'UCP2 dans le déroulement de la réponse immunitaire avec une différence de production de cytokines et de recrutement cellulaire (Fig. 3A-B de l'article 1). Quatre jours après injection de *L. monocytogenes*, un recrutement accru de monocytes/macrophages et de neutrophiles est observé dans les rates de souris Ucp2-KO comparé à celles des souris sauvages. L'augmentation de la production de MCP-1 dans les souris Ucp2-KO favorise certainement le recrutement des neutrophiles et des macrophages. Cependant, il ne faut pas oublier la meilleure capacité de migration *in vitro* des macrophages Ucp2-KO en réponse à MCP-1. De plus, la surexpression d'UCP2 diminue la capacité de migration des monocytes (Ryu et al., 2004). Ainsi, nul doute qu'en réponse à *L. monocytogenes*, les deux phénomènes agissent en synergie. Dans le cadre du diabète de type 1 et le modèle MLDS, nous avons observé, au sein des îlots de souris Ucp2-KO, un recrutement plus important de macrophages que dans les îlots de souris sauvages pour un degré d'infiltration lymphocytaire équivalent. Cette fois, l'absence de différence de production de MCP-1 laisse penser que le phénotype est attribuable à la capacité même de migration des macrophages Ucp2-KO. Néanmoins, l'implication d'autres cytokines n'est pas exclue.

Dans le modèle listeria, nous avons également mis en évidence une production supérieure d'IL-1 β , d'IL-6 et d'IFN- γ dans les souris Ucp2-KO. Cette élévation de la concentration de ces trois cytokines et de TNF- α est également observée dans les rates de souris Ucp2-KO après une injection de LPS (Bai et al., 2005). De plus, dans le modèle murin de l'athérosclérose (EAE), les lymphocytes T CD4⁺ des souris Ucp2-KO présentent une augmentation de production de TNF- α et d'IL-2 (Vogler et al., 2006). L'influence d'UCP2 sur la production de cytokines est également confirmée dans des souris surexprimant UCP2, où la production d'IL-4 et d'IL-6 est plus faible et retardée par rapport aux souris sauvages après une injection de LPS (Horvath et al., 2003). Il en est de même dans le diabète de type 1 où la concentration d'IL-1 β dans le sérum et le pancréas est 3 à 5 fois supérieure dans les souris Ucp2-KO que les sauvages, favorisant vraisemblablement la mobilisation leucocytaire.

3.1.3/ La réponse adaptative et auto-immunité

L'absence d'UCP2 n'influence pas l'élimination de *L. monocytogenes* par les macrophages, contrairement au toxoplasme. D'autre part, avec le *T. gondii* et l'EAE, l'apparition des phénotypes est longue, une vingtaine de jours après l'injection du parasite ou du peptide de la myéline (Arsenijevic et al., 2000 ; Vogler et al., 2006). Or, l'élimination par l'organisme de *L. monocytogenes* est très rapide, inférieure à sept jours. Ainsi, cet avantage technique est probablement responsable du discret phénotype de survie.

Dans le modèle murin de la sclérose en plaque (EAE), l'apparition de signes cliniques est retardée de deux jours chez les souris Ucp2-KO (Vogler et al., 2006). Dans le modèle listeria, une différence de survie n'est observée qu'à jour 4 où le recrutement de monocytes/macrophages/neutrophiles est maintenu dans les souris Ucp2-KO. Par conséquent, il est envisageable que la réponse innée dans les souris Ucp2-KO soit tellement forte que la mise en place correcte de la réponse adaptative soit décalée. Cependant dans l'EAE, la réponse lymphocytaire est supérieure chez les souris Ucp2-KO avec une prolifération clonale des lymphocytes T augmentée, une production accrue de cytokines pro-inflammatoires et d'immunoglobulines respectivement par les lymphocytes CD4+ et B (Vogler et al., 2006). Ainsi, le rôle d'UCP2 n'est pas restreint aux cellules de l'immunité innée.

Dans le diabète de type 1, dix jours après injection de STZ, aucune souris n'est encore diabétique quel que soit le génotype. Pourtant, l'infiltration lymphocytaire des îlots est déjà plus sévère chez les souris Ucp2-KO. Cette observation est accentuée au fur et à mesure de la progression de la maladie, montrant l'importance d'UCP2 dans la réponse adaptative. A l'inverse, dans l'athérosclérose, malgré le développement de plaques plus larges et plus instables chez les souris Ucp2-KO, le recrutement des lymphocytes est similaire à celui des souris Ucp2-WT (Blanc et al., 2003).

Par contre, dans ces deux modèles, le nombre de macrophages recrutés est beaucoup plus élevé chez les souris Ucp2-KO. Dans le diabète, les macrophages sont les premières cellules recrutées dans les îlots (Hanenbergh et al., 1989) et leur rôle est primordial dans les souris NOD comme dans le modèle MLDS (chapitre III.3.2/). Dans le diabète de type 1, l'arrivée précoce et massive de macrophages hyperactifs, produisant fortement de l'IL-1 β et du NO, participe à une inflammation importante dans

les pancréas des souris Ucp2-KO. Ceci résulte en un environnement délétère au sein des îlots, dès J10. Cette action locale des macrophages programme directement la mort des cellules β mais aussi le recrutement des lymphocytes.

Dans le modèle EAE et MLDS, UCP2 est exprimée dans les cellules du système immunitaire et les cellules cibles (neurones, cellules β). Aussi, pour définir la part de chaque type cellulaire dans les phénotypes il serait intéressant d'utiliser des souris Ucp2-KO conditionnelles ou tissu-spécifiques. Ceci permettrait de séparer clairement la part des macrophages et celle des lymphocytes dans les modèles EAE et MLDS. Tout du moins, des expériences de transplantation de moelle permettraient de trancher entre un rôle entièrement immunitaire ou tissulaire d'UCP2. Enfin, comme UCP2 diminue en réponse au LPS dans les macrophages, des études clés pourraient être menées sur des souris où l'expression d'UCP2 dans les macrophages serait maintenue au cours du temps. Ainsi, la vitesse d'activation et l'activité même de ces macrophages seraient diminuées. Dans le cadre du diabète de type 1, où l'activité des macrophages est primordiale pour son déclenchement, si ces souris ont un recrutement de macrophages diminués et un diabète ralenti, cela confirmerait l'importance des macrophages dans le phénotype des souris Ucp2-KO traitées à la STZ.

Les souris NOD constituent le modèle animal de référence pour l'étude du diabète de type 1. Ainsi, l'étude de souris NOD Ucp2-KO permettrait de voir si l'absence d'UCP2 aggrave les phénotypes de la souris NOD. L'incidence ou la vitesse de développement du diabète pourrait ainsi être accrue. D'autre part, les souris NOD développent une auto-réactivité d'autres tissus comme la thyroïde ou le système nerveux central. Il se peut qu'un déficit en UCP2 puisse également affecter ces paramètres. En effet, une expression faible d'UCP2 chez des patients diabétiques de type 1 est associée à une plus forte prévalence d'une neuropathie diabétique (Rudofsky et al., 2006). L'inconvénient des souris NOD est que ce sont des animaux congéniques, croisés et sélectionnés pour leur hyper-glycémie. Par conséquent, il est possible que « l'enrichissement » génique nécessaire au développement du diabète chez la souris NOD masque un rôle d'UCP2. Il serait intéressant de déterminer le niveau d'UCP2 chez les souris NOD. Celui-ci est peut être naturellement plus faible que chez les souris C57BL/6J.

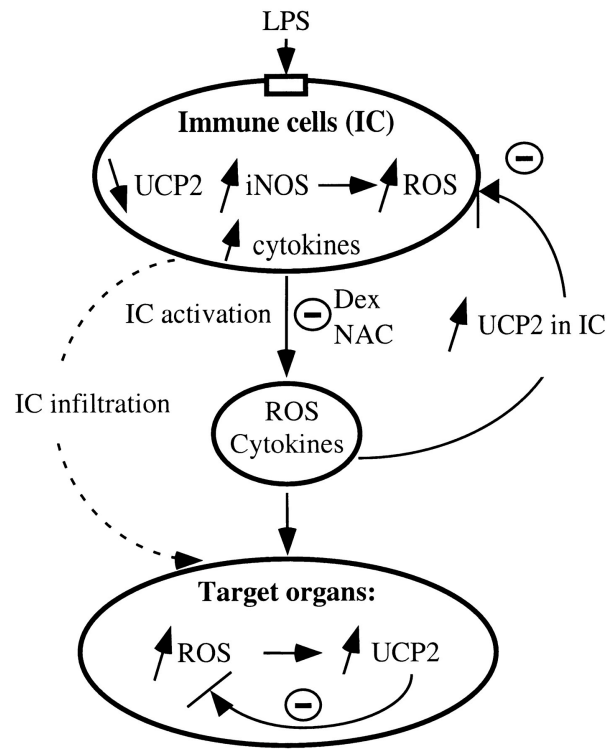


Figure 36 : Modèle en deux étapes de la régulation d'UCP2 dans le modèle LPS.

(Alves-Guerra et al., J. Biol. Chem., 2003)

Le LPS induit l'expression d'UCP2 dans les cellules immunitaires et augmente l'expression de la iNOS et de la production de cytokines conduisant au choc septique. En réponse à ce stress oxydatif, tous les organes et aussi les cellules immunitaires stimulent l'expression d'UCP2 pour prévenir un excès de radicaux libres. La dexaméthasone et la NAC, qui inhibent l'induction d'UCP2 par le LPS, diminuent la production de cytokines et le stress oxydatif.

3.2/ Théorie anti-oxydante

Une idée largement répandue est la participation d'UCP2 dans la lutte contre le stress oxydatif en cas d'infection et d'inflammation, conduisant notamment au modèle présenté dans la figure 36 (Alves-Guerra et al., 2003). Dans une première phase, la diminution d'UCP2 dans les cellules immunitaires est accompagnée d'une production de ROS et de cytokines. Dans une seconde phase tardive, UCP2 est induite dans les cellules immunitaires et tissulaires pour lutter contre le stress oxydatif généré par le système immunitaire (Alves-Guerra et al., 2003).

Les résultats obtenus au cours de ma thèse sont en contradiction avec un rôle anti-oxydant de la protéine UCP2. Un certain nombre de points peuvent être soulevés concernant : (1) les ROS du stress oxydatif, (2) l'induction d'UCP2, (3) l'utilisation des molécules anti-inflammatoires et (4) les applications de cette théorie.

3.2.1/ Les ROS du stress oxydatif

En cas d'infection/inflammation, le stress oxydatif est causé par les fortes libérations de ROS par les neutrophiles et les macrophages. Ces quantités sont telles qu'elles détériorent les cellules de l'organisme, entraînant des dysfonctions et la mort cellulaire. D'un autre côté, la mitochondrie est certes une source de ROS mais comparée aux quantités dégagées par la NADPH oxydase, son activité est négligeable. Sachant qu'UCP2 bloque la production mitochondriale de ROS (Fig. 2 de l'article 2 ; Bai et al., 2005), une question se pose. Quel est l'intérêt pour la cellule de réguler la faible production de ROS mitochondriaux, c'est-à-dire endogènes, lorsque le stress qu'elle subit provient des ROS exogènes ? (Fig. 37).

3.2.2/ L'induction d'UCP2

Nous avons montré que la diminution d'UCP2 fait partie du processus d'activation des macrophages (Fig. 8A de l'article 2), ce qui est donc en accord avec la première phase du modèle. Cependant, la deuxième phase est sujette à controverse.

3.2.2.1/ In vitro

In vitro, aucune induction de la protéine UCP2 n'a jamais été obtenue ni par le LPS, ni avec des donneurs de ROS ou de NO ni par des molécules induisant la production de ROS cellulaire (paraquat, vanadate) et ce quelque soit le type cellulaire,

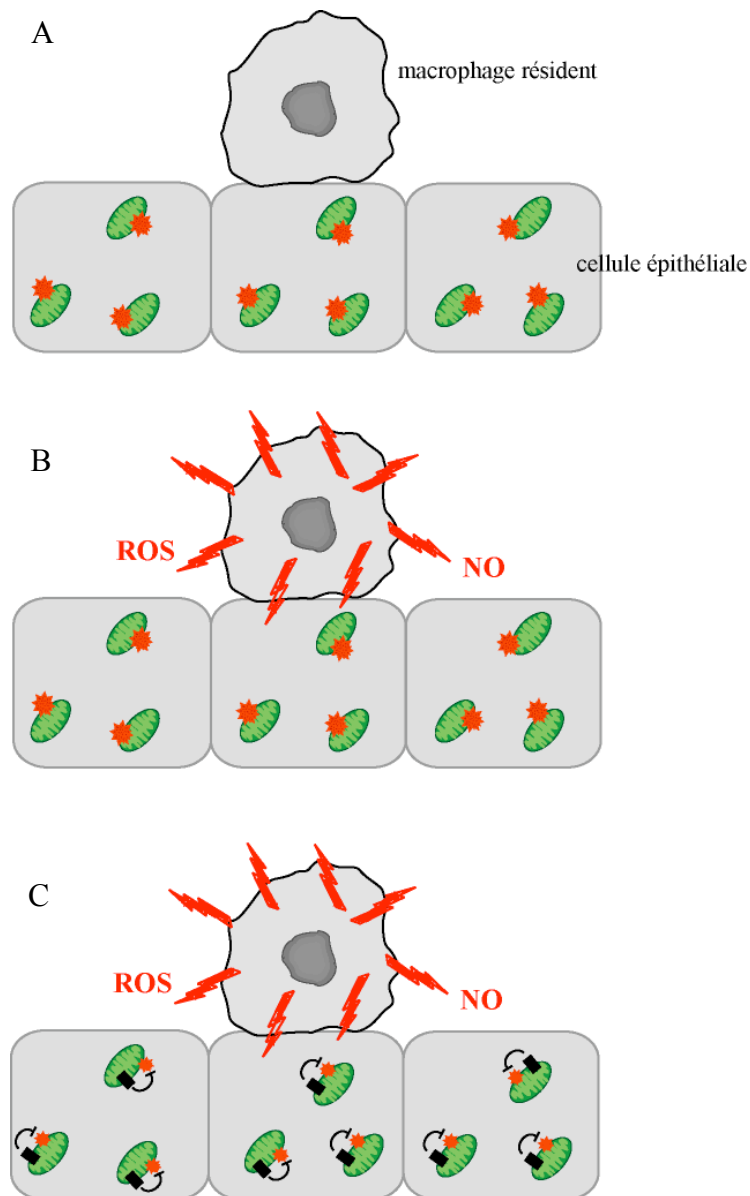


Figure 37 : Le stress oxydatif et la théorie anti-oxydante.

(A) Des macrophages résident dans un tissu (par exemple, le poumon). Chaque cellule possède un certain nombre de mitochondries qui produisent des ROS en continue.

(B) Une injection de LPS stimule les macrophages qui produisent du NO et des ROS, agressant les cellules du tissu.

(C) La théorie anti-oxydante (Alves-Guerra et al., 2003) propose que la protéine anti-oxydante UCP2 serait induite dans les mitochondries des tissus afin de limiter la faible production de ROS mitochondriaux et ainsi préserver les cellules des dommages oxydatifs. A quoi sert de limiter la faible production de ROS mitochondriaux face aux quantités gigantesques de ROS et de NO produites par les macrophages ?

(macrophages, cellules du colon, du poumon, du foie). De plus, le traitement des macrophages au LPS \pm IFN- γ induit une baisse précoce d'UCP2 et aucune ré-induction n'est observée même après 72 heures de traitement. Les cytokines, IL-1 β et TNF- α induisent également une diminution d'UCP2, mais dans aucun cas une augmentation. Un traitement à l'IL-10 de macrophages stimulés au LPS ne permet pas non plus de réinduire UCP2. Ainsi, UCP2 ne semble pas être directement inductible par les ROS, le NO ou des cytokines, quel que soit le type cellulaire.

Dans ce cas, comment concilier l'augmentation d'UCP2 *in vivo* dans le poumon et la rate après injection de LPS (Alves-Guerra et al., 2003) en l'absence d'induction *in vitro* ?

3.2.2.2/ *In vivo*

Les études de transplantation de moelle osseuse ont montré que l'augmentation du signal UCP2 après LPS dans le poumon provient en grande partie des cellules immunitaires (Alves-Guerra et al., 2003). L'interprétation a été une induction dans les cellules immunitaires pour lutter contre les ROS de l'inflammation (Alves-Guerra et al., 2003). Cependant, les organes ne sont pas des systèmes figés. Dans cette analyse, le recrutement des macrophages et des polynucléaires en réponse au LPS n'a pas été pris en compte. Cette infiltration augmente la part de cellules immunitaires dans l'organe (poumon). C'est l'infiltration qui apportent donc le signal de « l'induction », sans qu'il y ait une induction dans chacune des cellules immunitaires. C'est exactement le phénomène qui se produit dans le foie de souris ayant reçu un régime riche en graisse. Les hépatocytes n'expriment pas la protéine UCP2 et aucun signal UCP2 n'est observé dans des mitochondries de foie de souris normale (Alves-Guerra et al., 2006). Après un régime riche en graisse, un signal UCP2 est détecté dans les mitochondries de foie mais il provient uniquement des cellules immunitaires infiltrées (Alves-Guerra et al., 2006). Il faut ainsi être prudent quant aux conclusions tirées des variations tissulaires du signal UCP2 avant d'avoir déterminé la nature des cellules impliquées. En effet, l'expression de cd11b (un marqueur des macrophages, entre autre) augmente dans le poumon après une injection de LPS mais personne ne conclura que l'induction de cd11b permet de lutter contre un stress oxydatif. Ainsi, regarder l'augmentation d'UCP2 dans le poumon n'est pas informatif sur un rôle anti-oxydant d'UCP2 et ne reflète que l'infiltration des cellules immunitaires, comme tout autre marqueur de cellules du système immunitaire inné.

Il est également intéressant de mentionner les résultats obtenus dans la rate après injection de *L. monocytogenes*. Nous avons montré que l'expression d'UCP2 varie au cours du temps (cf Fig. 24) après infection mais n'est pas corrélée avec les productions des cytokines mesurées (IFN- γ , IL-1 β , IL-6, MCP-1 ; cf Fig. 25). Ces variations d'UCP2 s'expliquent par l'infiltration des macrophages/neutrophiles (Fig. 3A-B de l'article 1) mais aussi par la mise en place de la réponse adaptative, c'est-à-dire une modification des types lymphocytaires en présence. De même, l'immunisation des souris avec le peptide de la myéline induit des modifications d'expression d'UCP2 (Vogler et al., 2006). En ce qui concerne le LPS, il a été montré que l'injection de LPS induit un remaniement des populations lymphocytaires dans la rate (Groeneveld et al., 1983 ; Norimatsu et al., 1995). Ainsi, « l'induction » après LPS dans la rate est certainement une conséquence d'un remaniement cellulaire au sein de l'organe.

Les interprétations sur organe entier sont difficiles d'une part à cause de l'infiltration immunitaire et des remaniements cellulaires et d'autre part à cause de l'expression d'UCP2 dans les cellules immunitaires et les cellules de certains tissus. Il serait nécessaire de pouvoir détecter le signal UCP2 à l'intérieur de chaque cellule par cytométrie, par exemple. Cependant, l'absence d'anticorps spécifiques rend cette approche impossible pour l'instant.

3.2.3/ Les molécules anti-inflammatoires

Des études ont été réalisées dans le laboratoire en utilisant des molécules anti-inflammatoires (la dexaméthasone et la N-acétyl-cystéine) pour argumenter en faveur d'une induction d'UCP2 en réponse à un stress oxydatif. L'injection de dexaméthasone ou de la NAC après LPS, prévient l'induction d'UCP2 dans le poumon et la rate (Alves-Guerra et al., 2003). L'interprétation proposée est un blocage par la dexaméthasone de la voie de signalisation responsable de l'induction d'UCP2 tandis que la NAC, un anti-oxydant, empêche directement la traduction d'UCP2, allant dans le sens d'un rôle anti-oxydant d'UCP2. Cependant, il serait plus logique d'interpréter ces expériences comme un blocage de l'activation des macrophages alvéolaires résidents. En effet la dexaméthasone est un anti-inflammatoire tandis que la NAC inhibe la signalisation intracellulaire, comme nous l'avons vu dans le chapitre sur les ROS et la signalisation (chapitre II.5.3/). Ce blocage de l'activation des cellules immunitaires diminue les capacités de production de NO, l'intensité de l'explosion oxydative mais aussi la production de cytokines. Ainsi, les macrophages alvéolaires sont inhibés. Or, leur rôle

crucial a clairement été établi dans le recrutement de neutrophiles et de monocytes/macrophages en réponse au LPS (Maus et al., 2002). Par conséquent, le recrutement de neutrophiles et macrophages est supprimé ou du moins fortement réduit. Cette action inhibitrice sur le recrutement cellulaire a aussi été montrée pour la NAC comme pour la dexaméthasone (Rocksén et al., 2000). Ainsi, ces expériences ne montrent pas une induction d'UCP2 pour lutter contre le stress oxydatif. Ces données démontrent seulement que lorsque l'activation du système immunitaire est bloquée, le signal UCP2 dans l'organe n'augmente pas. En prenant également en compte l'impossibilité d'induire UCP2 *in vitro* quelque soit le type cellulaire ou le traitement (LPS, ROS, NO ou cytokines), UCP2 n'est pas induite en réponse à un stress oxydant/inflammatoire.

Pour approfondir l'étude de l'induction d'UCP2 dans les cellules épithéliales en réponse au ROS, il faudrait, par exemple, regarder l'effet du LPS sur UCP2 dans des souris surexprimant la superoxyde dismutase ou la catalase spécifiquement dans les cellules épithéliales du poumon ou d'autres tissus. Il serait ainsi possible de voir si une lutte anti-oxydante accrue prévient réellement l'induction d'UCP2.

3.2.4/ Applications de la théorie anti-oxydante

A ce jour, les seuls arguments en faveur d'un rôle anti-oxydant sont des études associant une expression d'UCP2 à des situations de stress oxydant (Pecqueur et al. 2001 ; Alves-Guerra et al., 2003 ; Blanc et al., 2003). Le plus souvent, il s'agit seulement de modifications de l'ARNm (Segersvard et al., 2005 ; Clavel et al., 2003 ; Diano et al., 2003) alors qu'un contrôle traductionnel est clairement établi (Pecqueur et al., 2001 ; Hurtaud et al., 2006). Néanmoins, aucune relation de cause à effet n'a pour l'instant jamais été clairement établie. En effet, la seule observation d'une augmentation d'expression n'est pas une preuve en soi d'un rôle protecteur d'UCP2. De plus, les effets protecteurs rapportés dans le cerveau concernent des études de surexpression imputant un rôle découplant à UCP2, responsable d'une neuroprotection (Conti et al., 2005 ; Mattiasson et al., 2003 ; Andrews et al., 2002). Cependant, cela ne démontre pas qu'une expression endogène d'UCP2 ait une fonction anti-oxydante.

Un autre argument en défaveur d'un rôle anti-oxydant d'UCP2 vient de l'étude des souris KO pour la MnSOD. La délétion de la MnSOD, principale enzyme en charge de la défense contre les ROS mitochondriaux, provoque la mort des souris dans les 10 premiers jours de la vie (Li et al., 1995) avec des défauts de fonctionnement de la

chaîne respiratoire (complexes I et II), une inactivation de 70 à 90% de l'aconitase mitochondriale, une accumulation de dommages oxydatifs de l'ADN (Li et al., 1995 ; Melov et al., 1999). Cependant, une telle altération n'a jamais été rapportée pour les souris Ucp2-KO, réfutant clairement une implication majeure d'UCP2 dans la lutte anti-oxydante. Par ailleurs, l'absence d'UCP2 chez les souris UCP2-KO n'affecte ni leur survie ni leur comportement après une injection de LPS (Pecqueur et al., 2001 ; Bai et al., 2005), ce qui est assez surprenant si l'induction d'UCP2 permettait une lutte active contre les dommages oxydatifs au cours de l'inflammation. Enfin la surexpression de la MnSOD diminue fortement les taux de ROS mitochondriaux mais ne modifie pas l'activité des UCP (Silva et al., 2005), une diminution de leur expression aurait été légitimement attendue.

En conclusion, une fonction ou une propriété anti-oxydante d'une molécule réside dans sa capacité à éliminer les ROS ou des molécules oxydées. Ainsi, les vitamines C et E sont des molécules anti-oxydantes. D'autre part, la superoxyde dismutase, la catalase ou la glutathion peroxydase sont des enzymes anti-oxydantes. UCP2 n'entre dans aucune de ces deux catégories puisqu'elle freine la production de ROS mitochondriaux (article 2 ; Bai et al., 2005), elle n'élimine pas les ROS produits.

UCP2 ne semble donc pas avoir de rôle anti-oxydant. Néanmoins, la question suivante subsiste, pourquoi l'injection de LPS induit-elle une augmentation d'UCP2 *in vivo* dans les cellules (non immunitaires) du poumon et de l'intestin ? Nous tenterons de répondre à cette question dans le paragraphe suivant.

3.3/ Le LPS et le métabolisme en réponse à l'agression

L'injection de LPS constitue une agression pour l'organisme. La réponse à l'agression n'est pas qu'une simple production de ROS, de NO ou de cytokines, c'est une réponse métabolique. C'est une multitude de modifications immunologiques, neuronales et endocriniennes qui ont des conséquences métaboliques et nutritionnelles.

Le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines est profondément perturbé. L'insulinémie, ainsi que la glycémie, augmentent à cause d'une résistance périphérique à l'insuline et de l'élévation des taux de glucagon, de cortisol et des cathécholamines. Ces changements sont aussi accompagnés de l'augmentation des taux de triglycérides et d'un hyper-catabolisme protéique, favorisant notamment la néo-

glucogenèse. Les taux de glutamine circulant et urinaire sont diminués, synonyme d'une forte consommation de cet acide aminé au cours de la réponse à l'agression. Par ailleurs, la captation de glucose est augmentée dans les cellules immunitaires et le cerveau alors qu'elle est diminuée par les tissus périphériques comme le muscle et le tissu adipeux.

Au vu de nos résultats sur le métabolisme et la réponse immunitaire, nous pouvons aisément envisager que l'induction d'UCP2 dans les cellules de l'intestin et du poumon (Pecqueur et al., 2001 ; Alves-Guerra et al., 2003) est en fait une adaptation du métabolisme de ces cellules à leur nouvel environnement. Au cours de la réponse à l'agression, les besoins en glutamine sont très importants dans les entérocytes, les cellules immunitaires comme pour les tissus lésés. Ainsi, les cellules immunitaires ont besoin de glutamine pour leur activité qui ne nécessite pas une glutaminolyse oxydative, comme nous l'avons vu avec la diminution d'UCP2 dans les macrophages. A l'inverse, les autres cellules (entérocytes, pneumocytes) se servent de la glutamine à la place du glucose. Dans ce cas, UCP2 serait induit pour favoriser l'oxydation de la glutamine. Par conséquent, l'induction tissulaire d'UCP2 est plus en rapport avec une adaptation métabolique qu'une hypothétique lutte contre le stress oxydatif. L'injection de LPS aux souris Ucp2-KO et Ucp2-WT et le dosage au cours du temps des différents métabolites dans le sang pourrait apporter des réponses quant au rôle métabolique d'UCP2 dans la réponse à l'agression. En effet, ceci permettrait de comparer une réponse métabolique normale nécessitant l'induction d'UCP2 dans divers tissus (souris Ucp2-WT), à celle des souris déficientes en Ucp2, incapables d'induire UCP2 en réponse à l'agression.

3.4/ Les îlots de Langerhans et l'insuline

3.4.1/ La sécrétion d'insuline

Nous n'avons pas observé de différence dans le rapport ATP/ADP entre les macrophages Ucp2-WT et Ucp2-KO avant comme après stimulation au LPS. De plus, les macrophages Ucp2-WT ont un statut redox plus réduit que les macrophages Ucp2-KO (Fig. 12 de l'article 4). Ces deux points s'opposent à un rôle découplant d'UCP2 et réfutent ainsi l'hypothèse du contrôle de la sécrétion d'insuline par un découplage de la respiration via UCP2 (Zhang et al., 2001). Néanmoins, les ROS, plus particulièrement l' H_2O_2 , est un sécrétagogue (Pi et al., 2007). Ainsi, la sécrétion plus importante d'insuline par les cellules β -pancréatiques Ucp2-KO peut concerner la signalisation par

les ROS, comme c'était le cas avec les MAPK dans les macrophages.

Dans notre laboratoire, les souris Ucp2-KO et Ucp2-WT sur un fond génétique pur C57BL/6J ne présentent pas de différence de glycémie, contrairement au groupe de Lowell (Zhang et al., 2001). Ce groupe élève les souris sur un fond génétique différent, 129 « white-bellied agouti ». Les différences concernant la glycémie peuvent soit provenir du fond génétique et donc être indépendant d'UCP2, soit l'activité d'UCP2 est dépendante du fond génétique en ce qui concerne la glycémie. Le fond génétique s'est auparavant révélé crucial pour les souris Ucp1-KO. En effet, sur le fond 129S3Sv/ImJ, plus de 80% des souris Ucp1-KO survivent à une exposition au froid contre seulement 30% sur le fond C57BL/6J (Ukropec et al., 2006).

Néanmoins, une influence d'UCP2 sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose n'est obtenue que dans des études où UCP2 est sur-exprimée à des niveaux élevés (Chan et al., 1999 et 2001), responsables d'artefacts et de résultats non spécifiques bien décrits pour les UCP (Harper et al, 2002 ; Brand et Esteves 2005). Un autre argument est qu'une sur-expression plus modérée ne modifie pas la sécrétion d'insuline par les îlots, ni la glycémie des souris (Produit-Zengaffinen et al., 2007). D'autre part, l'utilisation de siRNA dirigés contre UCP2 n'a pas d'influence sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose dans les cellules INS-1 (Bordone et al., 2006). De plus, il existe une grande hétérogénéité dans l'effet de la surexpression d'UCP2 sur les îlots selon les publications, diminuant ou pas le niveau basal d'insuline (Chan et al., 1999 et 2001 ; Joseph et al., 2002 et 2004). Enfin, les îlots de souris Ucp2-KO ont le même contenu en insuline que les îlots de souris sauvages (Zhang et al., 2001).

En fait, seules des données corrélatives entre la sécrétion d'insuline et le niveau d'UCP2 étayaient l'hypothèse de l'implication d'UCP2 dans la sécrétion d'insuline. La démonstration définitive d'un rôle physiologique lié à l'insuline nécessiterait l'observation d'une diminution rapide d'UCP2 dans les cellules β (ou les îlots) en réponse au glucose pour permettre la sécrétion d'insuline, comme cela se produit dans les macrophages après une stimulation par le LPS. Or, cela n'a jamais été décrit.

En conclusion, entre les fonds génétiques, la nourriture et les artefacts de surexpression, le mystère plane quant à une réelle implication physiologique d'UCP2 sur la sécrétion d'insuline. Néanmoins, si tel était le cas, l'hypothèse d'une altération du métabolisme énergétique, responsable d'une production de ROS favorisant la sécrétion d'insuline en l'absence d'UCP2, est à prendre en compte.

3.4.2/ Les macrophages et les îlots de Langerhans

La présence du gène *Ucp2* dans une région chromosomique associée à l'hyperinsulinémie et l'obésité (Fleury et al., 1997) a entraîné la réalisation d'un certain nombre d'études sur la modulation d'UCP2 dans des îlots à la suite de divers traitements ou régime alimentaire infligés aux souris.

Ainsi, après un régime riche en lipide, UCP2 est augmenté dans les îlots de rats (Chan et al., 2001). Il en est de même dans les îlots de rats Goto-Kakizaki (GK), un modèle spontané pour l'étude du diabète de type 2 (Briaud et al., 2002). De même, dans les îlots de rats Zucker fa/fa non diabétiques et de rats Wistar, l'expression d'UCP2 est augmentée par 5 jours de perfusion de glucose alors que des temps plus courts de 8 heures à 2 jours n'ont aucun effet (Kassis et al., 2000). Enfin, l'expression d'UCP2 dans les îlots de rats Zucker fa/fa diabétiques est supérieure à celle des îlots de rats Zucker non diabétiques (Kassis et al., 2000). Dans ces cas, la modulation d'UCP2 dans les îlots est toujours attribuée à une augmentation d'expression dans les cellules β . Cependant la présence de macrophages dans les îlots de Langerhans est malheureusement oubliée et leur importance souvent occultée. En effet, chez les rats GK, le nombre de macrophages et de neutrophiles augmente fortement dans les îlots avec l'évolution de la maladie (Homo-Delarche et al., 2006). Ainsi, le signal UCP2 dans les îlots ne peut pas être seulement restreint à une induction dans les cellules β . Comme pour le poumon après un traitement au LPS, il peut s'agir d'un recrutement de macrophages. Enfin, l'expression d'UCP2 dans les cellules à glucagon et à somatostatine n'ayant jamais été étudiée, leur implication ne peut être réfutée.

Tandis que le diabète de type 1 est défini comme une maladie inflammatoire chronique, le rôle de l'inflammation est de plus en plus étudiée dans le diabète de type 2 (Dandona et al., 2004 ; Wellen et Hotamisligl, 2005). Avec les données sur l'infiltration des cellules de l'immunité innée dans les îlots de rats diabétiques (Homo-Delarche et al., 2006) et nos résultats sur le rôle d'UCP2 dans les macrophages au cours du diabète de type 1, UCP2 ne constituerait-il pas un lien entre le diabète de type 1 et de type 2 ?

Il est intéressant de noter que l'absence d'UCP2 favorise le développement du diabète auto-immun, elle est donc délétère pour l'organisme. A l'inverse, dans le diabète de type 2, comme le montre les études sur les souris ob/ob *Ucp2*-KO, l'absence d'UCP2 permet une meilleure sécrétion d'insuline (Zhang et al., 2001). Le

polymorphisme -866G/A du promoteur d'Ucp2 module l'expression d'UCP2. Les personnes porteuses de l'allèle G ont une expression d'UCP2 diminuée comparés aux porteurs de l'allèle A. Les études de génétique humaine ont ainsi associé l'allèle A à une risque accru de développer un diabète de type 2 ou des complications liées (D'Adamo et al., 2004 ; Gable et al., 2006 ; Sasahara et al., 2004 ; Yamasaki et al., 2006). A l'inverse, les porteurs de l'allèle G ont un risque accru de développer une neuropathie associée au diabète de type 1 (article 3, Rudofsky et al., 2006).

4/ Conclusions et perspectives

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à différents domaines de la biologie pour comprendre la fonction d'UCP2. Les études métaboliques dans les macrophages ont montré que la modulation d'UCP2 participe au changement de substrat énergétique, contrôlant l'oxydation de la glutamine et du glucose. Au niveau cellulaire, la diminution d'UCP2 après stimulation favorise la production de ROS mitochondriaux, potentialisant l'activation des MAPK et donc l'activité des macrophages et des cellules immunitaires. Si l'on s'intéresse à l'organisme entier, la conséquence est que le système immunitaire des souris Ucp2-KO est plus réactif. Cet avantage lors d'infections (toxoplasme, listeria) se révèle être délétère dans certaines maladies inflammatoires ou auto-immunes.

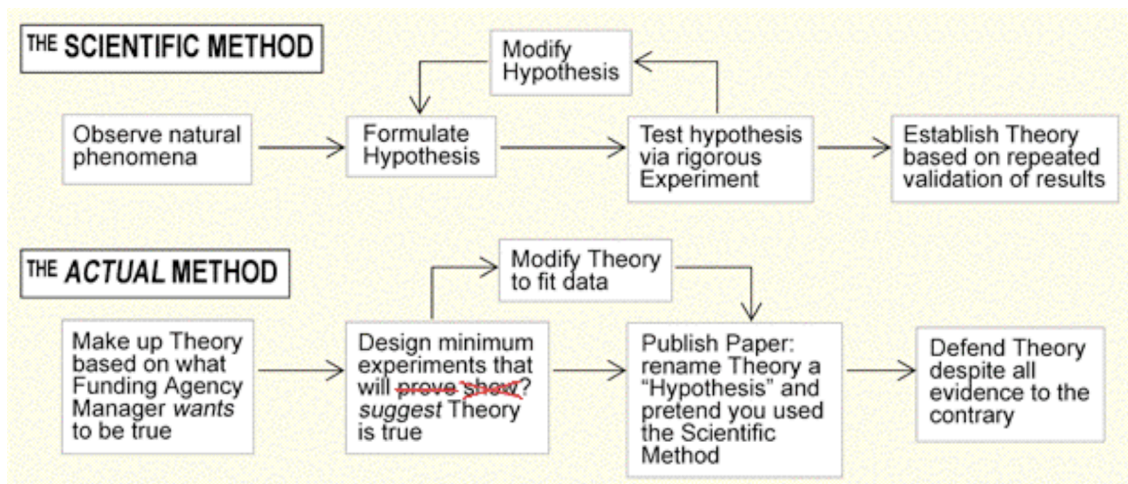
Les interactions protéiques au sein de la membrane mitochondriale interne sont complexes. Chaque complexe de la chaîne respiratoire est composée de multiples sous-unités (45 pour le complexe I, par exemple). Aussi, la recherche de partenaire d'UCP2 semble être une piste intéressante. En effet, les transporteurs mitochondriaux fonctionnent en oligomère. Il est possible qu'en fonction du tissu (macrophage ou cellule \square), un partenaire différent lui soit associé, responsable d'une activité différente et propre à la cellule. La courte demi-vie d'UCP2 et sa faible abondance dans la membrane interne laisse penser qu'elle n'est requise que pour une action fine pendant une durée précise.

Dans certaines conditions particulières, UCP2 semble capable de découpler la respiration de la synthèse d'ATP, mais là n'est pas sa fonction principale. L'activité de transport d'UCP2 reste pour l'instant inconnue. La découverte de celle-ci nécessiterait

une évolution technologique permettant sa reconstitution dans un état fonctionnel dans des liposomes pour déterminer les molécules transportées.

De nos résultats, il apparaît clairement que le métabolisme et la réponse immunitaire sont liés. Nous avons montré que le déficit en une protéine du métabolisme, UCP2, a des répercussions sur le développement de la réponse immune. A ce jour, de nombreuses déficiences du métabolisme mitochondrial ont été associées à des pathologies humaines non-immunitaires. Certaines pathologies immunitaires sont dues à des mutations dans des gènes codant des cytokines ou leurs récepteurs, ou d'autres protéines affectant la signalisation cellulaire. Par conséquent, les capacités d'activation ou de différenciation des cellules sont affectées. Le métabolisme des cellules immunitaires changent lors de leur activation, il est envisageable que des défauts immunitaires soient consécutifs à des problèmes métaboliques apparaissant lors de l'activation de certaines cellules immunitaires dont le métabolisme est particulier, comme c'est le cas avec UCP2. Par conséquent, la compréhension du métabolisme des cellules immunitaires paraît importante pour l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Enfin, quelques mots sur la génétique du diabète. *Ucp2* ne se situe pas dans une région de susceptibilité au diabète de type 1 répertoriée chez l'homme ou chez la souris. Cependant, le polymorphisme -866G/A influence la survenue d'une neuropathie associée au diabète chez les patients diabétiques, l'allèle G favorisant la maladie (Rudofsky 2 et al., 2006). Cet allèle G est associée à une plus faible expression d'UCP2 dans les cellules immunitaires que l'allèle A. Enfin, il a été associé à une susceptibilité accrue de développer une sclérose en plaque (Vogler et al., 2005). Il est ainsi légitime de penser que l'étude cas/témoin de ce polymorphisme dans le cadre du diabète de type 1 peut se révéler fructueux. Ainsi, *Ucp2* peut-il représenter une troisième région d'intérêt s'ajoutant aux IDDM1 et IDDM2 ?



RÉFÉRENCES

Adam-Vizi V., Chinopoulos C. (2006). Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 639-645.

Alcamo E., Mizgerd J.P., Horwitz B.H., Bronson R., Beg A.A., Scott M., Doerschuk C.M., Hynes R.O., Baltimore D. (2001). Targeted mutation of TNF receptor I rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NF-kappa B in leukocyte recruitment. *J. Immunol.* 167, 1592-1600.

Alves-Guerra M.C., Rousset S., Pecqueur C., Mallat Z., Blanc J., Tedgui A., Bouillaud F., Cassard-Doulcier A.M., Ricquier D., Miroux B. (2003). Bone marrow transplantation reveals the in vivo expression of the mitochondrial uncoupling protein 2 in immune and nonimmune cells during inflammation. *J. Biol. Chem.* 278, 42307-12.

Andrews Z.B., Horvath B., Barnstable C.J., Elsworth J., Yang L., Beal M.F., Roth R.H., Matthews R.T., Horvath T.L. (2005). Uncoupling protein-2 is critical for nigral dopamine cell survival in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 25, 184-91.

Andreyev A.Y., Kushnareva Y.E., Starkov A.A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry* 70, 200-14.

Arsenijevic D., Onuma H., Pecqueur C., Raimbault S., Manning B.S., Miroux B., Couplan E., Alves-Guerra M.C., Gubern M., Surwit R., Bouillaud F., Richard D., Collins S., Ricquier D. (2000). Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat. Genet.* 26, 435-9.

Asehnoune K., Strassheim D., Mitra S., Kim J.Y., Abraham E. (2004). Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B. *J. Immunol.* 172, 2522-9.

Atkinson M.A., Eisenbarth G.S. (2001). Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet.* 358, 221-9.

Awata T., Kurihara S., Iitaka M., Takei S., Inoue I., Ishii C., Negishi K., Izumida T., Yoshida Y., Hagura R., Kuzuya N., Kanazawa Y., Katayama S. (1998). Association of CTLA-4 gene A-G polymorphism (IDDM12 locus) with acute-onset and insulin-depleted IDDM as well as autoimmune thyroid disease (Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis) in the Japanese population. *Diabetes.* 47, 128-9.

Bai Y., Onuma H., Bai X., Medvedev A.V., Misukonis M., Weinberg J.B., Cao W., Robidoux J., Floering L.M., Daniel K.W., Collins S. (2005). Persistent nuclear factor-kappa B activation in Ucp2^{-/-} mice leads to enhanced nitric oxide and inflammatory cytokine production. *J. Biol. Chem.* 280, 19062-9.

Baldrige C.W., Gerard R.W. (1933). The extra respiration of phagocytosis. *Am. J. Physiol* 103, 235-236.

- Bedard K., Krause K.H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245-313.
- Bennett S.T., Todd J.A. (1996). Human type 1 diabetes and the insulin gene: principles of mapping polygenes. *Annu. Rev. Genet.* 30, 343-70.
- Bienengraeber M., Echtay K.S., Klingenberg M. (1998). H⁺ transport by uncoupling protein (UCP-1) is dependent on a histidine pair, absent in UCP-2 and UCP-3. *Biochemistry.* 37, 3-8.
- Blanc J., Alves-Guerra M.C., Esposito B., Rousset S., Gourdy P., Ricquier D., Tedgui A., Miroux B., Mallat Z. (2003). Protective role of uncoupling protein 2 in atherosclerosis. *Circulation.* 107, 388-90.
- Blanchette J., Jaramillo M., Olivier M. (2003). Signalling events involved in interferon-gamma-inducible macrophage nitric oxide generation. *Immunology.* 108, 513-22.
- Blander J.M., Medzhitov R. (2006). On regulation of phagosome maturation and antigen presentation. *Nat. Immunol.* 7, 1029-35.
- Bleich D., Chen S., Zipser B., Sun D., Funk C.D., Nadler J.L. (1999). Resistance to type 1 diabetes induction in 12-lipoxygenase knockout mice. *J. Clin. Invest.* 103, 1431-6.
- Bloom J., Amador V., Bartolini F., DeMartino G., Pagano M. (2003). Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitinylation. *Cell.* 115, 71-82.
- Bouillaud F., Ricquier D., Thibault J., Weissenbach J. (1985). Molecular approach to thermogenesis in brown adipose tissue: cDNA cloning of the mitochondrial uncoupling protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 82, 445-8.
- Bordone L., Motta M.C., Picard F., Robinson A., Jhala U.S., Apfeld J., McDonagh T., Lemieux M., McBurney M., Szilvasi A., Easlson E.J., Lin S.J., Guarente L. (2006) Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol.* 4:e31.
- Bosisio D., Polentarutti N., Sironi M., Bernasconi S., Miyake K., Webb G.R., Martin M.U., Mantovani A., Muzio M. (2002). Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood.* 99, 3427-31.
- Brand M.D., Affourtit C., Esteves T.C., Green K., Lambert A.J., Miwa S., Pakay J.L., Parker N. (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med.* 37, 755-67.
- Brand M.D., Esteves T.C. (2005). Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab.* 2, 85-93.
- Brentjens R., Saltz L. (2001). Islet cell tumors of the pancreas: the medical oncologist's perspective. *Surg. Clin. North. Am.* 81, 527-42.

- Briaud I., Kelpe C.L., Johnson L.M., Tran P.O., Poitout V. (2002). Differential effects of hyperlipidemia on insulin secretion in islets of langerhans from hyperglycemic versus normoglycemic rats. *Diabetes*. 51, 662-8.
- Brown K., Gerstberger S., Carlson L., Franzoso G., Siebenlist U. (1995). Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science*. 267, 1485-8.
- Brustovetsky N., Klingenberg M. (1994). The reconstituted ADP/ATP carrier can mediate H⁺ transport by free fatty acids, which is further stimulated by mersalyl. *J Biol Chem*. 269, 27329-36.
- Bustos R., Sobrino F. (1992). Stimulation of glycolysis as an activation signal in rat peritoneal macrophages. Effect of glucocorticoids on this process. *Biochem J*. 282, 299-303.
- Cakir Y., Ballinger S.W. (2005) Reactive species-mediated regulation of cell signaling and the cell cycle: the role of MAPK. *Antioxid Redox Signal*. 7, 726-40.
- Campo P.A., Das S., Hsiang C.H., Bui T., Samuel C.E., Straus D.S. (2002). Translational regulation of cyclin D1 by 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2). *Cell Growth Differ*. 13, 409-20.
- Cannon B., Nedergaard J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev*. 84, 277-359.
- Cao Z., Henzel W.J., Gao X. (1996a). IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science*. 271, 1128-31.
- Cao Z., Xiong J., Takeuchi M., Kurama T., Goeddel D.V. (1996b). TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature*. 383, 443-6.
- Cetkovic-Cvrlje M., Gerling I.C., Muir A., Atkinson M.A., Elliott J.F., Leiter E.H. (1997). Retardation or acceleration of diabetes in NOD/Lt mice mediated by intrathymic administration of candidate beta-cell antigens. *Diabetes*. 46, 1975-82.
- Chan C.B., MacDonald P.E., Saleh M.C., Johns D.C., Marban E., Wheeler M.B. (1999). Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets. *Diabetes*. 48, 1482-6.
- Chan C.B., De Leo D., Joseph J.W., McQuaid T.S., Ha X.F., Xu F., Tsushima R.G., Pennefather P.S., Salapatek A.M., Wheeler M.B. (2001). Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes*. 50, 1302-10.
- Chance B., Sies H., Boveris A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev*. 59, 527-605.
- Chen K., Vita J.A., Berk B.C., Keaney J.F. Jr. (2001a). c-Jun N-terminal kinase

activation by hydrogen peroxide in endothelial cells involves SRC-dependent epidermal growth factor receptor transactivation. *J. Biol. Chem.* 2001 May 11;276(19):16045-50.

Chen P., Li J., Barnes J., Kokkonen G.C., Lee J.C., Liu Y. (2002). Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Immunol.* 169, 6408-16.

Chen Q., Vazquez E.J., Moghaddas S., Hoppel C.L., Lesnefsky E.J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem.* 278, 36027-31.

Chen Z.J. (2005a). Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat. Cell. Biol.* 758-65.

Chen H., Li X., Epstein P.N. (2005b). MnSOD and catalase transgenes demonstrate that protection of islets from oxidative stress does not alter cytokine toxicity. *Diabetes.* 54, 1437-46.

Chevillotte E., Giralt M., Miroux B., Ricquier D., Villarroya F. (2007). Uncoupling protein-2 controls adiponectin gene expression in adipose tissue through the modulation of reactive oxygen species production. *Diabetes.* 56, 1042-50.

Christianson S.W., Shultz L.D., Leiter E.H. (1993). Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes.* 42, 44-55.

Clavel S., Paradis E., Ricquier D., Richard D. (2003). Kainic acid upregulates uncoupling protein-2 mRNA expression in the mouse brain. *Neuroreport.* 14, 2015-7.

Collin A., Buyse J., van As P., Darras V.M., Malheiros R.D., Moraes V.M., Reyns G.E., Taouis M., Decuypere E. (2003). Cold-induced enhancement of avian uncoupling protein expression, heat production, and triiodothyronine concentrations in broiler chicks. *Gen. Comp. Endocrinol.* 130, 70-7.

Conti B., Sugama S., Lucero J., Winsky-Sommerer R., Wirz S.A., Maher P., Andrews Z., Barr A.M., Morale M.C., Paneda C., Pemberton J., Gaidarova S., Behrens M.M., Beal F., Sanna P.P., Horvath T., Bartfai T. (2005). Uncoupling protein 2 protects dopaminergic neurons from acute 1,2,3,6-methyl-phenyl-tetrahydropyridine toxicity. *J. Neurochem.* 93, 493-501.

Conti B., Sanchez-Alavez M., Winsky-Sommerer R., Morale M.C., Lucero J., Brownell S., Fabre V., Huitron-Resendiz S., Henriksen S., Zorrilla E.P., de Lecea L., Bartfai T. (2006). Transgenic mice with a reduced core body temperature have an increased life span. *Science.* 314, 825-8.

Coppola A., Liu Z.W., Andrews Z.B., Paradis E., Roy M.C., Friedman J.M., Ricquier D., Richard D., Horvath T.L., Gao X.B., Diano S. (2007). A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell. Metab.* 5, 21-33.

- Costa Rosa L.F., Curi R., Murphy C., Newsholme P. (1995). Effect of adrenaline and phorbol myristate acetate or bacterial lipopolysaccharide on stimulation of pathways of macrophage glucose, glutamine and O₂ metabolism. Evidence for cyclic AMP-dependent protein kinase mediated inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase and activation of NADP⁺-dependent 'malic' enzyme. *Biochem. J.* 310, 709-14.
- Couplan E., del Mar Gonzalez-Barroso M., Alves-Guerra M.C., Ricquier D., Goubern M., Bouillaud F. (2002). No evidence for a basal, retinoic, or superoxide-induced uncoupling activity of the uncoupling protein 2 present in spleen or lung mitochondria. *J. Biol. Chem.* 277, 26268-75.
- Criscuolo F., Gonzalez-Barroso M.del M., Le Maho Y., Ricquier D., Bouillaud F. (2005). Avian uncoupling protein expressed in yeast mitochondria prevents endogenous free radical damage. *Proc. Biol. Sci.* 272, 803-10.
- D'Adamo M., Perego L., Cardellini M., Marini M.A., Frontoni S., Andreozzi F., Sciacqua A., Lauro D., Sbraccia P., Federici M., Paganelli M., Pontiroli A.E., Lauro R., Perticone F., Folli F., Sesti G. (2004). The -866A/A genotype in the promoter of the human uncoupling protein 2 gene is associated with insulin resistance and increased risk of type 2 diabetes. *Diabetes.* 53, 1905-10.
- Dahlquist G. (1994). Non-genetic risk determinants of type 1 diabetes. *Diabete Metab.* 20, 251-7.
- Dai W.J., Bartens W., Kohler G., Hufnagel M., Kopf M., Brombacher F. (1997). Impaired macrophage listericidal and cytokine activities are responsible for the rapid death of *Listeria monocytogenes*-infected IFN-gamma receptor-deficient mice. *J. Immunol.* 158, 5297-304.
- Dandona P., Aljada A., Bandyopadhyay A. (2004). Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* 25, 4-7.
- Davis R.J. (1999). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. *Biochem. Soc. Symp.* 64, 1-12.
- de Bilbao F., Arsenijevic D., Vallet P., Hjelle O.P., Ottersen O.P., Bouras C., Raffin Y., Abou K., Langhans W., Collins S., Plamondon J., Alves-Guerra M.C., Haguenaer A., Garcia I., Richard D., Ricquier D., Giannakopoulos P. (2004). Resistance to cerebral ischemic injury in UCP2 knockout mice: evidence for a role of UCP2 as a regulator of mitochondrial glutathione levels. *J. Neurochem.* 89, 1283-92.
- De Souza C.T., Araujo E.P., Stoppiglia L.F., Pauli J.R., Ropelle E., Rocco S.A., Marin R.M., Franchini K.G., Carneiro E.M., Velloso L.A. (2007). Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action. *FASEB J.* 21, 1153-63.
- Denkers E.Y., Butcher B.A., Del Rio L., Bennouna S. (2004). Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. *Int J Parasitol.* 34, 411-21.

- Denkers E.Y., Butcher B.A., Del Rio L., Kim L. (2004). Manipulation of mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-kappaB-signaling cascades during intracellular *Toxoplasma gondii* infection. *Immunol. Rev.* 201, 191-205.
- Denu J.M., Tanner K.G. (1998). Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry.* 37, 5633-42.
- Diano S., Matthews R.T., Patrylo P., Yang L., Beal M.F., Barnstable C.J., Horvath T.L. (2003). Uncoupling protein 2 prevents neuronal death including that occurring during seizures: a mechanism for preconditioning. *Endocrinology.* 144, 5014-21.
- Dokka S., Shi X., Leonard S., Wang L., Castranova V., Rojanasakul Y. (2001). Interleukin-10-mediated inhibition of free radical generation in macrophages. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 280, L1196-202.
- Dong C., Davis R.J., Flavell R.A. (2002). MAP kinases in the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 55-72.
- Dorfman K., Carrasco D., Gruda M., Ryan C., Lira S.A., Bravo R. (1996). Disruption of the *erp/mkp-1* gene does not affect mouse development: normal MAP kinase activity in ERP/MKP-1-deficient fibroblasts. *Oncogene.* 13, 925-31.
- Echtay K.S., Roussel D., St-Pierre J., Jekabsons M.B., Cadenas S., Stuart J.A., Harper J.A., Roebuck S.J., Morrison A., Pickering S., Clapham J.C., Brand M.D. (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature.* 415, 96-9.
- Eizirik D.L., Mandrup-Poulsen T. (2001). A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia.* 44, 2115-33.
- Eizirik D.L., Darville M.I. (2001). beta-cell apoptosis and defense mechanisms: lessons from type 1 diabetes. *Diabetes. Suppl 1*:S64-9.
- Eldor R., Yeffet A., Baum K., Doviner V., Amar D., Ben-Neriah Y., Christofori G., Peled A., Carel J.C., Boitard C., Klein T., Serup P., Eizirik D.L., Melloul D. (2006). Conditional and specific NF-kappaB blockade protects pancreatic beta cells from diabetogenic agents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 5072-7.
- Esterbauer H., Schneitler C., Oberkofler H., Ebenbichler C., Paulweber B., Sandhofer F., Ladurner G., Hell E., Strosberg A.D., Patsch J.R., Krempler F., Patsch W. (2001). A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle-aged humans. *Nat. Genet.* 28, 178-83.
- Fan H., Cook J.A. (2004). Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J. Endotoxin Res.* 10, 71-84.
- Finkel T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10, 248-53.
- Fleury C., Neverova M., Collins S., Raimbault S., Champigny O., Levi-Meyrueis C., Bouillaud F., Seldin M.F., Surwit R.S., Ricquier D., Warden C.H. (1997). Uncoupling

- protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat. Genet.* 15, 269-72.
- Flodstrom M., Tyrberg B., Eizirik D.L., Sandler S. (1999). Reduced sensitivity of inducible nitric oxide synthase-deficient mice to multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes.* 48, 706-13.
- Flohe L., Brigelius-Flohe R., Saliou C., Traber M.G., Packer L. (1997). Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radic Biol Med.* 22, 1115-26.
- Farooq A., Zhou M.M. (2004). Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal.* 16, 769-79.
- Forman H.J., Torres M. (2001). Redox signaling in macrophages. *Mol. Aspects Med.* 22, 189-216.
- Fridovich I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science.* 201, 875-80.
- Furchgott R.F., Zawadzki J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288, 373-6.
- Gable D.R., Stephens J.W., Cooper J.A., Miller G.J., Humphries S.E. (2006). Variation in the UCP2-UCP3 gene cluster predicts the development of type 2 diabetes in healthy middle-aged men. *Diabetes.* 55, 1504-11.
- Gardner P.R., Fridovich I. (1992). Inactivation-reactivation of aconitase in *Escherichia coli*. A sensitive measure of superoxide radical. *J. Biol. Chem.* 267, 8757-63.
- Gardner P.R. (2002). Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. *Methods Enzymol.* 349, 9-23.
- Garlid K.D., Jaburek M., Jezek P. (1998). The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett.* 438, 10-4.
- Gloire G., Legrand-Poels S., Piette J. (2006). NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1493-505.
- Goglia F., Skulachev V.P. (2003). A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. *FASEB J.* 17, 1585-91.
- Gordon S., Taylor P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 953-64.
- Groeneveld P.H., van Rooijen N., Eikelenboom P. (1983). In-vivo effects of lipopolysaccharide on lymphoid and non-lymphoid cells in the mouse spleen. Migration of marginal metallophilic cells towards the follicle centres. *Cell. Tissue Res.* 234, 201-8.
- Guha M., Mackman N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* 13, 85-94.

Haguenauer A., Raimbault S., Masscheleyn S., Gonzalez-Barroso M.del M., Criscuolo F., Plamondon J., Miroux B., Ricquier D., Richard D., Bouillaud F., Pecqueur C. (2005). A new renal mitochondrial carrier, KMCP1, is up-regulated during tubular cell regeneration and induction of antioxidant enzymes. *J Biol Chem.* 280, 22036-43.

Halliwell B., Clement M.V., Long L.H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 486, 10-3.

Hamon M., Bierne H., Cossart P. (2006). *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 423-34.

Han J., Lee J.D., Tobias P.S., Ulevitch R.J. (1993). Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. *J. Biol. Chem.* 268, 25009-14.

Han J., Lee J.D., Bibbs L., Ulevitch R.J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science.* 265, 808-11.

Hancock J.T., Jones O.T. (1987). The inhibition by diphenyleneiodonium and its analogues of superoxide generation by macrophages. *Biochem. J.* 242, 103-7.

Hanenbergh H., Kolb-Bachofen V., Kantwerk-Funke G., Kolb H. (1989). Macrophage infiltration precedes and is a prerequisite for lymphocytic insulinitis in pancreatic islets of pre-diabetic BB rats. *Diabetologia.* 32, 126-34.

Harper J.A., Stuart J.A., Jekabsons M.B., Roussel D., Brindle K.M., Dickinson K., Jones R.B., Brand M.D. (2002). Artfactual uncoupling by uncoupling protein 3 in yeast mitochondria at the concentrations found in mouse and rat skeletal-muscle mitochondria. *Biochem. J.* 361, 49-56.

Haworth R., Platt N., Keshav S., Hughes D., Darley E., Suzuki H., Kurihara Y., Kodama T., Gordon S. (1997). The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock. *J. Exp. Med.* 186, 1431-9.

Heaton G.M., Wagenvoord R.J., Kemp A. Jr., Nicholls D.G. (1978). Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur. J. Biochem.* 82, 515-21.

Herrling T., Fuchs J., Rehberg J., Groth N. (2003). UV-induced free radicals in the skin detected by ESR spectroscopy and imaging using nitroxides. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 59-67.

Heyworth P.G., Curnutte J.T., Nauseef W.M., Volpp B.D., Pearson D.W., Rosen H., Clark R.A. (1991). Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558. *J. Clin. Invest.* 87, 352-6.

Heyworth P.G., Cross A.R., Curnutte J.T. (2003). Chronic granulomatous disease. *Curr*

Opin Immunol. 15, 578-84.

Homo-Delarche F., Calderari S., Irminger J.C., Gangnerau M.N., Coulaud J., Rickenbach K., Dolz M., Halban P., Portha B., Serradas P. (2006). Islet Inflammation and Fibrosis in a Spontaneous Model of Type 2 Diabetes, the GK Rat. *Diabetes*. 55, 1625-33.

Horio F., Fukuda M., Katoh H., Petruzzelli M., Yano N., Rittershaus C., Bonner-Weir S., Hattori M. (1994). Reactive oxygen intermediates in autoimmune islet cell destruction of the NOD mouse induced by peritoneal exudate cells (rich in macrophages) but not T cells. *Diabetologia*. 37, 22-31.

Horvath T.L., Diano S., Miyamoto S., Barry S., Gatti S., Alberati D., Livak F., Lombardi A., Moreno M., Goglia F., Mor G., Hamilton J., Kachinskas D., Horwitz B., Warden C.H. (2003). Uncoupling proteins-2 and 3 influence obesity and inflammation in transgenic mice. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*. 27, 433-42.

Hsu H.Y., Wen M.H. (2002). Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression. *J. Biol. Chem*. 277, 22131-9.

Hu X., Herrero C., Li W.P., Antoniv T.T., Falck-Pedersen E., Koch A.E., Woods J.M., Haines G.K., Ivashkiv L.B. (2002). Sensitization of IFN-gamma Jak-STAT signaling during macrophage activation. *Nat. Immunol*. 3, 859-66.

Hurtaud C., Gelly C., Bouillaud F., Levi-Meyrueis C. (2006). Translation control of UCP2 synthesis by the upstream open reading frame. *Cell. Mol. Life Sci*. 63, 1780-9.

Hurtaud C., Gelly C., Chen Z., Levi-Meyrueis C., Bouillaud F. (2007). Glutamine stimulates translation of Uncoupling Protein 2 mRNA. *Cell. Mol. Life Sci*. in press.

Hypponen E., Laara E., Reunanen A., Jarvelin M.R., Virtanen S.M. (2001). Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet*. 358, 1500-3.

Imlay J.A., Chin S.M., Linn S. (1988). Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*. 240, 640-2.

Jaburek M., Varecha M., Gimeno R.E., Dembski M., Jezek P., Zhang M., Burn P., Tartaglia L.A., Garlid K.D. (1999). Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *J. Biol. Chem*. 274, 26003-7.

Jansen A., Homo-Delarche F., Hooijkaas H., Leenen P.J., Dardenne M., Drexhage H.A. (1994). Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes*. 43, 667-75.

Janssen-Heininger Y.M., Poynter M.E., Baeuerle P.A. (2000). Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic. Biol. Med*. 28, 1317-27.

- Jastroch M., Wuertz S., Kloas W., Klingenspor M. (2005). Uncoupling protein 1 in fish uncovers an ancient evolutionary history of mammalian nonshivering thermogenesis. *Physiol. Genomics*. 22, 150-6.
- Jezek P., Garland K.D. (1990). New substrates and competitive inhibitors of the Cl⁻-translocating pathway of the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria. *J. Biol. Chem.* 265, 19303-11.
- Joseph J.W., Koshkin V., Zhang C.Y., Wang J., Lowell B.B., Chan C.B., Wheeler M.B. (2002). Uncoupling protein 2 knockout mice have enhanced insulin secretory capacity after a high-fat diet. *Diabetes* 51, 3211-9.
- Joseph J.W., Koshkin V., Saleh M.C., Sivitz W.I., Zhang C.Y., Lowell B.B., Chan C.B., Wheeler M.B. (2004). Free fatty acid-induced beta-cell defects are dependent on uncoupling protein 2 expression. *J. Biol. Chem.* 279, 51049-56.
- Jun H.S., Santamaria P., Lim H.W., Zhang M.L., Yoon J.W. (1999a). Absolute requirement of macrophages for the development and activation of beta-cell cytotoxic CD8⁺ T-cells in T-cell receptor transgenic NOD mice. *Diabetes*. 48, 34-42.
- Jun H.S., Yoon C.S., Zbytniuk L., van Rooijen N., Yoon J.W. (1999b). The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Exp. Med.* 189, 347-58.
- Kamata H., Hirata H. (1999). Redox regulation of cellular signalling. *Cell. Signal.* 11, 1-14.
- Kanakaraj P., Schafer P.H., Cavender D.E., Wu Y., Ngo K., Grealish P.F., Wadsworth S.A., Peterson P.A., Siekierka J.J., Harris C.A., Fung-Leung W.P. (1998). Interleukin (IL)-1 receptor-associated kinase (IRAK) requirement for optimal induction of multiple IL-1 signaling pathways and IL-6 production. *J. Exp. Med.* 187, 2073-9.
- Kassis N., Bernard C., Pusterla A., Casteilla L., Penicaud L., Richard D., Ricquier D., Ktorza A. (2000). Correlation between pancreatic islet uncoupling protein-2 (UCP2) mRNA concentration and insulin status in rats. *Int. J. Exp. Diabetes Res.* 1, 185-93.
- Kaufman D.L., Clare-Salzler M., Tian J., Forsthuber T., Ting G.S., Robinson P., Atkinson M.A., Sercarz E.E., Tobin A.J., Lehmann P.V. (1993). Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature*. 366, 69-72.
- Kawai T., Adachi O., Ogawa T., Takeda K., Akira S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. 11, 115-22.
- Kawai T., Akira S. (2006). TLR signaling. *Cell. Death Differ.* 13, 816-25.
- Keith F.J., Gay N.J. (1990). The *Drosophila* membrane receptor Toll can function to promote cellular adhesion. *EMBO J.* 9, 4299-306.
- Kizaki T., Suzuki K., Hitomi Y., Taniguchi N., Saitoh D., Watanabe K., Onoe K., Day

- N.K., Good R.A., Ohno H. (2002). Uncoupling protein 2 plays an important role in nitric oxide production of lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99, 9392-7.
- Koay M.A., Christman J.W., Segal B.H., Venkatakrishnan A., Blackwell T.R., Holland S.M., Blackwell T.S. (2001). Impaired pulmonary NF-kappaB activation in response to lipopolysaccharide in NADPH oxidase-deficient mice. *Infect. Immun.* 69, 5991-6.
- Kolb H., Oschilewski M., Oschilewski U., Schwab E., Moume C.M., Greulich B., Burkart V., Zielasek J., Kiesel U. (1987). Analysis of 22 immunomodulatory substances for efficacy in low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes Res.* 6, 21-7.
- Kolb-Bachofen V., Epstein S., Kiesel U., Kolb H. (1988). Low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. Electron microscopy reveals single-cell insulinitis before diabetes onset. *Diabetes.* 37, 21-7
- Kobayashi K., Hernandez L.D., Galan J.E., Janeway C.A. Jr, Medzhitov R., Flavell R.A. (2002). IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell.* 110, 191-202.
- Kontoyiannis D., Pasparakis M., Pizarro T.T., Cominelli F., Kollias G. (1999). Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity.* 10, 387-98.
- Kontoyiannis D., Kotlyarov A., Carballo E., Alexopoulou L., Blakeshear P.J., Gaestel M., Davis R., Flavell R., Kollias G. (2001). Interleukin-10 targets p38 MAPK to modulate ARE-dependent TNF mRNA translation and limit intestinal pathology. *EMBO J.* 20, 3760-70.
- Krauss S., Zhang C.Y., Lowell B.B. (2002). A significant portion of mitochondrial proton leak in intact thymocytes depends on expression of UCP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99, 118-22
- Krauss S., Zhang C.Y., Scorrano L., Dalgaard L.T., St-Pierre J., Grey S.T., Lowell B.B. (2003). Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *J. Clin. Invest.* 112, 1831-42.
- Krempler F., Esterbauer H., Weitgasser R., Ebenbichler C., Patsch J.R., Miller K., Xie M., Linnemayr V., Oberkofler H., Patsch W. (2002). A functional polymorphism in the promoter of UCP2 enhances obesity risk but reduces type 2 diabetes risk in obese middle-aged humans. *Diabetes.* 51, 3331-5.
- Kwon J., Devadas S., Williams M.S. (2003). T cell receptor-stimulated generation of hydrogen peroxide inhibits MEK-ERK activation and Ick serine phosphorylation. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 406-17.
- Laloi M., Klein M., Riesmeier J.W., Muller-Rober B., Fleury C., Bouillaud F., Ricquier D. (1997). A plant cold-induced uncoupling protein. *Nature.* 389, 135-6.
- Lang R., Hammer M., Mages J. (2006). DUSP meet immunology: dual specificity

- MAPK phosphatases in control of the inflammatory response. *J. Immunol.* 177, 7497-504.
- Larger E., Becourt C., Bach J.F., Boitard C. (1995). Pancreatic islet beta cells drive T cell-immune responses in the nonobese diabetic mouse model. *J. Exp. Med.* 181, 1635-42.
- Larsen C.M., Wadt K.A., Juhl L.F., Andersen H.U., Karlsen A.E., Su M.S., Seedorf K., Shapiro L., Dinarello C.A., Mandrup-Poulsen T. (1998). Interleukin-1beta-induced rat pancreatic islet nitric oxide synthesis requires both the p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 273, 15294-300.
- Le Stunff C., Fallin D., Schork N.J., Bougneres P. (2000). The insulin gene VNTR is associated with fasting insulin levels and development of juvenile obesity. *Nat. Genet.* 26, 444-6.
- Leonard S.S., Harris G.K., Shi X. (2004). Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1921-42.
- Li Y., Huang T.T., Carlson E.J., Melov S., Ursell P.C., Olson J.L., Noble L.J., Yoshimura M.P., Berger C., Chan P.H., Wallace D.C., Epstein C.J. (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.* 11, 376-81.
- Li Y., Trush M.A. (1998). Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 295-9.
- Li Q., Estepa G., Memet S., Israel A., Verma I.M. (2000). Complete lack of NF-kappaB activity in IKK1 and IKK2 double-deficient mice: additional defect in neurulation. *Genes Dev.* 14, 1729-33.
- Like A.A., Rossini A.A. (1976). Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science.* 193, 415-7.
- Linehan S.A., Holden D.W. (2003). The interplay between *Salmonella typhimurium* and its macrophage host--what can it teach us about innate immunity? *Immunol. Lett.* 85, 183-92.
- Liu Y., Shepherd E.G., Nelin L.D. (2007). MAPK phosphatases--regulating the immune response. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 202-12.
- Liu M., Dhanwada K.R., Birt D.F., Hecht S., Pelling J.C. (1994). Increase in p53 protein half-life in mouse keratinocytes following UV-B irradiation. *Carcinogenesis.* 15, 1089-92.
- Lomaga M.A., Yeh W.C., Sarosi I., Duncan G.S., Furlonger C., Ho A., Morony S., Capparelli C., Van G., Kaufman S., van der Heiden A., Itie A., Wakeham A., Khoo W., Sasaki T., Cao Z., Penninger J.M., Paige C.J., Lacey D.L., Dunstan C.R., Boyle W.J., Goeddel D.V., Mak T.W. (1999). TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and

- defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev.* 13, 1015-24.
- Lu H.T., Yang D.D., Wysk M., Gatti E., Mellman I., Davis R.J., Flavell R.A. (1999). Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *EMBO J.* 18, 1845-57.
- Lu T., Stark G.R. (2004). Cytokine overexpression and constitutive NFkappaB in cancer. *Cell Cycle.* 3, 1114-7.
- Lu Y., Wahl L.M. (2005). Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2 through enhancement of NF-kappa B activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes. *J. Immunol.* 175, 5423-9.
- McCubrey J.A., Lahair M.M., Franklin R.A. (2006). Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1775-89.
- MacMicking J., Xie Q.W., Nathan C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 323-50.
- Mao W., Yu X.X., Zhong A., Li W., Brush J., Sherwood S.W., Adams S.H., Pan G. (1999). UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett.* 443, 326-30.
- Mathis D., Benoist C. (2004). Back to central tolerance. *Immunity.* 20, 509-16.
- Mattiasson G., Shamloo M., Gido G., Mathi K., Tomasevic G., Yi S., Warden C.H., Castilho R.F., Melcher T., Gonzalez-Zulueta M., Nikolich K., Wieloch T. (2003). Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat. Med.* 9, 1062-8.
- Maus U.A., Koay M.A., Delbeck T., Mack M., Ermert M., Ermert L., Blackwell T.S., Christman J.W., Schlondorff D., Seeger W., Lohmeyer J. (2002). Role of resident alveolar macrophages in leukocyte traffic into the alveolar air space of intact mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 282, L1245-52.
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Kopp E., Stadlen A., Chen C., Ghosh S., Janeway C.A. Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell.* 2, 253-8.
- Melov S., Coskun P., Patel M., Tuinstra R., Cottrell B., Jun A.S., Zastawny T.H., Dizdaroglu M., Goodman S.I., Huang T.T., Mizziorko H., Epstein C.J., Wallace D.C. (1999). Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96, 846-51.
- Metcalf K.A., Hitman G.A., Pociot F., Bergholdt R., Tuomilehto-Wolf E., Tuomilehto J., Viswanathan M., Ramachandran A., Nerup J. (1996). An association between type 1 diabetes and the interleukin-1 receptor type 1 gene. The DiMe Study Group. *Childhood Diabetes in Finland. Hum. Immunol.* 51, 41-8.

- Morahan G., Huang D., Ymer S.I., Cancilla M.R., Stephen K., Dabadghao P., Werther G., Tait B.D., Harrison L.C., Colman P.G. (2000). Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele. *Nat. Genet.* 27, 218-21.
- Mordue D.G., Sibley L.D. (1997). Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. *J. Immunol.* 159, 4452-9.
- Mordue D.G., Desai N., Dustin M., Sibley L.D. (1999). Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J. Exp. Med.* 190, 1783-92.
- Mozo J., Ferry G., Studeny A., Pecqueur C., Rodriguez M., Boutin J.A., Bouillaud F. (2006). Expression of UCP3 in CHO cells does not cause uncoupling, but controls mitochondrial activity in the presence of glucose. *Biochem. J.* 393, 431-9.
- Muller W.A., Randolph G.J. (1999). Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 66, 698-704.
- Muzio M., Ni J., Feng P., Dixit V.M. (1997). IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science.* 278, 1612-5.
- Myers J.T., Tsang A.W., Swanson J.A. (2003). Localized reactive oxygen and nitrogen intermediates inhibit escape of *Listeria monocytogenes* from vacuoles in activated macrophages. *J. Immunol.* 171, 5447-53.
- Nakamura H., Nakamura K., Yodoi J. (1997). Redox regulation of cellular activation. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 351-69.
- Ndengele M.M., Muscoli C., Wang Z.Q., Doyle T.M., Matuschak G.M., Salvemini D. (2005). Superoxide potentiates NF-kappaB activation and modulates endotoxin-induced cytokine production in alveolar macrophages. *Shock.* 23, 186-93.
- Newsholme P., Curi R., Pithon Curi T.C., Murphy C.J., Garcia C., Pires de Melo M. (1999). Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages, and neutrophils: its importance in health and disease. *J. Nutr. Biochem.* 10, 316-24.
- Nicholls D.G. (1979). Brown adipose tissue mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 549, 1-29.
- Nicholls D.G., Locke R.M. (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol. Rev.* 64, 1-64.
- Nistico L., Buzzetti R., Pritchard L.E., Van der Auwera B., Giovannini C., Bosi E., Larrad M.T., Rios M.S., Chow C.C., Cockram C.S., Jacobs K., Mijovic C., Bain S.C., Barnett A.H., Vandewalle C.L., Schuit F., Gorus F.K., Tosi R., Pozzilli P., Todd J.A. (1996). The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Belgian Diabetes Registry. Hum. Mol. Genet.* 5, 1075-80.

- Norimatsu M., Ono T., Aoki A., Ohishi K., Tamura Y. (1995). In-vivo induction of apoptosis in murine lymphocytes by bacterial lipopolysaccharides. *J. Med. Microbiol.* 43, 251-7.
- Ono K., Han J. (2000). The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell. Signal.* 12, 1-13.
- Pacifico F., Leonardi A. (2006). NF-kappaB in solid tumors. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1142-52.
- Paik S.G., Fleischer N., Shin S.I. (1980). Insulin-dependent diabetes mellitus induced by subdiabetogenic doses of streptozotocin: obligatory role of cell-mediated autoimmune processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 77, 6129-33.
- Papaccio G., De Luca B., Pisanti F.A. (1998). Macrophages and antioxidant status in the NOD mouse pancreas. *J. Cell. Biochem.* 71, 479-90.
- Park H.S., Jung H.Y., Park E.Y., Kim J., Lee W.J., Bae Y.S. (2004). Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J. Immunol.* 173, 3589-93.
- Payton M.A., Hawkes C.J., Christie M.R. (1995). Relationship of the 37,000- and 40,000-M(r) tryptic fragments of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 (ICA512). *J. Clin. Invest.* 96, 1506-11
- Pebay-Peyroula E., Dahout-Gonzalez C., Kahn R., Trezeguet V., Lauquin G.J., Brandolin G. (2003). Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature.* 426, 39-44.
- Pecqueur C., Cassard-Doulcier A.M., Raimbault S., Miroux B., Fleury C., Gelly C., Bouillaud F., Ricquier D. (1999). Functional organization of the human uncoupling protein-2 gene, and juxtaposition to the uncoupling protein-3 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 40-6.
- Pecqueur C., Alves-Guerra M.C., Gelly C., Levi-Meyrueis C., Couplan E., Collins S., Ricquier D., Bouillaud F., Miroux B. (2001). Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J. Biol. Chem.* 276, 8705-12.
- Pi J., Bai Y., Zhang Q., Wong V., Floering L.M., Daniel K., Reece J.M., Deeney J.T., Andersen M.E., Corkey B.E., Collins S. (2007). Reactive Oxygen Species as a Signal in Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Diabetes*. In press.
- Produit-Zengaffinen N., Davis-Lameloise N., Perreten H., Becard D., Gjinovci A., Keller P.A., Wollheim C.B., Herrera P., Muzzin P., Assimakopoulos-Jeannet F. (2006). Increasing uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells does not alter glucose-induced insulin secretion but decreases production of reactive oxygen species. *Diabetologia* 50, 84-93.

- Raimbault S., Dridi S., Denjean F., Lachuer J., Couplan E., Bouillaud F., Bordas A., Duchamp C., Taouis M., Ricquier D. (2001). An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds. *Biochem J.* 353, 441-4.
- Ramana C.V., Gil M.P., Schreiber R.D., Stark G.R. (2002). Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol.* 23, 96-101.
- Redondo M.J., Eisenbarth G.S. (2002). Genetic control of autoimmunity in Type I diabetes and associated disorders. *Diabetologia.* 45, 605-22.
- Rial E., Gonzalez-Barroso M., Fleury C., Iturrizaga S., Sanchis D., Jimenez-Jimenez J., Ricquier D, Gubern M., Bouillaud F. (1999). Retinoids activate proton transport by the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *EMBO J.* 18, 5827-33.
- Ricquier D., Kader J.C. (1976). Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73, 577-83.
- Ricquier D., Bouillaud F. (2000). The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem. J.* 345, 161-79.
- Robles D.T., Eisenbarth G.S. (2001). Type 1A diabetes induced by infection and immunization. *J. Autoimmun.* 16, 355-62.
- Rocksén D., Lilliehook B., Larsson R., Johansson T., Bucht A. (2000). Differential anti-inflammatory and anti-oxidative effects of dexamethasone and N-acetylcysteine in endotoxin-induced lung inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* 122, 249-56.
- Rosenberger C.M., Finlay B.B. (2003). Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4, 385-96.
- Rosmalen J.G., Homo-Delarche F., Durant S., Kap M., Leenen P.J., Drexhage H.A. (2000a). Islet abnormalities associated with an early influx of dendritic cells and macrophages in NOD and NODscid mice. *Lab. Invest.* 80, 769-77.
- Rosmalen J.G., Martin T., Dobbs C., Voerman J.S., Drexhage H.A., Haskins K., Leenen P.J. (2000b). Subsets of macrophages and dendritic cells in nonobese diabetic mouse pancreatic inflammatory infiltrates: correlation with the development of diabetes. *Lab. Invest.* 80, 23-30.
- Rotrosen D., Yeung C.L., Katkin J.P. (1993). Production of recombinant cytochrome b558 allows reconstitution of the phagocyte NADPH oxidase solely from recombinant proteins. *J. Biol. Chem.* 268, 14256-60.
- Rudofsky G. Jr., Schroedter A., Schlotterer A., Voron'ko O.E., Schlimme M., Tafel J., Isermann B.H., Humpert P.M., Morcos M., Bierhaus A., Nawroth P.P., Hamann A. (2006). Functional polymorphisms of UCP2 and UCP3 are associated with a reduced prevalence of diabetic neuropathy in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 29,

89-94.

Rudolph D., Yeh W.C., Wakeham A., Rudolph B., Nallainathan D., Potter J., Elia A.J., Mak T.W. (2000). Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. *Genes Dev.* 14, 854-62.

Ryan K.A., Smith M.F. Jr., Sanders M.K., Ernst P.B. (2004). Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. *Infect. Immun.* 72, 2123-30.

Ryu J.W., Hong K.H., Maeng J.H., Kim J.B., Ko J., Park J.Y., Lee K.U., Hong M.K., Park S.W., Kim Y.H., Han K.H. (2004). Overexpression of uncoupling protein 2 in THP1 monocytes inhibits beta2 integrin-mediated firm adhesion and transendothelial migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 864-70.

Saeki K., Zhu M., Kubosaki A., Xie J., Lan M.S., Notkins A.L. (2002). Targeted disruption of the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 results in alterations in glucose tolerance tests and insulin secretion. *Diabetes.* 51, 1842-50.

Salmeen A., Barford D. (2005). Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases. *Antioxid Redox Signal.* 7, 560-77.

Sanchis D., Fleury C., Chomiki N., Goubern M., Huang Q., Neverova M., Gregoire F., Easlick J., Raimbault S., Levi-Meyrueis C., Miroux B., Collins S., Seldin M., Richard D., Warden C., Bouillaud F., Ricquier D. (1998). BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J. Biol. Chem.* 273, 34611-5.

Sasahara M., Nishi M., Kawashima H., Ueda K., Sakagashira S., Furuta H., Matsumoto E., Hanabusa T., Sasaki H., Nanjo K. (2004). Uncoupling protein 2 promoter polymorphism -866G/A affects its expression in beta-cells and modulates clinical profiles of Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 53, 482-5.

Sato H., Fujiwara K., Sagara J., Bannai S. (1995). Induction of cystine transport activity in mouse peritoneal macrophages by bacterial lipopolysaccharide. *Biochem. J.* 310, 547-51.

Sato S., Sanjo H., Takeda K., Ninomiya-Tsuji J., Yamamoto M., Kawai T., Matsumoto K., Takeuchi O., Akira S. (2005). Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 6, 1087-95.

Scherer D.C., Brockman J.A., Chen Z., Maniatis T., Ballard D.W. (1995). Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92, 11259-63.

Scholl F.A., Dumesic P.A., Khavari P.A. (2005). Effects of active MEK1 expression in vivo. *Cancer Lett.* 230, 1-5.

Schrauwen P, Hoeks J, Hesselink MK. (2006). Putative function and physiological relevance of the mitochondrial uncoupling protein-3: involvement in fatty acid

metabolism? *Prog. Lipid Res.* 45, 17-41.

Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163-89.

Segersvard R., Rippe C., Duplantier M., Herrington M.K., Isaksson B., Adrian T.E., Erlanson-Albertsson C., Permert J. (2005). mRNA for pancreatic uncoupling protein 2 increases in two models of acute experimental pancreatitis in rats and mice. *Cell. Tissue. Res.* 320, 251-8.

Sen R., Baltimore D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell.* 46, 705-16.

Senftleben U., Cao Y., Xiao G., Greten F.R., Krahn G., Bonizzi G., Chen Y., Hu Y., Fong A., Sun S.C., Karin M. (2001a). Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science.* 293, 1495-9.

Senftleben U., Li Z.W., Baud V., Karin M. (2001b). IKK β is essential for protecting T cells from TNF α -induced apoptosis. *Immunity.* 14, 217-30.

Sesti G., Cardellini M., Marini M.A., Frontoni S., D'Adamo M., Del Guerra S., Lauro D., De Nicolais P., Sbraccia P., Del Prato S., Gambardella S., Federici M., Marchetti P., Lauro R. (2003). A common polymorphism in the promoter of UCP2 contributes to the variation in insulin secretion in glucose-tolerant subjects. *Diabetes.* 52, 1280-3.

Shim J.H., Xiao C., Paschal A.E., Bailey S.T., Rao P., Hayden M.S., Lee K.Y., Bussey C., Steckel M., Tanaka N., Yamada G., Akira S., Matsumoto K., Ghosh S. (2005). TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev.* 19, 2668-81.

Silva J.P., Shabalina I.G., Dufour E., Petrovic N., Backlund E.C., Hultenby K., Wibom R., Nedergaard J., Cannon B., Larsson N.G. (2005). SOD2 overexpression: enhanced mitochondrial tolerance but absence of effect on UCP activity. *EMBO J.* 24, 4061-70.

Skulachev V.P. (1998). Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta.* 1363, 100-24.

Smith R.E., Horwitz B.A. (1969). Brown fat and thermogenesis. *Physiol. Rev.* 49, 330-425.

Solanes G., Vidal-Puig A., Grujic D., Flier J.S., Lowell B.B. (1997). The human uncoupling protein-3 gene. Genomic structure, chromosomal localization, and genetic basis for short and long form transcripts. *J. Biol. Chem.* 272, 25433-6.

Solimena M., Dirx R. Jr., Hermel J.M., Pleasic-Williams S., Shapiro J.A., Caron L., Rabin D.U. (1996). ICA 512, an autoantigen of type I diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules. *EMBO J.* 15, 2102-14.

St-Pierre J., Buckingham J.A., Roebuck S.J., Brand M.D. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain.

J. Biol. Chem. 277, 44784-90.

Stuart J.A., Harper J.A., Brindle K.M., Brand M.D. (1999). Uncoupling protein 2 from carp and zebrafish, ectothermic vertebrates. *Biochim. Biophys. Acta.* 1413, 50-4.

Stuart J.A., Cadenas S., Jekabsons M.B., Roussel D., Brand M.D. (2001). Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues. *Biochim. Biophys. Acta.* 1504, 144-58.

Suh Y.H., Kim S.Y., Lee H.Y., Jang B.C., Bae J.H., Sohn J.N., Bae J.H., Suh S.I., Park J.W., Lee K.U., Song D.K. (2004). Overexpression of short heterodimer partner recovers impaired glucose-stimulated insulin secretion of pancreatic beta-cells overexpressing UCP2. *J. Endocrinol.* 183, 133-44.

Suzuki H., Kurihara Y., Takeya M., Kamada N., Kataoka M., Jishage K., et al. (1997). A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature.* 386, 292-6.

Suzuki N., Suzuki S., Duncan G.S., Millar D.G., Wada T., Mirtsos C., Takada H., Wakeham A., Itie A., Li S., Penninger J.M., Wesche H., Ohashi P.S., Mak T.W., Yeh W.C. (2002). Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature.* 416, 750-6.

Takamura T., Kato I., Kimura N., Nakazawa T., Yonekura H., Takasawa S., Okamoto H. (1998). Transgenic mice overexpressing type 2 nitric-oxide synthase in pancreatic beta cells develop insulin-dependent diabetes without insulinitis. *J. Biol. Chem.* 273, 2493-6.

Takamura T., Ando H., Nagai Y., Yamashita H., Nohara E., Kobayashi K. (1999). Pioglitazone prevents mice from multiple low-dose streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 44, 107-14.

Talbot D.A., Duchamp C., Rey B., Hanuise N., Rouanet J.L., Sibille B., Brand M.D. (2004). Uncoupling protein and ATP/ADP carrier increase mitochondrial proton conductance after cold adaptation of king penguins. *J. Physiol.* 558, 123-35.

Tarpey M.M., Fridovich I. (2001). Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ. Res.* 89, 224-36.

Taylor P.R., Martinez-Pomares L., Stacey M., Lin H.H., Brown G.D., Gordon S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, 23:901-44.

Thakur V., Pritchard M.T., McMullen M.R., Wang Q., Nagy L.E. (2006). Chronic ethanol feeding increases activation of NADPH oxidase by lipopolysaccharide in rat Kupffer cells: role of increased reactive oxygen in LPS-stimulated ERK1/2 activation and TNF-alpha production. *J. Leukoc. Biol.* 79, 1348-56.

Thomas H.E., Irawaty W., Darwiche R., Brodnicki T.C., Santamaria P., Allison J., Kay T.W. (2004). IL-1 receptor deficiency slows progression to diabetes in the NOD mouse.

Diabetes. 53, 113-21.

Torres M. (2003). Mitogen-activated protein kinase pathways in redox signaling. *Front. Biosci.* 8, d369-91.

Tretter L., Adam-Vizi V. (2004). Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J. Neurosci.* 24, 7771-8.

Tsang A.W., Oestergaard K., Myers J.T., Swanson J.A. (2000). Altered membrane trafficking in activated bone marrow-derived macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 68, 487-94.

Turrens J.F. (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Rep.* 17, 3-8.

Ueda T., Watanabe-Fukunaga R., Fukuyama H., Nagata S., Fukunaga R. (2004). Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development. *Mol. Cell. Biol.* 24, 6539-49.

Ukropec J., Anunciado R.P., Ravussin Y., Hulver M.W., Kozak L.P. (2006). UCP1-independent thermogenesis in white adipose tissue of cold-acclimated Ucp1^{-/-} mice. *J. Biol. Chem.* 281, 31894-908.

Underhill D.M., Gantner B. (2004). Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes Infect.* 6, 1368-73.

Vafiadis P., Bennett S.T., Todd J.A., Nadeau J., Grabs R., Goodyer C.G., Wickramasinghe S., Colle E., Polychronakos C. (1997). Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nat. Genet.* 15, 289-92.

Vavra J.J., Deboer C., Dietz A., Hanka L.J., Sokolski W.T. (1959). Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. *Antibiot. Annu.* 7, 230-5.

Verweij C.L., Gringhuis S.I. (2002). Oxidants and tyrosine phosphorylation: role of acute and chronic oxidative stress in T- and B-lymphocyte signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 4, 543-51.

Victor V.M., Rocha M., De la Fuente M. (2003). N-acetylcysteine protects mice from lethal endotoxemia by regulating the redox state of immune cells. *Free Radic. Res.* 37, 919-29.

Vidal-Puig A., Solanes G., Grujic D., Flier J.S., Lowell B.B. (1997). UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 79-82.

Virtanen S.M., Laara E., Hypponen E., Reijonen H., Rasanen L., Aro A., Knip M., Ilonen J., Akerblom H.K. (2000). Cow's milk consumption, HLA-DQB1 genotype, and type 1 diabetes: a nested case-control study of siblings of children with diabetes. Childhood diabetes in Finland study group. *Diabetes.* 49, 912-7.

- Vogler S., Goedde R., Mitterski B., Gold R., Kroner A., Koczan D., Zettl U.K., Rieckmann P., Epplen J.T., Ibrahim S.M. (2005). Association of a common polymorphism in the promoter of UCP2 with susceptibility to multiple sclerosis. *J. Mol. Med.* 83, 806-11.
- Vogler S., Pahnke J., Rousset S., Ricquier D., Moch H., Miroux B., Ibrahim S.M. (2006). Uncoupling protein 2 has protective function during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am. J. Pathol.* 168, 1570-5.
- Wang M.Y., Shimabukuro M., Lee Y., Trinh K.Y., Chen J.L., Newgard C.B., Unger R.H. (1999). Adenovirus-mediated overexpression of uncoupling protein-2 in pancreatic islets of Zucker diabetic rats increases oxidative activity and improves beta-cell function. *Diabetes.* 48, 1020-5.
- Wang C., Deng L., Hong M., Akkaraju G.R., Inoue J., Chen Z.J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature.* 412, 346-51.
- Wassmann S., Wassmann K., Nickenig G. (2004). Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension.* 44, 381-6.
- Wellen K.E., Hotamisligil G.S. (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* 115, 1111-9.
- Wientjes F.B., Panayotou G., Reeves E., Segal A.W. (1996). Interactions between cytosolic components of the NADPH oxidase: p40phox interacts with both p67phox and p47phox. *Biochem. J.* 317, 919-24.
- Williams M.S., Kwon J. (2004). T cell receptor stimulation, reactive oxygen species, and cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1144-51.
- Woo C.H., Lim J.H., Kim J.H. (2004). Lipopolysaccharide induces matrix metalloproteinase-9 expression via a mitochondrial reactive oxygen species-p38 kinase-activator protein-1 pathway in Raw 264.7 cells. *J. Immunol.* 173, 6973-80.
- Wysk M., Yang D.D., Lu H.T., Flavell R.A., Davis R.J. (1999). Requirement of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for tumor necrosis factor-induced cytokine expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96, 3763-8.
- Xiao Y.Q., Freire-de-Lima C.G., Janssen W.J., Morimoto K., Lyu D., Bratton D.L., Henson P.M. (2006). Oxidants selectively reverse TGF-beta suppression of proinflammatory mediator production. *J. Immunol.* 176, 1209-17.
- Yamasaki H., Sasaki H., Ogawa K., Shono T., Tamura S., Doi A., Sasahara M., Kawashima H., Nakao T., Furuta H., Nishi M., Nanjo K. (2006). Uncoupling protein 2 promoter polymorphism -866G/A affects peripheral nerve dysfunction in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 29, 888-94.
- Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 337-49.

Zhang D., Gaussin V., Taffet G.E., Belaguli N.S., Yamada M., Schwartz R.J., Michael L.H., Overbeek P.A., Schneider M.D. (2000). TAK1 is activated in the myocardium after pressure overload and is sufficient to provoke heart failure in transgenic mice. *Nat. Med.* 6, 556-63.

Zhang C.Y., Baffy G., Perret P., Krauss S., Peroni O., Grujic D., Hagen T., Vidal-Puig A.J., Boss O., Kim Y.B., Zheng X.X., Wheeler M.B., Shulman G.I., Chan C.B., Lowell B.B. (2001). Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell.* 105, 745-55.

Zhang C.Y., Parton L.E., Ye C.P., Krauss S., Shen R., Lin C.T., Porco J.A. Jr., Lowell B.B. (2006). Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced beta cell dysfunction in isolated pancreatic islets. *Cell. Metab.* 3, 417-27.

Zhao Q., Shepherd E.G., Manson M.E., Nelin L.D., Sorokin A., Liu Y. (2005). The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the response of alveolar macrophages to lipopolysaccharide: attenuation of proinflammatory cytokine biosynthesis via feedback control of p38. *J. Biol. Chem.* 280, 8101-8.

Zheng S.J., Lamhamedi-Cherradi S.E., Wang P., Xu L., Chen Y.H. (2005). Tumor suppressor p53 inhibits autoimmune inflammation and macrophage function. *Diabetes.* 54, 1423-8.

ANNEXES

1/ Article 1

Thermoregulation: what role for UCPs in mammals and birds?

Mozo J., Emre Y., Bouillaud F., Ricquier D., and Crisculo F.*

Bioscience Reports. (2005). 25, 227-49.

CNRS-UPR 9078, Faculté de Médecine Paris 5 Descartes-Necker, 156 rue de
Vaugirard, 75730 Paris Cedex 15, France.

* Corresponding author ☐ criscuolo@wanadoo.fr

2/ Article 2

UCP2 is a mitochondrial transporter with an unusual very short half-life

Rousset S.^{1*}, Mozo J.^{1,2}, Dujardin G.³, Emre Y.¹, Masscheleyn S.¹, Ricquier D.¹ and Cassard-Doulicier A.M.^{1*}

FEBS Letters. (2007). 581, 479-82.

¹ CNRS-UPR 9078, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, site Necker, 75730 Paris Cedex 15, France.

² present address: Institut Curie, UMR 146 bât 110, centre universitaire, 91405 Orsay.

³ CNRS-UPR 2167, Avenue de la Terrasse, Bât. 26, 91198 Gif-Sur-Yvette Cedex, France.

* Corresponding author. Present adress: INSERM, U764, Clamart, F-92140, France.
Fax: +33 1 46 32 79 93.

“Il réfléchit à ce qui a bien pu transformer le type formidable qu’il était en train de devenir en une sorte de larbin universel prêt à toutes les concessions.

C’est pourtant simple :
Jean-Marc a, un jour, rêvé de devenir chercheur.”

Clarisse Buono
Extrait de *Félicitations du jury*.

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais remercier le professeur Catherine Sautès-Fridman pour avoir accepté d'être la présidente de ce jury de thèse.

Je remercie le Pr. Louis Casteilla et le Pr. Francesc Villarroya pour avoir accepté d'être rapporteur, ainsi que le Dr. Frédéric Geissmann pour son rôle d'examinateur.

Daniel Ricquier, pour ton accueil au sein de ton laboratoire.

Anne-Marie, pour cette thèse si particulière.

Corinne, entre l'azote, la carbo, le -80° ,... je me suis dit à ton départ que j'allais enfin être tranquille. Mais en réalité ce fut fort ennuyeux, tu le sais. Et ce ne sont pas les départs successifs de François et Tobias qui ont arrangé les choses. C'est évidemment pour cette unique raison que j'a voulu tenter la STZ. Sinon, comment aurions-nous pu nous voir ? Dans quelques semaines, j'espère que tu n'oublieras pas de m'envoyer ton *Nat. Genet.* !

François, tu m'avais déjà abandonné une première fois et maintenant, j'apprends que tu as succombé au côté obscur de la force ! J'en suis heureux pour toi, tu le mérites amplement. Si tu n'avais pas été là, personne n'aurait pu lire ces lignes.

Tobias, ton aide et nos discussions ont été précieuses. Bientôt, tu seras le group leader aux multiples *Nature* et tu n'auras plus à errer de labo en labo. D'ici là, bon courage. Je regrette que cette complicité ne s'est pas développée plus rapidement.

Flora Zavala, pour votre temps et vos conseils.

Fred, pour tes conseils, les discussions sur la fin ainsi que ton avis sur les articles et la thèse.

Ségolène, bonne chance pour la suite.

Claire, pour tes conseils et ta relecture du BJ.

Brigitte, Chantal, Corinne, Jean-Louis, Sandrine, ainsi que tous les étudiants que j'ai pu croiser.

Et bien entendu, Patricia et Rose-Marie.

Je remercie également tous les membres de ma famille et tout particulièrement Melis (pas seulement pour les îlots), pour votre présence et votre soutien lors des moments de désillusions.