

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole doctorale thématique 524

Biologie, Santé, «Bio-Santé»

IFR 145 GEIST,

Equipe Accueil 3842 «Homéostasie Cellulaire et Pathologies»

Faculté de Médecine

Année: 2010

Thèse N :

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline/S spécialité: Biologie Santé/Immunologie

Présentée et soutenue par

Marie-Claude LISE

le 17 décembre 2010

*Neuropeptides et cellules immunitaires: Implication dans la
physiopathologie des Lymphocytes B*

Jury:

Mme le Professeur Danielle TROUDAUD

Président

Mr le Professeur Jean-François VIALARD

Pré-rapporteur

Mr le Docteur Philippe ESTERRE

Pré-rapporteur

Mme le Professeur Marie-Odile JAUBERTEAU MARCHAN

Directrice de thèse

Mme le Docteur Anne-Laure FAUCHAIS

Co-directrice de thèse

Latcho b f di: tan al , tan vini!

Remerciements

J'exprime toute ma reconnaissance au Professeur Marie-Odile Jauberteau-Marchan qui est à l'origine et a dirigé cette étude. Ses compétences scientifiques m'ont permis de mener à bien ce travail. Mes remerciements lui sont adressés.

J'exprime également toute ma reconnaissance au Docteur Anne-Laure Fauchais qui a codirigé cette étude.

Je tiens également à remercier le Professeur Danielle Troutaud de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.

Tous mes remerciements sont adressés au Professeur Jean-François Viallard qui a accepté d'être membre de ce jury. Je lui témoigne toute ma reconnaissance.

Je remercie vivement le Docteur Philippe Esterre d'avoir accepté de participer à ce jury. Je lui témoigne toute ma reconnaissance.

Je remercie la collectivité Région Guyane pour son soutien financier sous la mandature des Présidents Messieurs Antoine Karam et Rodolphe Alexandre. Pour la confiance que tous deux m'ont accordée tout au long du cursus DEA-Doctorat.

Un grand merci également à la Médecine Interne du CHU de Limoges pour son soutien financier et particulièrement au Professeur Elisabeth Vidal.

Le travail de thèse étant un travail d'équipe, je remercie tout particulièrement Marie-Odile et Anne-Laure, pour leur aide, leurs compétences scientifiques et pour avoir suivi de très près l'évolution de ce travail durant ces 3 années.

Je remercie l'EA3842 d'avoir mis à ma disposition les moyens financiers et matériel pour mener à bien ce projet. Merci à toute l'équipe de l'EA3842 pour leur soutien, particulièrement Fabrice pour ses précieuses connaissances en biologie moléculaire.

Je souhaite remercier vivement le personnel du CHU Duputryen de Limoges avec lequel j'ai pu travailler tout au long de ces trois ans. Merci à Ahmed, Sonia et Delphine pour leurs qualités humaines, m'avoir accueilli et enseigné la pratique de la cytométrie en flux.

Mes remerciements s'adressent également au personnel de Médecine Interne, qui a fait preuve d'une coopération sans faille, en particulier Raymonde, Brigitte, Cathy, Stéphanie pour leur constante bonne humeur et leur accueil chaleureux. Merci également à Stéphanie, l'Attachée de Recherche Clinique de Médecine Interne, qui, par sa présence et sa rigueur, m'a permis de mener à bien les trois PHRC. Je souhaite également remercier Clotilde pour sa contribution.

Merci à l'AREML, l'Association Recherche et Entraide des Maladies Lupiques ainsi qu'à l'Association Française des Syndromes de Sjögren et des Syndromes Secs pour leur soutien financier.

Merci à l'EA3174, notamment aux parasitologues le Pr Darde et le Dr Bouteille pour leurs conseils avisés lors de mes «début».

Je remercie également l'équipe de bactériologie (Thomas, Emilie, Martine) pour leur aide précieuse lors des techniques de séquençage.

Je tiens aussi à remercier Eliane Bourreau de l'institut Pasteur, qui a toujours suivi mon travail et qui m'a poussé à toujours chercher plus loin.

Merci au Pr Valitutti de l'Université de Toulouse pour m'avoir fait découvrir et apprécier l'immunologie.

Je remercie également Mr Da Silva et Mr Barraquin, qui m'ont apporté une aide exceptionnelle durant tout mon cursus universitaire et ont permis à leur manière l'aboutissement de ce projet.

Mes sincères remerciements s'adressent également à Bertrand qui m'a permis de progresser dans cette discipline. Merci de m'avoir encouragé et soutenu dans cette voie.

Merci également à Aurélien et Félicité pour leur amitié et leur constante bonne humeur.

Je tiens à remercier tous les membres de l'unité et tous les étudiants qui y ont séjourné pour leur sympathie et leur accueil. Mes remerciements vont à tous mes collègues du 2è qui m'ont aidé durant ces 3 années notamment pour le western blot, la logistique administrative et informatique. Merci d'avoir entretenu mon taux de glucose à une valeur décente et pour tout votre soutien particulièrement lors de la dernière étape. Cynthia merci d'avoir accepté bien des fonctions. Thomas, merci pour tous tes conseils en western blot et pour avoir été mon «compagnon de galère».

Merci également à l'équipe colorectale, Aurélie, Carole, Hussein pour leur aide précieuse à bien des niveaux. Carole, merci de m'avoir permis de garder un poids correct... Je remercie particulièrement Hussein de m'avoir initié «à la cigarette», et avoir contribuer activement à mes tortures intellectuelles, notamment durant les journées très longues.

Merci à Barbara pour m'avoir apporté ses conseils avisés et «éclairés» en science et vers d'autres thématiques.

Merci également à Yvan, interne très spécial, pour sa bonne humeur et son répertoire impressionnant de blagues!!

Merci à la petite Elodie pour tout son soutien, sa motivation inébranlable ainsi que pour la «découverte de Limoges». Seul regret, Nexon...

Acérola merci d'avoir su m'apporter une vision extérieure et une aide précieuse sur bien des choses. Je garderai un très bon souvenir de nos petites virées chez BB et Paul sans qui je pense «la vie» aurait été plus difficile.

Merci à ceux que j'ai rencontré au début de cette aventure, notamment Gaëlle et Elodie. Merci de votre amitié et de votre soutien.

Merci à tous ceux que j'ai rencontrés au cours de ces 3 années, qui ont essayé de me faire découvrir Limoges (Léa, Solenn, Maud, Franck, et tous les autres).

Je remercie tous les amis qui ont pris le temps de partager mes joies et mes peines. Particulièrement, mes amies de longue date Cécile, Aïda, Sandrine, Laurie et Florentina pour leur patience, leur soutien indéfectible tout au long de ces huit dernières années. Merci beaucoup, ça n'a pas toujours été simple, surtout pour toi Flo. Un très grand merci à toi qui a toujours été présente, même dans les moments les plus désespérés, avec un optimisme à toute épreuve. Donc merci de ne pas avoir fuit!!

J'ai une pensée particulière pour mon amie de toujours Sarita, je te remercie vraiment pour tes encouragements, tes prises de tête bien nécessaires avec le recul, et ton écoute de tous les instants.

Je n'oublie pas ma famille. Mon grand-père Roger, qui n'a toujours été présent durant tout mon cursus. Merci également à toute ma famille, en particulier mes frères et sœurs qui ont accepté durant toutes ces années d'être mes cobayes, surtout lors de mes présentations. Enfin, à ma mère, sans qui tout cela n'aurait pas été possible, grâce à ses encouragements, son soutien moral et financier dans tous les moments, même les plus critiques.

Résumé

Les neurotrophines (NTs), famille constituée du NGF (Nerve Growth Factor), du BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) et des NT-3, NT-4/5, sont des facteurs de croissance neuronaux qui interviennent dans le maintien de l'homéostasie cérébrale. Ces NTs existent sous deux formes biologiquement actives différentes selon leur maturation. Ainsi, ces différentes formes (pro-NT et NT) sont acheminées par leur protéine de transport la sortiline (ou NTSR-3 pour récepteur 3 de la neurotensine). Ces peptides interagissent avec deux types de récepteurs: les récepteurs Trk (Tropomyosin-Related Kinase), dit de haute affinité, et le récepteur p75^{NTR} dit de basse affinité appartenant à la famille des TNF (Tumor Necrosis Factor) conduisant respectivement à une prolifération, ou à l'induction de mort cellulaire. Initialement présents dans le système nerveux, ces neuropeptides ont été identifiés dans d'autres systèmes, notamment dans le système immunitaire (SI) où leur rôle immunomodulateur a été caractérisé par les travaux de notre équipe. Les données antérieures obtenues au sein du laboratoire ont permis de mettre en évidence un mécanisme autocrine de survie, en situation de stress cellulaire, dans les lymphocytes B matures et les plasmocytes. Ce mécanisme, dépendant du BDNF mature, est régulé par la protéine de transport sortiline (ou NTSR-3), jusqu'alors non décrite dans les lymphocytes. Outre son rôle de co-récepteur pour les pro-NTs, la sortiline est le récepteur de type 3 de la neurotensine, ce qui nous a conduit à étudier l'expression de ce neuropeptide et de ses récepteurs spécifiques, dans les lymphocytes tumoraux et normaux humains et murins. Nous avons mis en évidence la présence de la neurotensine et de ses récepteurs au niveau des LB. L'expression de la neurotensine est associée aux stades de maturation les plus avancés. La fonctionnalité de ses récepteurs a été démontrée. De plus, le rôle de la neurotensine comme facteur trophique et anti-apoptotique dans la survie lymphocytaire B en réponse à différents stress cellulaire (activation du récepteur Fas, privation sérique) a également été établie. La caractérisation de ce neuropeptide et de ses récepteurs au sein de LB matures a permis, d'une part, d'appuyer l'hypothèse que ce neuropeptide est fonctionnel dans la survie lymphocytaire B et d'autre part de mettre en évidence que l'expression de NTSR-1 et de la neurotensine est associée aux lymphocytes tumoraux et non aux lymphocytes normaux, humains ou murins. Une particularité du modèle murin est l'absence de NTSR-2 lymphocytaire renforçant ainsi la fonction de la sortiline dans le développement et la survie lymphocytaires B.

Dans une seconde partie, nous avons étudié l'effet des NTs au cours de 3 maladies auto-immunes : la sclérodermie, le lupus érythémateux disséminé et le syndrome de Goujerot Sjögren. Cette étude a mis en évidence une association entre le profil d'expression sérique et lymphocytaire du NGF et du BDNF et la présentation clinico-biologique de ces 2 connectivites. Parallèlement, l'importance du NGF et du BDNF respectivement dans les versants auto-immun et vasculaire de la sclérodermie systémique a été démontrée. La dualité fonctionnelle de la sortiline apparaîtrait également importante dans l'homéostasie lymphocytaire B.

Mots-clé: Neurotrophines, neurotensine, lymphocyte B, maladie auto-immune

Abstract

Neuropeptide and immune cells involving in normal and pathologic B cells

The neurotrophins (NTs) family consists of NGF (Nerve Growth Factor), BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) and NT-3, NT-4 / 5, are neural growth factors involved in maintaining brain homeostasis. These NTs exist in two different biologically active forms according to their maturation. Thus, these main forms (pro-NT and NT) are routed by their transport protein Sortilin (or NTSR-3 for the neurotensin receptor 3). These peptides interact with two types of receptors: the Trk receptors (Tropomyosin-Related Kinase) also called high-affinity receptor and p75^{NTR} low affinity receptor belonging to the family of TNF (Tumor Necrosis Factor). These interaction between ligand-receptor lead to proliferation, or cell death. Initially present in the nervous system, these neuropeptides have been identified in other systems; particularly in the immune system (IS) where their immunomodulatory role has been characterized by our laboratory.

Our previous data led to highlight the existence of an autocrine mechanism of survival under conditions of cellular stress in mature B cells and plasma. This mechanism, dependent on the mature BDNF, is regulated by the transport protein sortilin (or NTSR-3), not previously described in lymphocytes. In addition to its role as co-receptor for pro-neurotrophins, sortilin is the receptor type 3 of neurotensin, which led us to study the expression of this neuropeptide and its receptors in tumor cells and normal human and mouse.

We have demonstrated the presence of neurotensin and its receptors at B cells. The expression of neurotensin is associated with stages of maturation advanced. Functionality of its receptors has been demonstrated. In addition, the role of neurotensin as trophic factor and anti-apoptotic survival in B lymphocyte in response to various cellular stress (activation of the receptor Fas, serum deprivation) was also established. The characterization of this neuropeptide and its receptors in mature LB has, firstly, supported the hypothesis that this neuropeptide is functional in B lymphocyte survival and secondly demonstrated that the NTSR-1 expression and neurotensin is associated with tumor cells and not normal cells, human or mouse. One of the features of the mouse model is the absence NTSR2 in B cells, underlining the function of sortilin in lymphocyte development and survival B.

In a second part, we studied the effect of NTs in 3 autoimmune diseases: scleroderma, lupus erythematosus and Sjogren's syndrome Goujerot. This study showed an association between certain NTs, especially NGF and BDNF in biological processes and clinical features of these pathologies. The dual function of sortilin appears also important in B cell homeostasis.

Keywords: Neurotrophin, Neurotensine, B cells, autoimmune diseases

Table des matières

RESUME	6
ABSTRACT	7
LISTE DES ABREVIATIONS	15
LISTE DES TABLEAUX	24
LISTE DES FIGURES	25
LISTE DES ANNEXES	29
INTRODUCTION.....	30
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	32
I NEUROPEPTIDES ET SYSTEME NERVEUX	34
A. LES NEUROTROPHINES	34
1. -Biologie des neurotrophines	35
2. - Spécificité des différentes neurotrophines.....	37
a. - Le NGF.....	37
b. - Le BDNF.....	38
c. La NT-3.....	39
3. - Récepteurs aux NTs.....	39
a. - Le récepteur p75 ^{NTR}	39
b. Récepteurs de type Trk	43
• Structure des Trk	43
• Fonctions des récepteurs Trk.....	46
c. - La sortiline : dualité fonctionnelle	48
• Fonction de transporteur.....	48
• Fonction de co-récepteur	50
B. LA NEUROTENSINE	51
1. Structure et fonction de la neurotensine.....	51
2. Localisation de la neurotensine.....	53
a. Au niveau central	53
b. Au niveau périphérique	53
3. Récepteurs de la neurotensine.....	54
a. NTSR-1.....	54
b. NTSR-2.....	55
c. NTSR-3.....	56
C. NEUROPEPTIDES ET PATHOLOGIES DU SN	59
1. Les neurotrophines.....	59

2.	<i>La neurotensine</i>	60
II	NEUROPEPTIDES ET PROCESSUS ONCOGENIQUES	61
A.	- LA NEUROTENSINE ET SES RECEPTEURS	61
B.	- NTS ET ONCOGENESE.....	64
III	NEUROPEPTIDES ET SYSTEME IMMUNITAIRE: APPLICATION AUX MALADIES AUTO-IMMUNES	65
A.	NTS ET SYSTEME IMMUNITAIRE.....	65
1.	<i>NGF</i>	65
•	NGF et pathologies allergiques.....	65
•	NGF et cellules lymphocytaires B et T.....	66
2.	<i>BDNF</i>	70
3.	<i>Neurotrophine 3</i>	73
4.	<i>Pro-neurotrophines et immunité</i>	73
5.	<i>Localisation salivaire, immunité</i>	75
6.	<i>Implication des neuropeptides dans les MAI</i>	75
a.	Neurotrophines et polyarthrite rhumatoïde.....	76
b.	Lupus érythémateux disséminé	77
c.	Syndrome de Sjögren primitif	78
d.	Sclérodémie systémique.....	79
B.	LA NEUROTENSINE DANS LE SYSTEME IMMUNITAIRE	80
	OBJECTIFS DE CE TRAVAIL	81
	OBJECTIF GENERAL	82
	OBJECTIFS SPECIFIQUES	83
	MATERIELS ET METHODES	84
I	NEUROTENSINE, RECEPTEURS A LA NEUROTENSINE ET LIGNEES LYMPHOCYTAIRES B HUMAINES	84
A.	CULTURE CELLULAIRE.....	84
1.	<i>Lignées lymphocytaires B humaines</i>	84
a.	Conditions de cultures	84
•	Privation sérique.....	85
•	Neurotensine exogène	85
•	Apoptose induite par la voie Fas/CD95.....	85
•	Privation sérique et/ou l'activation de Fas	86
•	Inhibiteurs des récepteurs à la neurotensine	86
2.	<i>Autres lignées cellulaires</i>	86
II	DETECTION DES TRANSCRITS	87
1.	<i>Extraction des ARN totaux</i>	87
2.	<i>Transcription inverse (RT)</i>	87

3.	<i>Polymérisation en chaîne (PCR)</i>	88
4.	<i>Migration des séquences amplifiées</i>	90
5.	<i>Séquençage des ADNc</i>	90
B.	ETUDES PROTEIQUES	91
1.	<i>Le western blot</i>	91
a.	Lysat cellulaire	91
b.	Dosage protéique.....	91
c.	Séparation des protéines par électrophorèse.....	92
2.	<i>Etude immunocytochimique par immunofluorescence indirecte</i>	94
3.	<i>L'immunoprécipitation</i>	95
4.	<i>La cytométrie en flux</i>	96
C.	VOIES DE PROLIFERATION ET D'APOPTOSE	97
1.	<i>La prolifération cellulaire par test EDU</i>	97
2.	<i>Dosage des nucléosomes solubles par ELISA Cell Death</i>	97
III	NEUROTENSINE, RECEPTEURS A LA NEUROTENSINE ET LYMPHOCYTES B SAINS HUMAINS	99
A.	ISOLEMENT DES CELLULES MONONUCLEES SANGUINES	99
1.	<i>Séparation des lymphocytes B par tri magnétique positif</i>	99
2.	<i>Culture cellulaire</i>	100
3.	<i>Extraction d'ARN</i>	100
4.	<i>Extraction protéique et immunofluorescence indirecte</i>	100
IV	NEUROTENSINE, RECEPTEURS A LA NEUROTENSINE ET LIGNEES B MURINES	101
A.	CULTURES CELLULAIRES	101
1.	<i>Lignées murines</i>	101
2.	<i>Conditions de culture</i>	101
B.	NEUROTROPHINES ET LYMPHOCYTES B MURINS	102
1.	<i>Séparation des cellules pre-B murines</i>	102
2.	<i>Séparation des lymphocytes B par tri magnétique positif</i>	102
V	NEUROTROPHINES, RECEPTEURS AUX NTS ET MAI	103
A.	NEUROTROPHINES, RECEPTEURS AUX NTS ET LED.....	103
1.	<i>Principaux objectifs de cette étude et critères de jugement</i>	103
a.	Critères d'inclusions.....	103
b.	Critères de non-inclusion	103
c.	Données biologiques et cliniques	104
d.	Dosage ELISA de BAFF et des profils cytokiniques Th1 (l'IFN- γ), Th2 (IL-10) et Th-17 (IL-17)	105
e.	Etude de l'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs au niveau lymphocytaire T et B	105
f.	Dosage sérique des neurotrophines par la technique d'ELISA.....	108
B.	NEUROTROPHINES, RECEPTEURS AUX NEUROTROPHINES ET SCLERODERMIE	110

1.	<i>Patients et méthodes</i>	110
a.	Critères d'inclusion	110
b.	Données cliniques	110
c.	Données immunologiques	111
C.	NEUROTROPHINES, RECEPTEURS AUX NEUROTROPHINES ET SYNDROME DE GOUJEROT SJÖGREN	112
1.	<i>Patients</i>	112
a.	Critères d'éligibilité	112
b.	Critères d'exclusion	112
c.	Modalités de recrutement	113
d.	Méthodes	113
2.	<i>ELISA</i>	113
VI	ANALYSES STATISTIQUES	114
PARTIE I	117
I	NEUROTENSINE ET MATURATION LYMPHOCYTAIRE B	118
A.	LA NEUROTENSINE ET SES RECEPTEURS SONT EXPRIMES PAR LES LIGNEES B HUMAINES A L'ETAT BASAL	118
1.	<i>Expression des transcrits</i>	118
2.	<i>Expression protéique</i>	119
a.	Western Blot	119
b.	Immunofluorescence indirecte	120
c.	Cytométrie en flux	122
B.	LE STRESS CELLULAIRE MODULE L'EXPRESSION DES RECEPTEURS A LA NEUROTENSINE DANS LES LIGNEES B HUMAINES.....	123
1.	<i>Expression des transcrits</i>	123
2.	<i>Expression protéique</i>	124
II	NEUROTENSINE ET SURVIE LYMPHOCYTAIRE B	126
A.	NEUROTENSINE ET PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE B.	126
1.	<i>La neurotensine n'a aucun effet sur la prolifération des différentes lignées B cultivées en condition basale (10% SVF).....</i>	126
2.	<i>La neurotensine augmente la prolifération des lignées lymphocytaires B en condition de stress pro-apoptotique indépendamment du stade de maturation.</i>	127
B.	LA NEUROTENSINE EST IMPLIQUEE DANS LES MECANISMES DE RESISTANCE A L'APOPTOSE EN CONDITION DE STRESS CELLULAIRE.	129
1.	<i>Modulation de l'apoptose induite par la privation sérique par la neurotensine exogène.</i>	129
2.	<i>Modulation de l'apoptose induite par l'activation de Fas par la neurotensine exogène.</i>	131
3.	<i>Identification des récepteurs impliqués dans l'effet anti-apoptotique de la neurotensine exogène</i>	134
4.	<i>Etude de la localisation membranaire des récepteurs à la neurotensine en situation de stress pro-apoptotique</i>	134
5.	<i>Effet de la neutralisation des différents récepteurs de la neurotensine sur l'apoptose induite par 24 heures de privation sérique au niveau de la lignée plasmocytaire RPMI</i>	135

a.	Neutralisation de NTSR-3	135
b.	Neutralisation de NTSR-1	136
c.	Neutralisation de NTSR-2	137
d.	Neutralisation conjointe des récepteurs.....	138
III	NEUROTENSINE ET LYMPHOCYTES B HUMAINS SAINS	140
A.	L'EXPRESSION DES DIFFERENTS RECEPTEURS DE LA NEUROTENSINE DIFFERE SELON LE CARACTERE NORMAL OU TUMORAL DES CELLULES ETUDIEES	140
1.	<i>Expression des transcrits</i>	140
2.	<i>Expression protéique</i>	141
B.	L'EXPRESSION DE LA NEUROTENSINE ET DE SES RECEPTEURS DANS LES LYMPHOCYTES B MURINS SERAIT EGALEMENT MODULEE PAR LE CARACTERE TUMORAL	143
	PARTIE II.....	145
I	NEUROTROPHINES ET MALADIES AUTO-IMMUNES.....	145
A.	NEUROTROPHINES ET SCLERODERMIE SYSTEMIQUE	145
B.	NEUROTROPHINES ET LUPUS ERYTHEMATEUX DISSEMINÉ	147
1.	<i>Profil clinique des patients atteints de lupus érythémateux disséminé</i>	147
a.	Données cliniques lors de l'inclusion	147
b.	Activité systémique.....	147
c.	Maladies auto-immunes associées	147
d.	Traitements.....	148
e.	Score de qualité de vie et échelle de dépression.	148
2.	<i>Profil biologique des patients atteints de LED</i>	148
3.	<i>Concentration sériques de NTs, profil Th1, Th2 et hyperactivation B</i>	149
a.	Concentrations sériques de NTs chez les LED et les témoins.....	149
b.	Concentrations sériques de BAFF, IL10, d'INF γ chez les patients et témoins.	150
c.	Concentrations sériques de NTs et activité lupique.....	150
d.	Evolution des concentrations sériques de NTs après traitement de la poussée.....	151
e.	Concentrations sériques de NTS et profil clinique	152
•	NGF, BDNF et profil clinique	152
•	NT-3 et profil clinique	152
f.	Concentrations sériques de NTS et profil biologique.....	152
•	NGF et profil biologique.....	152
•	BDNF et profil biologique.....	153
•	NT-3 et profil biologique.....	154
4.	<i>Résultats de la cytométrie de flux</i>	154
5.	<i>Comparaison entre LED et témoins volontaires sains</i>	155
a.	Expression des récepteurs aux neurotrophines.....	155
6.	<i>Expression des neurotrophines</i>	156
7.	<i>Expression lymphocytaires des NTs et de leurs récepteurs et activité.</i>	157

8.	<i>Expression lymphocytaires des NTs et de leurs récepteurs et profil clinico-biologique.....</i>	157
a.	Expression lymphocytaire et profil clinique	157
b.	Expression lymphocytaire et profil biologique.....	158
9.	<i>Corrélations concernant l'expression des NTs et de leurs récepteurs.</i>	160
C.	NEUROTROPHINES ET SYNDROME DE SJÖGREN PRIMITIF	162
1.	<i>Profil clinique des patients atteints de SGSp.....</i>	162
a.	Données cliniques lors de l'inclusion	162
b.	Activité systémique et séquelles antérieures	162
c.	Maladies auto-immunes associées	162
d.	Traitements.....	163
e.	Score de qualité de vie et échelle de dépression.	163
2.	<i>Profil biologique des patients atteints de SGSp.....</i>	164
3.	<i>Concentration sériques de NTs.....</i>	164
a.	Analyse des concentrations sériques de NTs chez les SGSp et les témoins	164
b.	Concentrations sériques de NGF et profil clinico-biologique	165
c.	Concentrations sériques de BDNF et profil clinico-biologique.....	166
d.	Concentrations sériques de NT-3 et profil clinico-biologique	167
e.	Concentrations salivaires de NTs	168
4.	<i>Résultats de la cytométrie de flux.....</i>	169
a.	Les Lymphocytes T régulateurs	169
b.	Résultats d'ensemble	170
c.	Expression des récepteurs TrkA, TrkB, TrkC et p75 ^{NTR}	172
d.	Expression des neurotrophines.....	172
e.	Etude des corrélations concernant les récepteurs des NTs et les NTs.....	173
	• Au sein du groupe des volontaires sains.....	173
	• Au sein du groupe des patients	176
f.	Comparaison entre les volontaires sains et les deux sous-groupes de patients	180
g.	Analyse univariée des résultats de CMF et des atteintes cliniques.....	181
h.	Analyse univariée des résultats de CMF et des traitements pris par les patients.....	183
i.	Analyse univariée des résultats de CMF et de la biologie	183
	DISCUSSION	184
I	NEUROTENSINE ET HOMEOSTASIE LYMPHOCYTAIRE B	186
A.	EXPRESSION DE LA NEUROTENSINE ET DE SES RECEPTEURS A L'ETAT BASAL	186
B.	ABSENCE D'ACTIVATION DES VOIES IMPLIQUANT LA NEUROTENSINE A L'ETAT BASAL	188
C.	LES RECEPTEURS DE LA NEUROTENSINE SONT ACTIVES SUITE A UN STRESS CELLULAIRE	189
D.	LES RECEPTEURS IMPLIQUEES N'ONT PU ETRE IDENTIFIES	191
E.	LA NEUROTENSINE EST IMPLIQUEE DANS LES PROCESSUS DE TUMORIGENESE B	193
F.	NEUROTENSINE ET RECEPTEUR NTSR-3 (SORTILINE) : FONCTION REGULATRICE DE LA SURVIE CELLULAIRE?	194
II	NEUROTROPHINES ET MAI	195

A. NEUROTROPHINES ET LED.....	195
B. NEUROTROPHINES ET SGSP	198
CONCLUSIONS	204
RÉFÉRENCES	206
ANNEXES	226

Liste des abréviations

A

AA:	Acides Aminés
Abl:	Ableson leukemia oncogene cellular homolog
ABTS:	2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid
ABI:	Applied Biosystems, Inc
Ac:	Anticorps
ADN:	Acide Désoxyribonucléique
ADNc:	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
Ag:	Antigène
AKT:	serine/threonine protein kinase Akt
AMPC:	Adénosine Monophosphate cyclique
APS:	Ammonium Persulfate
ARA:	Association Américaine de Rhumatologie
ARN:	Acide Ribonucléique
ARNm:	ARN messenger
ATCC:	American Type Culture Collection

B

Bad:	Bcl-X _L /bcl-2 associated death promoter homolog
BAFF:	B Cell Activating Factor of the TNF Family
BALF:	Bronchoalveolar Lavage Fluid
Bax:	Bcl-2 associated X protein
Bcl-X_L:	longer alternatively splice form of Bcl-2 homolog X protein from avian lymphocyte development
BCR:	B cell receptor
BDNF:	Brain Derived Nerve Factor
BET:	Bromure d'Ethidium
BILAG:	British Isles Lupus Assessment Group
BL-2:	Burkitt Lymphoma-2

BL-41: Burkitt Lymphoma-41
BLK: B lymphoid tyrosine kinase
bp: base pair
BSA: Bovine Serum Albumine

C

Caspase: Cystéine aspartate protéase ou cysteinyl aspartate-specific proteinase
CD: Cluster of Differentiation
Cdc: Cell division cycle
CDK: Cyclin Dependent Kinase
CENP: Centromere Protein
cKrox: ou ZBTB7B zinc finger and BTB domain containing 7B
CHO: Chinese Hamster Ovary
Cm: Centimètre
CMF: Cytométrie de flux
CMH: Complexe Majeur d’Histocompatibilité
CMV: Cytomégalovirus
CNRS: Centre National de Recherche Scientifique
CRE: cAMP Responsive Element
CREB: cAMP Response Element Binding protein
CSH: Cellule Souche Hématopoiétique
CTL: Lymphocytes T CD8 CD4
CTLA-4: Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4
CTCL: Cutaneous T cell Lymphoma
CTGF: Connective Tissue Growth Factor

D

Da: Dalton
DAG: Diacylglycérol
DLCO: Diffusion Libre du CO

DMEM:	Dulbecco Modified Eagle Medium
DNase:	Desoxyribonuclease
dNTP:	Desoxy-nucleic triphosphate
dSSc:	Diffuse Systemic Sclerosis
DTT:	Dithiotheritol

E

E2:	Extracellulaire 2
EBV:	Epstein Barr Virus
ECL:	Enhanced Chemiluminescent
ECLAM:	European Concensus for Lupus Activity Measurement
EDTA:	Ethylene Diamine Tetra acetic Acid
EDU:	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
EGF:	Epithelial Growth Factor
EGR-1:	Early Growth Response-1
ELISA:	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK:	Extracellular signal Regulated protein Kinase

F

FACS:	Fluorescent-Activated Cell Sorter
FADD:	Fas Associated Death Domain protein
Fas:	Fibroblast associated (récepteur)
Fas L:	Fas Ligand (ou CD95L)
FGF:	Fibroblast Growth Factor
FC:	Flow Cytometry
FITC:	Fluorescein-isothiocyanate
Fig:	Figure
FVC:	Forced Vital Capacity
FoxP3:	Forkhead box P3

G

GAPDH: D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2
Gq: G protein alpha q

H

HCl: Acide Chlorhydrique
HLA: Human Leukocyte Antigen
HRP: Horse Rabbit Peroxydase
HTAP: Hypertension Artérielle Pulmonaire

I

IFI: Immunofluorescence Indirecte
IFN- γ : Interféron gamma
Ig: Immunoglobuline
IL: Interleukine
IMF: Intensité Moyenne de Fluorescence
IP: Immunoprécipitation
IP3: Inositol Triphosphate

J

JNK: Jun Kinase

K

Kd: Constante de dissociation
Kda: Kilodalton
KO: Knock Out

L

LB: Lymphocyte B
LED: Lupus Erythémateux Disséminé
LPS: Lipopolysaccharide
ISSc: limited Systemic Sclerosis
LT: Lymphocyte T
LTP: Long Term Potentialisation

M

MADRS: Montgomery Åsberg Depression Rating Scale
MACS: Magnetic-Activated Cell Sorting
M6PR: Mannose-6-Phosphate Receptor
MAI: Maladie Auto-Immune
MAPK: Mitogen Activated protein Kinase
MgCl₂: Chlorure de Magnésium
mL: millilitre
MMP: Matrix Metalloproteinase
mRNA: messenger Ribonucleic Acid
MS: Magnetic Separation

N

NaCl: Chlorure de sodium
NADE: NGFRAP1 (NADE) nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1

NF-κB:	Nuclear Factor kappa B
NGF:	Nerve Growth Factor
NK:	Natural Killer
ng:	nannogramme
NO:	Nitric Oxide
NP40:	Nonided P-40
NRAGE:	Neurotrophin Receptor-interacting MAGE (Melanoma AntiGEN)
NRIF:	Neurotrophin Receptor Interacting Factor
NT:	Neurotrophine
NT-3:	Neurotrophine-3
NT4/5:	Neurotrophine-4/5
NTSR:	Neurotensin Receptor

P

P75^{NTR}:	Neurotrophine Receptor P75
pAG:	Patients atteints du syndrome de Sjören ayant une Atteinte exclusivement Glandulaire
pAS:	Patients atteints du syndrome de Sjören ayant une Atteinte Systémique
PAR:	Polyarthrite Rhumatoïde
Pb:	Paire de base
PBMC:	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS:	Phosphate buffer saline
PC:	Pro-Convertase
PC-5:	Phycocyanin-5
PC-7:	Phycocyanin-7
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PDK:	Phosphoinositide Dependent Kinase
PE:	Phycoerythrin
PFA:	Polyformaldéhyde
PI3K:	Phosphatidylinositide 3 kinase
PIP2/PIP3:	Phospholipide Inositol Biphosphate/ Phospholipide Inositol Triphosphate
PKC, PKA:	Proteine Kinase C ou A

PLC:	PhosphoLipase C
PM:	Poids Moléculaire
PMA:	Phorbol 12 Myristate 13 Acétate
PMSF:	Phenylmethanesulfonyl Fluoride
PWM:	Pokeweed
pSS:	forme primitive du syndrome de Goujerot-Sjögren
PVDF:	Polyvinylidene Fluoride

R

RANTES:	Regulated upon Activation T cell Expressed and Secreted
RAP:	Receptor-Associated Protein
RCPG:	Récepteur Couplé aux Protéines G
RDB:	RNA Dilution Buffer
RE:	Réticulum Endoplasmique
RhoA:	Ras HOmolog gene family, member A
RIP:	Receptor Interacting Protein
RLA:	RNA Lysis Buffer
RNA:	Ribonucleic Acid
RNase:	Ribonuclease
Ro:	particule ribonucléique
ROS:	Reactive Oxygen Species
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute
RSK:	Ribosomal S6 Kinase
RT-PCR:	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

S

SAS:	Statistical Analysis System
Sc-1:	Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteines-like 1
Scl-70:	Sclérodermie-70
Sd:	Standard deviation

SEM:	Standard Error of the Mean
SEP:	Sclérose En Plaque
SDS PAGE:	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SgS:	Syndrome de Goujerot-Sjögren
SH2-B:	Src Homology 2 Binding
Shc:	Src homology 2 containing transforming protein 1
SICC/ACRDI:	Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index
SJODAI:	Sjögren Disease Activity Index
SJSDDI:	Sjögren's Syndrome Disease Damage Index
SLAM:	Systemic Lupus Activity Measure
SLEDAI:	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
SN:	Système Nerveux
SNC:	Système Nerveux Central
SNP:	Système Nerveux Périphérique
SOS:	Son Of Sevenless homolog
SP1:	Specifity Protein 1
SS:	Systemic Sclerosis
SSa/SSb:	Sjogrens's Syndrome a/b
sSS:	forme secondaire du syndrome de Goujerot-Sjögren
STAT:	Signal Transducers Activators of Transcription
SVF:	Sérum de Veau Foetal

T

T°:	Température
TAE:	Tris-Acetate-EDTA
Taq:	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS:	Tris Base SDS
TCR:	T Cell Receptor
TGFβ:	Transcription Growth Factor beta
Th cells:	Helper T cells
TLR:	Toll Like Receptors

TMB: Tétraméthylbenzidine
TNF: Tumor Necrosis Factor
TNF-R: Tumor Necrosis Factor Receptor
Treg: Regulatory T cells
TRADD: TNFR-Associated Death Domain
TRAF: TNF-Receptor-Associated Factor
TRAIL: TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
Trk: Tropomyosine related kinase

U

UI: Unité Internationale
UMR: Unité Mixte de Recherche
USA: United States of America
UV: Ultra-Violet

V

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
Vsp10pD: Vacuolar protein sorting Domain

W

WB: Western Blot

Liste des tableaux

- Tableau I: Récapitulatif des différents anticorps utilisés en cytométrie (cyto), immunofluorescence indirecte (IFI) et western blot (WB) 93
- Tableau II: Isotypiques et anticorps secondaires utilisés en WB, IFI et cytométrie 95
- Tableau III: Liste des différents marquages réalisés au niveau lymphocytaire B et T dans le protocole NeuroLED (LED), NeuroSGSp (SGS) et dans la sclérodémie systémique (SSc). 107
- Tableau IV: Expression des NTs et de leurs récepteurs au niveau lymphocytaire T et B 156
- Tableau V: Récapitulatif des différences significatives existant entre les volontaires sains (VS), les pAG et les pAS 181

Liste des figures

- Figure 1 : Mécanismes de formation des pro-NTs et NTs matures 36
- Figure 2 : Caractérisation et voies de signalisation impliquant le récepteur p75^{NTR} 42
- Figure 3 : Représentation des neurotrophines et de leurs récepteurs Trk 44
- Figure 4 : Voies de signalisation mise en jeu lors de l'interaction NT/Trk 47
- Figure 5: structure et corécepteurs de la sortiline. 49
- Figure 6: Structure peptidique de la pro-neurotensine humaine 52
- Figure 7: Les différents mécanismes cellulaires impliquant la neurotensine et ses récepteurs 57
- Figure 8: Synthèse des différents rôles du NGF dans le système immunitaire 69
- Figure 9: Séquences et références des amorces utilisées en RT-PCR et permettant de mettre en évidence les transcrits codant pour la neurotensine et ces différents récepteurs (NTSR-1, NTSR-2, NTSR-3), chez l'homme (A) et chez la souris (B) 89
- Figure 10: Détection, à l'état basal, des transcrits codants pour les récepteurs 119
- Figure 11: Mise en évidence de l'expression protéique de NTSR-1 (55 kDa), NTSR-2 (65 kDa), NTSR-3 (95 kDa) au niveau des 7 lignées B humaines à l'état basal. 120
- Figure 12: Analyse de l'expression des NTR-1 et -2 sur cellules perméabilisées ainsi que de la neurotensine en conditions basales de culture. 121
- Figure 13: Analyse de l'expression des NTSR-1 -2 et -3 sur cellules non perméabilisées en cytométrie en flux en conditions basales de culture 122
- Figure 14: Détection des transcrits codants pour les récepteurs NTSR après 72 heures de cultures en privation sérique 124
- Figure 15: Détection de la présence des récepteurs et de la neurotensine par western blot après 72 h de privation sérique 125
- Figure 16: Détection de la présence de NTSR1 par western blot à l'état basal et après 72 h de privation sérique au niveau des lignées B humaines 125
- Figure 17: expression de la neurotensine (Alexa-Fluor 488) au niveau de la lignée plasmocytaire U266 après 3 jours de culture en privation sérique (0% J3). 126
- Figure 18 : Effet de la neurotensine exogène sur la prolifération des lignées Nalm6, B12, BL41 et RPMI après un (10 % J1) à deux jours (10 % J2) de culture en condition basale en présence ou en absence de 40 µmol/l de neurotensine exogène 127
- Figure 19: Effet de la neurotensine exogène (40 µM) sur la prolifération des lignées Nalm6, BL41 et RPMI après 1 et 3 jours de privation sérique. 128

- Figure 20: Effet de la neurotensine exogène (40 μ M) sur l'apoptose induite après 24 (J1) à 72 heures (J3) de privation sérique dans les lignées Nalm6, BL41 et RPMI en présence ou en absence de neurotensine exogène. 130
- Figure 21: Effet de la neurotensine sur l'apoptose des lignées BL2 et RPMI après activation de la voie FAS (24h). 132
- Figure 22: Effet de la neurotensine sur l'apoptose de la lignée U266 à 3 jours de privation après activation de la voie Fas. 133
- Figure 23: Analyse de l'expression des NTR-1 -2 et -3 sur cellules non perméabilisées en cytométrie en flux après 24h de privation sérique 135
- Figure 24: Influence de la neutralisation du récepteur NTSR-3 (anti NTR3) combinée ou non à l'adjonction de neurotensine (40 μ M, N + anti NTR3) sur l'apoptose induite par 24 heures de privation sérique (0% SVF J1) au niveau de la lignée plasmocytaire RPMI. 136
- Figure 25: Influence de la neutralisation du récepteur NTSR-1 (50 nM, BN-6) combinée ou non à l'adjonction de neurotensine (40 μ M, N + BN-6) sur l'apoptose induite par 24 heures de privation sérique (0% SVF, J1) au niveau de la lignée plasmocytaire RPMI. 137
- Figure 26: Influence de la neutralisation du récepteur NTSR-2 par des concentrations croissantes de lévocabastine (2, 4 et 8 μ M) combinée ou non à l'adjonction de neurotensine (40 μ M, N) sur l'apoptose induite par 24 heures de privation sérique (0% SVF, J1) au niveau de la lignée plasmocytaire RPMI. 138
- Figure 27: Influence de la neutralisation conjointe des récepteurs NTSR-1 (B-N6), NTSR-2 (levocabastine, levo) et de NTRS-3 (anti-NTR3) combinée ou non à l'adjonction de neurotensine (40 μ M, N) sur l'apoptose induite par 24 heures de privation sérique (0% SVF, J1) au niveau de la lignée plasmocytaire RPMI. 139
- Figure 28: Détection des transcrits codants pour les récepteurs NTSR-1 (200 pb), -2 (240 pb) et -3 (231 pb) et pour la neurotensine (148 pb) au niveau de LB humains circulants issus de 3 donneurs volontaires sains. 141
- Figure 29: Mise en évidence du récepteur NTSR-2 et de NTSR-3 au niveau de LB humains circulants issus de respectivement, 6 et 3 volontaires sains par la technique de western blot. 141
- Figure 30: Mise en évidence par immunofluorescence indirecte du récepteur NTSR-2 au niveau de LB humains sains circulants. 142

- Figure 31: Détection des transcrits codants pour les récepteurs NTSR et pour la neurotensine au niveau de lignées B et de cellules B murines à différents stades de maturation. 144
- Figure 32: Concentrations sériques de NGF (A), de BDNF (B) et de NT-3 (C) chez les patients atteints de LED (LED, graphes bleus) et les témoins sains (TEM, graphes gris). 149
- Figure 33: Concentrations sériques de NGF (A), de BDNF (B) et de NT-3 (C) chez les patients atteints de LED présentant une poussée sévère (SLEDAI > 10, graphes roses), modérée (SLEDAI < 10, graphes bleus) et les témoins sains (TEM, graphes gris). 151
- Figure 34: concentrations sériques de BDNF chez les patients atteints de LED avant (LED1, graphes bleus) et après (LED2, graphes verts) traitement de la poussée par comparaison aux témoins (TEM, graphes gris). 152
- Figure 35: Corrélation entre les concentrations sériques de NGF et les T régulateurs circulants (évaluation cytométrique CD25⁺⁺, FoxP3⁺). 153
- Figure 36. Corrélation entre les concentrations sériques de BDNF et l'existence d'anticorps anti-cardiolipides. 153
- Figure 37. Corrélation entre les concentrations sériques de NT-3 et les concentrations de CH50. 154
- Figure 38: Corrélation entre les concentrations sériques de BAFF et l'expression lymphocytaire B de p75^{NTR} (A) et T de TrkA (B), de TrkC (C) et p75^{NTR} (D). 159
- Figure 39 : Récapitulatif des corrélation entre patients et témoins. 161
- Figure 40 : Taux sériques et salivaires de NGF, BDNF et NT3 164
- Figure 41. Corrélation entre les concentrations sériques de NGF et hémoglobine (à gauche) et numération plaquettaire (à droite). 165
- Figure 42. Corrélation taux sériques de BDNF et intensité moyenne de fluorescence intracytoplasmique lymphocytaire B. 167
- Figure 43. Corrélation négative entre augmentation des concentrations de NT-3 et numération leucocytaire. 168
- Figure 44. Courbes de régression linéaire et coefficients de corrélation (analyse de variance) entre les taux salivaires et sanguins de NGF (A) et de NT-3 (B) 169
- Figure 45: Stratégie de gating des LT régulateurs. 170
- Figure 46: Résultats types obtenus pour la sortiline membranaire sur les lymphocytes (en rouge), les LB et les LT (en vert). 172
- Figure 47. Résultats types obtenus en intracytoplasmique dans les LB pour les différentes NTs. 173

- Figure 48 : Récapitulatif des résultats obtenus en CMF 171
- Figure 49. Corrélations positives d'un même récepteur membranaire sur les LB et les LT.
175
- Figure 50. Corrélations positives entre l'intensité moyenne de fluorescence du récepteur P75^{NTR} membranaire lymphocytaire B et celles des autres récepteurs exprimés à la membrane des LT. 177
- Figure 51. Corrélations négatives entre les différentes variables de la sortiline et les récepteurs TrkA, TrkC et p75^{NTR} membranaires 178
- Figure 52. Corrélations négatives entre l'intensité moyenne de fluorescence de la sortiline intracytoplasmique lymphocytaire B et le BDNF. 180
- Figure 53 : Stades de maturation lymphocytaire B (d'après Pr. Prin, 2005 <http://www3.univ-lille2.fr/immunologie/labo/Cours/dcem1/rpse-adapt.pdf>) 227

Liste des annexes

Annexe 1: Maturation des LB	p 227
Annexe 2: Critère révisés du syndrome de Sjögren primitif Critère révisés du syndrome de Sjögren primitif	p 229
Annexe 3: Score de SJODAI	p 230
Annexe 4: Score de VITALI	p 231
Annexe 5: Article 1	p 232
Annexe 6: Article 2	p 244

Introduction

Les neurotrophines et la neurotensine qui font l'objet de notre étude, sont des neuropeptides initialement découverts dans le système nerveux. Ces neuropeptides sont définis comme facteurs de croissance importants dans le maintien de l'homéostasie cérébrale. Ils exercent des fonctions importantes tant au cours du développement du système nerveux que dans la plasticité et la survie neuronale chez l'adulte, comme le montrent leurs implications physiopathologiques dans certaines maladies neurodégénératives et psychiatriques.

Leurs fonctions en dehors du système nerveux sont moins bien connues et suscitent un intérêt croissant dans le domaine de l'oncologie. Les premiers travaux qui en réfèrent concernent la neurotensine dans différents modèles de cancers solides. Ce n'est que plus récemment que les rôles des neurotrophines ont été également mis en évidence dans le développement tumoral. Outre ces fonctions physiopathologiques en oncologie, les données concernant le système immunitaire sont essentiellement rapportées pour les neurotrophines, initialement dans le contexte immunopathologique de la réaction allergique. Leurs fonctions dans la régulation lymphocytaire B et leurs implications dans les maladies auto-immunes demeuraient parcellaires. Les travaux récents de notre équipe ont mis en évidence la dualité fonctionnelle d'une neurotrophine, le Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), dans la survie lymphocytaire B (lignées lymphocytaires B humaines) selon sa forme mature, le BDNF, ou son précurseur, le pro BDNF, biologiquement actif. Ces différences fonctionnelles ont été identifiées et reposent sur la propriété d'une protéine, la sortiline, caractérisée jusqu'alors dans les neurones où, majoritairement intra-cellulaire, elle a pour fonction principale le transport des neurotrophines. Néanmoins, dans des conditions pro-apoptotique, elle est également exprimée à la membrane et est activatrice de la mort neuronale par l'intermédiaire du récepteur $p75^{\text{NTR}}$ récepteur à domaine de mort, appartenant à la superfamille des récepteurs au Tumor Necrosis Factor (TNF). Si ces données ont été bien définies au niveau neuronal, aucune étude antérieure à celle de notre équipe, n'avait rapporté la présence et la fonction de la sortiline dans les lymphocytes B. Ainsi, parmi les différents mécanismes régulant la survie lymphocytaire B, une nouvelle régulation a été mise en évidence dans notre groupe et dépend de l'affinité de liaison du BDNF et de son précurseur le pro-BDNF, respectivement, pour les récepteurs à tyrosine kinase (BDNF mature) ou pour le complexe formé par le récepteur à domaine de mort $p75^{\text{NTR}}$ et son corécepteur, la sortiline.

A la lumière de ces données mécanistiques, il nous est apparu important d'étudier l'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs dans les lymphocytes B circulants de malades atteints de pathologies autoimmunes systémiques afin de rechercher un éventuel déséquilibre d'expression, en comparaison à des sujets contrôles sains. Ceci fera l'objet d'une partie de ce travail et concernera 3 cohortes de malades atteints de lupus érythémateux disséminé, de syndrome de Goujerot Sjögren et de sclérodermie.

La sortiline ayant été caractérisée dans les lymphocytes B, nous avons également recherché l'expression d'un autre de ses ligands, la neurotensine, dans cette population lymphocytaire. Ainsi, l'autre partie de ce travail concernera l'expression de la neurotensine et de ses récepteurs spécifiques dans les lymphocytes B humains et murins, aucune donnée de la littérature n'ayant à ce jour décrit l'expression et la fonctionnalité lymphocytaire B de ce neuropeptide.

Revue Bibliographique

Cette revue de la littérature comportera une première partie décrivant les données concernant les neurotrophines et la neurotensine dans le système nerveux.

.....Secondairement, nous analyserons les études rapportant la fonction des neurotrophines et de la neurotensine dans d'autres tissus et leurs implications en Oncologie. La dernière partie reprendra les données acquises dans le système immunitaire et concerne principalement les neurotrophines.

Les neuropeptides sont des peptides dont la fonction de facteur de croissance a été initialement identifiée dans le système nerveux (SN). Ils sont issus de précurseurs dont le clivage génère les formes matures ayant une fonction de protection et de plasticité neuronales.

Parmi les nombreux neuropeptides, notre intérêt sera particulièrement porté sur 2 types de peptides: les neurotrophines (NTs) et la neurotensine dont les fonctions lymphocytaires ont fait l'objet de notre étude.

I Neuropeptides et système nerveux

A. Les neurotrophines

L'isolement et la purification de la première neurotrophine (NT), le Nerve Growth Factor (NGF), en 1950 par l'équipe de R. Levi-Montalcini à partir de glandes salivaires de serpents, ont permis d'étudier les propriétés de ce facteur de croissance des neurones *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, le NGF permet la survie et la différenciation (croissance neuritique) de neurones sympathiques embryonnaires de poulet. *In vivo*, il présente un effet remarquable sur la survie des neurones sympathiques [1, 2].

La famille de NTs comptera 30 ans plus tard, 3 autres membres, le Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) [3], la Neurotrophin-3 (NT-3) et la Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) [4, 5] et 4/5 (NT-4/5) [6-8]. Ces neuropeptides sont définis comme des facteurs de croissance impliqués dans la prolifération, la survie et la différenciation neuronales et astrocytaires.

D'abord synthétisées sous forme de précurseurs (les pro-NTs ou formes immatures), les pro-NTs subissent un clivage protéolytique générant leur forme mature. Ces deux formes interagissent avec deux types de récepteurs:

- les récepteurs « Tropomyosin-Related Kinase » (Trk) récepteurs à tyrosine kinase, de forte affinité pour les NTs matures
- et le récepteur p75^{NTR} dit de faible affinité pour les NTs matures, qui appartient à la superfamille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor), en raison de la présence d'un domaine de mort intra-cellulaire.

Largement décrits au niveau du système nerveux central (SNC) et du système nerveux périphérique (SNP), ces neuropeptides sont largement présents dans des tissus non-neuronaux, notamment au niveau du système immunitaire, où leurs propriétés biologiques leur confèrent des fonctions de « neuro »-cytokines.

Dans un premier temps, nous décrirons la structure et les modes d'action des différentes NTs au niveau de leurs cellules cibles neuronales et astrocytaires, et secondairement nous présenterons les rôles respectifs du NGF, du BDNF et de la NT-3 au niveau du système immunitaire.

1. -Biologie des neurotrophines

La distribution spécifique des NTs et de leurs récepteurs au niveau cérébral contribue à leurs fonctions dans les processus de développement et de plasticité neuronales. La mise en place de ces mécanismes de neuro-prolifération et de neuro-protection est dépendante d'un contrôle étroit de leur synthèse et de l'expression de leur récepteur par les cellules cibles [9].

Les NTs matures (118 à 129 acides aminés) sont générées par le clivage protéolytique intra- et extra-cellulaire d'un précurseur pré-pro-neurotrophine d'environ 260 à 266 acides aminés [10-14]. Lors du trafic intracellulaire, la séquence peptide signal des précurseurs est clivée dès leur sortie du réticulum endoplasmique [10-14]. Puis, les proNTs forment des homodimères de 60 kDa qui vont être acheminés vers le Golgi [10-14]. La forme mature homodimérique de 28 kDa est ensuite générée par clivage protéolytique de l'extrémité N-terminale, processus dépendant de protéases intra-cellulaires et de MMP extra-cellulaires [10-14].

Au niveau du SNC, les pro-NTs sont généralement clivées en intra-cellulaire par des furines protéases mais, également à un moindre degré, par les pro-protéines convertases PC1 et PC2 [10-14]. Le pro-BDNF est la pro-NT la moins sensible au clivage par des furines protéases mais peut également être clivé, à un moindre degré, par d'autres pro-protéines convertases [11]. Les capacités d'excrétion du BDNF mature pourraient donc dépendre du répertoire de pro-protéines convertases présentes dans un type cellulaire [11]. Les sites de glycosylations situés au niveau des pro-domaines interviendraient également dans la régulation du transport et de la sécrétion des NTs, par des mécanismes non encore élucidés [13].

Au niveau extra-cellulaire, le pro-BDNF est clivé par les MMP-3, MMP-7, MMP-9 alors que le NGF mature est généré par l'action de la MMP-7 [12]. La plasmine peut également cliver le pro-BDNF en extra-cellulaire, le site de clivage étant différent de celui des furines protéases et des MMP, générant ainsi un BDNF mature de plus haut poids moléculaire mais biologiquement actif [15].

Ces différentes étapes de protéolyse vont générer plusieurs isoformes de NGF et de BDNF dont les masses moléculaires vont de 14 kDa (NT mature) à 30 kDa (pro-NT). La forme mature d'environ 118 à 129 acides aminés ainsi générée est sécrétée dans le milieu extracellulaire (**Figure 1**).

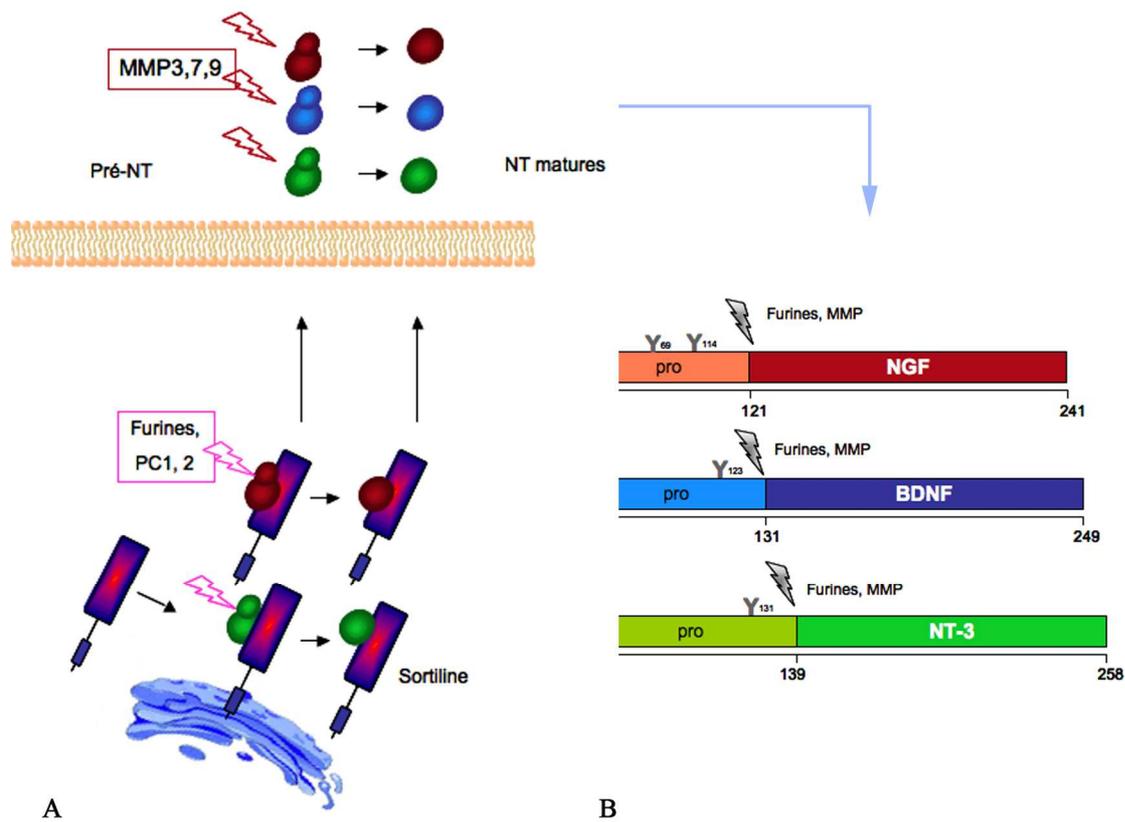


Figure 1 : Mécanismes de formation des pro-NTs et NTs matures

Le peptide signal (pre) est clivé au niveau du réticulum endoplasmique permettant ainsi de générer la forme pro-NT (A). Ces pro-NT sont alors transportées au niveau du Golgi et sécrétées sous forme de pro-NTs ou de NTs matures après clivage protéolytique par des furines protéases intra-cellulaires ou des MMP extracellulaires (A, B). Les formes matures sont sécrétées dans le milieu extracellulaire. Les sites potentiels de glycosylation seraient impliqués dans les mécanismes modulant la sécrétion de ces NTs.

2. - Spécificité des différentes neurotrophines

a. - Le NGF

Situé sur le chromosome 1 chez l'Homme, le NGF est synthétisé sous deux formes biologiquement actives, la forme immature (26 kDa) et la forme mature (13kDa) après clivage protéolytique [12]. Le NGF est constitué de 3 chaînes polypeptidiques α , β , γ interagissant pour former la protéine. Seule la chaîne β est responsable des propriétés biologiques du NGF [16].

Deux récepteurs pouvant lier le NGF ont été identifiés, le récepteur TrkA qui se lie spécifiquement à la forme mature et le récepteur p75^{NTR} qui reconnaît les 2 formes, avec une affinité de liaison supérieure pour la forme immature [17]. Ces récepteurs vont être activés après dimérisation ou recrutement de protéines adaptatrices. Des voies de signalisation TrkA-dépendante ou p75^{NTR}-dépendante sont donc à l'origine des effets induits par le NGF. Les effets du NGF matures sont principalement médiés par le récepteur TrkA, toutefois, p75^{NTR} a un rôle important dans la modulation de la transduction du signal : il a été démontré que les récepteurs TrkA et p75^{NTR} pouvaient interagir, ce qui avait pour conséquence l'augmentation de l'affinité du ligand pour le récepteur TrkA [18-20].

Le NGF et son récepteur TrkA sont exprimés dans les phases tardives du développement, puis tout au long de la vie, par les cellules neuronales (SNC et SNP) et non neuronales (système immunitaire, et d'autres tissus tels que le sein, et la prostate *cf infra*).

Le NGF a un rôle endogène de neuroprotection. Il favorise la survie, la différenciation des neurones sensitifs et sympathiques ainsi que la croissance neuritique [21]. La fixation du NGF sur son récepteur TrkA est essentielle pour le fonctionnement des neurones sympathiques et nociceptifs ainsi que pour la mise en place de fonctions cognitives élaborées [21].

De plus, son expression ainsi que celle de son récepteur serait régulée positivement par de nombreuses cellules, cytokines et médiateurs de l'inflammation après un dommage, une ischémie, une inflammation tissulaire conférant à cette NT un rôle prépondérant dans la réparation tissulaire au sein des SNC et SNP [22]. Ainsi, lors d'une atteinte tissulaire, les cellules gliales sécrètent le NGF nécessaire à la réparation neuronale, sous l'influence de différents stimuli pro-inflammatoires (cytokines, LPS, ROS, agoniste glutamatergique) [23, 24]. Le FGF (Fibroblast Growth Factor), l'IL-1 vont également favoriser l'augmentation de l'expression de ce neuropeptide [25, 26].

De nombreuses cellules non-neurales produisent du NGF tout au long de la vie chez l'adulte : les cellules des glandes salivaires, de la peau (kératinocytes, mélanocytes, fibroblastes), les cellules musculaires, endothéliales [27]. Toutefois, la majorité du NGF circulant humain provient des cellules des glandes salivaires [28].

b. - Le BDNF

Le BDNF, deuxième NT découverte, a été isolé à partir de SNC de porc et identifié comme facteur de survie pour les cellules ne répondant pas au NGF [3]. Le BDNF est le deuxième membre de la famille des NTs à avoir été identifié [3] et possède un rôle majeur dans la régulation de la survie et de la différenciation neuronale, tant au niveau du développement du système nerveux central que de son homéostasie chez l'adulte [29]. Le BDNF permet la régulation de la plasticité neuronale ainsi que l'organisation et la maintenance des connections neuronales au niveau du cerveau embryonnaire et adulte [30].

Le BDNF interagit préférentiellement avec la cellule nerveuse par l'intermédiaire de son récepteur à haute affinité, TrkB, dans sa forme complète de 145 kDa. La présence extracellulaire de BDNF, à des concentrations de l'ordre du picomolaire, induit l'homodimérisation du récepteur TrkB-145kDa et la transduction du signal intra-cellulaire, en induisant la phosphorylation du motif tyrosine kinase [31]. A la naissance, l'expression de BDNF est faible. Ce n'est que dans les premières phases post-natales du développement que son expression augmente considérablement. Le BDNF est exprimé dans de nombreuses régions du cerveau, notamment au niveau du système limbique (hippocampe), du néocortex et du cervelet. Dans l'hippocampe, le BDNF potentialise la transmission synaptique à la base du mécanisme de potentialisation synaptique à long terme (LTP, Long Term Potentiation) [32].

Au cours d'épisodes dépressifs majeurs ou de stress, la synthèse de BDNF est diminuée suggérant ainsi une implication du BDNF dans la physiopathologie de ces maladies [33]. Des variations du niveau d'expression de cette NT pourraient être à l'origine de troubles de l'humeur [34]. Cette NT est également connue pour activer la voie des sphingomyélinases [35].

Sécrétion de BDNF

Au niveau du SN, le BDNF est produit en majorité par les neurones du cortex et de l'hippocampe. Au niveau périphérique, différents types cellulaires produisent du BDNF. Cette NT peut ainsi être sécrétée par des fibroblastes, des cellules épithéliales ou encore des kératinocytes [36]. Elle est également produite par des cellules du système immunitaire

(lymphocytes, mastocytes) [37, 38]. De plus, l'expression du BDNF a également été observée dans différentes lignées tumorales [39]. Toutefois, les plaquettes sanguines constituent le réservoir essentiel de BDNF circulant [40].

c. La NT-3

Cette NT est présente dans l'ensemble des zones du SNC. Elle est particulièrement fortement exprimée au niveau du cortex cérébral, de l'hippocampe et du cervelet notamment lors du développement périnatal [41]. Cette NT est essentielle pour les phénomènes de maturation neuronale et est exprimée très tôt au cours de développement. A l'âge adulte, son rôle est alors essentiellement lié aux phénomènes de régulation des voies glutamatergiques dans lesquelles NT-3 jouerait un rôle antagoniste du BDNF [42, 43].

Sécrétion

La synthèse de ce neuropeptide est essentiellement cérébrale (cellules neuronales et astrocytaires). Les cellules non-neuronales peuvent également sécréter cette NT, comme c'est le cas pour les fibroblastes de la peau [44]. Toutefois, les données concernant sa sécrétion par d'autres types cellulaires non neuronaux sont assez éparses.

3. - Récepteurs aux NTs

a. - Le récepteur p75^{NTR}

Structure

p75^{NTR} fut le premier récepteur aux NTs identifié dans un premier temps comme récepteur du NGF [45, 46]. Il a été démontré par la suite que cette glycoprotéine transmembranaire se liait à chaque NTs avec la même affinité, de l'ordre du nanomolaire [45, 46]. p75^{NTR} appartient à la superfamille des récepteurs au TNF et à ce titre est composé d'un domaine extracellulaire constitué de 4 motifs répétés riches en cystéine, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire constitué d'un domaine de mort [47, 48]. Ce domaine de mort, dépourvu d'activité catalytique intrinsèque, sert à l'établissement des interactions protéines-protéines conduisant à l'émission des différents signaux. Ce récepteur est impliqué dans les mécanismes de contrôle de la viabilité cellulaire par régulation des mécanismes apoptotiques. Il a pu être observé des mécanismes apoptotiques NGF ou BDNF dépendant au sein de cultures de neurones, d'oligodendrocytes ou encore de cellules hépatiques [49-52].

Il peut agir en tant que corécepteur des récepteurs Trk et favoriser l'augmentation de la fixation du ligand pour ce type de récepteur. Il peut agir également en tant que récepteur des pro-NTs ou agir sur les transports rétrogrades et antérogrades de ces NTs [49-52]. L'interaction NT/p75^{NTR} favorise l'activation de différentes voies telles que la voie des céramides. Il est maintenant clairement établi que p75^{NTR} est impliqué dans l'apoptose neuronale, en revanche les mécanismes mis en jeu sont encore mal connus. En effet, il pourrait agir aussi bien en inhibant l'activation des récepteurs Trk ou en initiant par lui-même un signal pro-apoptotique.

Les voies de signalisation pro-apoptotiques actuellement connues donnent un rôle central à la MAP-Kinase JNK qui conduit à l'activation des caspases. JNK peut être activée par trois voies différentes : le recrutement de protéines adaptatrices, la synthèse de céramides et l'activation de la protéine G Rac 1.

Les protéines adaptatrices comprennent NRIF et NRAGE. Elles sont recrutées respectivement par l'intermédiaire du domaine de mort et du domaine juxtamembranaire et sont capables d'activer directement JNK [53, 54]. Par ailleurs, NRAGE est capable d'activer directement p53 sans utiliser JNK comme intermédiaire [55].

L'activation de p75^{NTR} entraîne également celle des sphingomyélinases membranaires. Celles-ci clivent leur substrat, la sphingomyéline, en céramides qui sont alors capables d'activer JNK [56, 57].

Enfin, des équipes ont également montré qu'après liaison de p75^{NTR} avec une proNT, la protéine G Rac 1 était activée et entraînait une cascade de phosphorylation via les MAPK kinases puis les MAPKK 4 et 8, spécifiques de JNK [58, 59]. Lorsque JNK est activée, elle induit la phosphorylation et donc l'activation des facteurs pro-apoptotiques Bim, Bid, Bax et p53 qui entraînent à leur tour la libération du cytochrome C à partir des mitochondries. La voie des caspases est alors activée, en particulier les caspases 3, 6 et 9 conduisant à l'apoptose [60, 61]. De plus, JNK peut également phosphoryler c-jun conduisant ainsi à la formation du facteur de transcription AP-1. Deux des gènes ciblés ont été identifiés : celui de la protéine Bim et Dp5. Ces deux protéines appartiennent au groupe des protéines pro-apoptotiques et possèdent un domaine BH3 (*Bcl-2 Homology Domain 3*) et sont donc également capables d'entraîner l'apoptose [62].

NRIF peut également recruter TRAF6 qui induit sa polyubiquitinylation, entraînant sa migration dans le noyau où il joue alors le rôle de répresseur de la transcription et conduit à un arrêt du cycle cellulaire [63, 64].

La protéine NADE est également capable d'induire l'apoptose de certaines lignées cellulaires après activation du récepteur p75^{NTR} mais sans mise en jeu de JNK et de la voie des caspases. Son mode d'action est encore inconnu [65].

Enfin, la protéine adaptatrice SC-1 peut également être recrutée par p75^{NTR}. Elle migre alors du cytosol dans le noyau où elle induit par des mécanismes moléculaires encore inconnus, un arrêt du cycle cellulaire [66] (**Figure 2**).

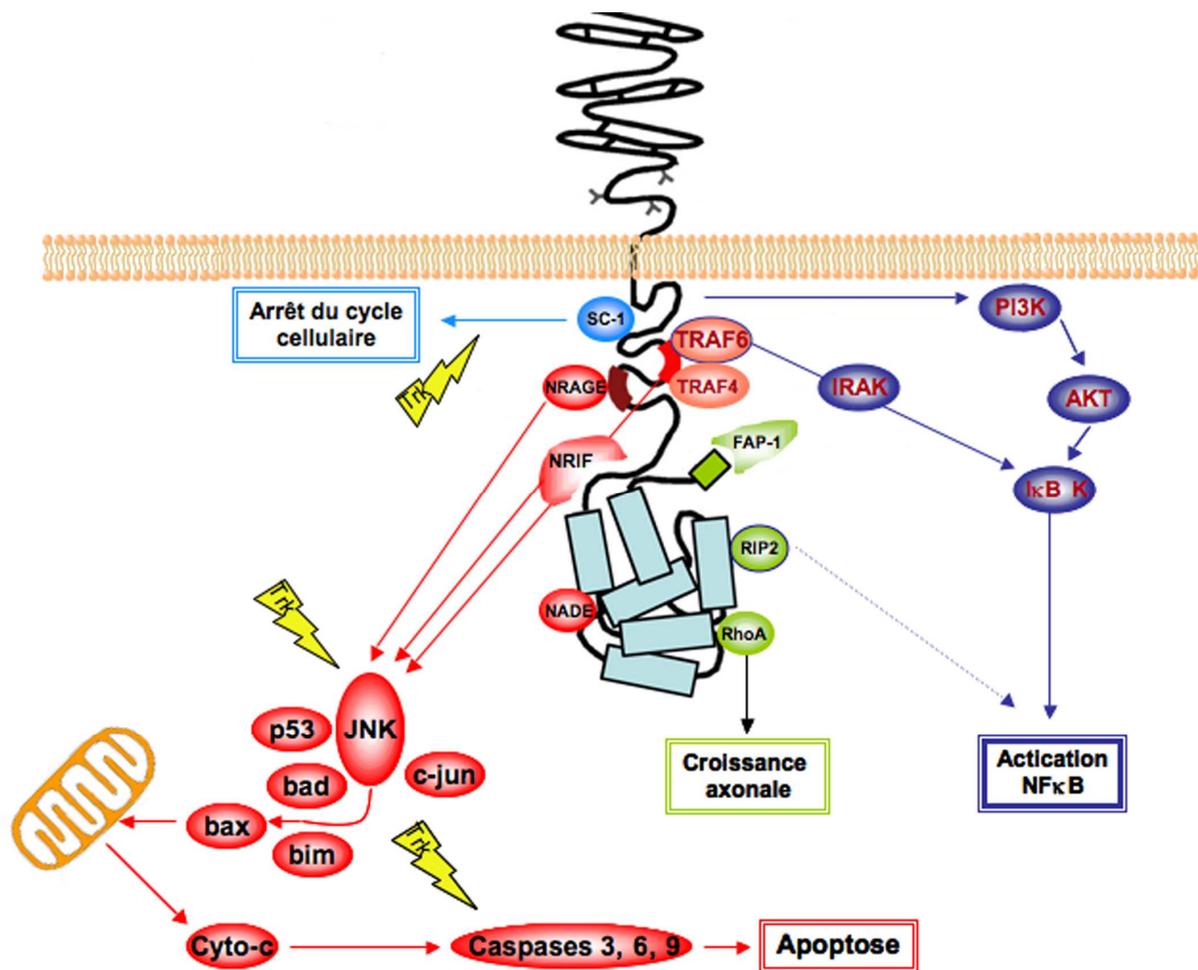


Figure 2 : Caractérisation et voies de signalisation impliquant le récepteur p75^{NTR}

La liaison des NTs matures ou des proNTs induit l'activation de différentes voies de signalisation pouvant conduire à la prolifération, la croissance neuritique, l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire. Les protéines adaptatrices NRAGE et NRIF induisent l'activation de la MAPK JNK, puis la phosphorylation des facteurs pro-apoptotiques Bim, Bid, Bax et p53 stimulant la libération de cytochrome c à partir des mitochondries, et ainsi l'activation des caspases -9,-6et -3 qui conduit à l'apoptose. D'après Arevalo [67].

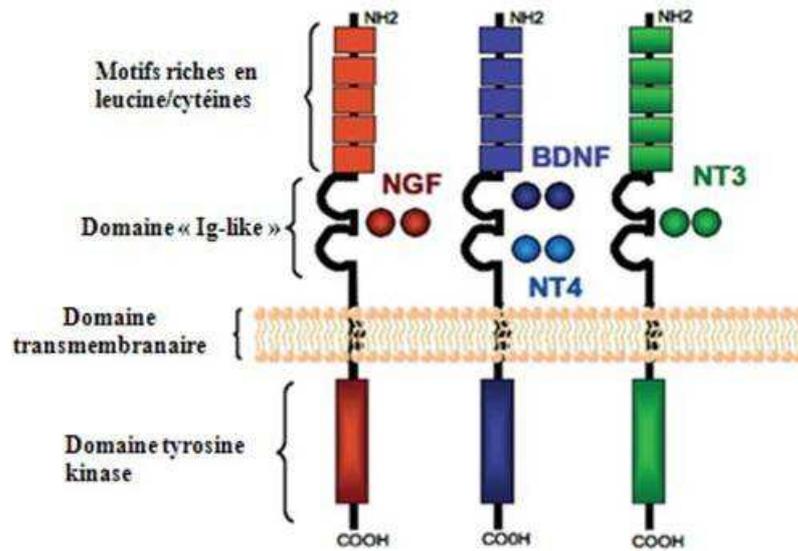
Cyto-c : cytochrome c ; MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase; JNK: C-Jun N-Terminal Kinase ; NRIF : Neurotrophin-Receptor Interacting Factor ; NADE: Neurotrophin-Associated Cell Death Executor ; NRAGE : Neurotrophin-Receptor-Interacting MAGE Homologue ; TRAF6: TNF Receptor-Associated Factor 6.

b. Récepteurs de type Trk

• Structure des Trk

La deuxième classe de récepteurs appartient à la famille de récepteurs aux tyrosines kinases. Trois récepteurs spécifiques de NTs ont été identifiés, TrkA, TrkB et TrkC. Le récepteur TrkA fut le premier récepteur caractérisé [68, 69], tout d'abord comme récepteur tropomyosine kinase impliqué dans les mécanismes proto-oncogènes [70] puis comme récepteur spécifique du NGF [71]. Les deux autres récepteurs ont été identifiés par homologie de séquence avec le récepteur TrkA [68, 72]. Ces différents récepteurs présentent une haute affinité de liaison pour les NTs matures et se lient préférentiellement à chacun de ces neuropeptides. TrkA se lie spécifiquement au NGF, TrkB au BDNF et à NT-4/5 et TrkC au NT-3 [73]. NT-3 peut également se lier aux 3 récepteurs. Ces récepteurs sont des récepteurs transmembranaires constitués de 3 domaines. Le domaine extracellulaire est constitué d'un motif riche en leucine entouré par deux motifs riches en cystéine, ainsi que d'un domaine « Ig-like ». Le domaine transmembranaire est constitué d'une courte hélice. La partie intracellulaire possède le domaine à activité tyrosine kinase (**Figure 3**). Ces 3 récepteurs sont caractérisés par cette structure de 145 kDa. Toutefois, il existe des isoformes tronquées des récepteurs TrkB et TrkC, dépourvus de domaine à activité tyrosine kinase. L'interaction NT/Trk s'effectue essentiellement au niveau du domaine « Ig-like » [74, 75]. Contrairement au récepteur p75^{NTR}, l'activation des récepteurs Trk se fait par dimérisation, ce qui a pour conséquence la transphosphorylation du domaine tyrosine kinase [76].

L'activité tyrosine kinase est due aux 2 résidus tyrosine situés respectivement au niveau juxta membranaire (motif NPXY) et au niveau C terminal (motif YLDIG) [77, 78].



Arévalo et al., *Cell. Mol. Life Sci.* 2006

Figure 3 : Représentation des neurotrophines et de leurs récepteurs Trk

Les neurotrophines NGF, BDNF, NT-3 et 4 se lient aux différents récepteurs en fonction de leur affinité. NGF se lie préférentiellement au récepteur TrkA, le BDNF et la NT-4 au récepteur TrkB et la NT-3 au récepteur TrkC. Le récepteur Trk est un récepteur de 145 kDa possédant un domaine extracellulaire riche en leucine /cystéine et un domaine « Ig-like », un domaine transmembranaire et un domaine à activité tyrosine kinase. La fixation des NTs et la dimérisation des récepteurs s'effectuent au niveau du domaine Ig-like permettant l'activation de voies de survie.

➤ **TrkA**

Ce récepteur transmembranaire a été décrit pour la première fois dans les processus oncogéniques au sein de cellules cancéreuses colorectales humaines, la lignée HT-29 [69]. Ce n'est que quelques années plus tard que sa fonction de récepteur au NGF fut démontrée dans des fibroblastes, puis dans des mécanismes de prolifération et de survie neuronales [68, 79]. L'interaction TrkA/NGF est ainsi impliquée dans l'activation de voies de signalisation anti-apoptotiques. La fixation du NGF sur le récepteur TrkA entraîne sa dimérisation et son activation. Il s'ensuit la phosphorylation des tyrosines 490 et 785 conduisant à l'activation de la PI3K/AKT [69]. La PI3K activée permet la catalyse des PIP2 en PIP3 permettant ainsi le recrutement et l'activation de PDK1. AKT est alors activée après phosphorylation des thréonine 308 et sérine 473 ce qui conduit à l'activation de Bad par phosphorylation des sérines 112 et 136. Bad phosphorylé forme alors un hétérodimère avec la protéine 14.3.3, ce qui empêche la formation de l'hétérodimère Bad/Bcl-XL. Bcl-XL libre va former un hétérodimère avec Bax, empêchant ainsi la formation d'homodimère Bax et donc la transmission de signaux apoptotiques [69].

La phosphorylation de la tyrosine 785 au niveau de la partie C-terminale du récepteur permet également le recrutement d'enzymes telles que la PLC γ et la PKC [69].

Le NGF a un effet sur la motilité cellulaire par l'activation de la voie impliquant la protéine c-Abl (tyrosine kinase non associée à un récepteur). Lors de l'activation du récepteur, c-Abl s'associe au niveau de la région juxta membranaire. Ceci entraîne l'activation de c-Abl et le recrutement de la paxilline ; ces acteurs sont impliqués dans les mécanismes de régulation du cytosquelette et de la motilité cellulaire au cours du développement neuronal [80, 81].

➤ **TrkB**

TrkB, récepteur spécifique du BDNF et de la NT-4, peut, cependant, être activé par la NT-3 [69]. Il présente une homologie de séquence identique à 57 % à celle du récepteur TrkA [69].

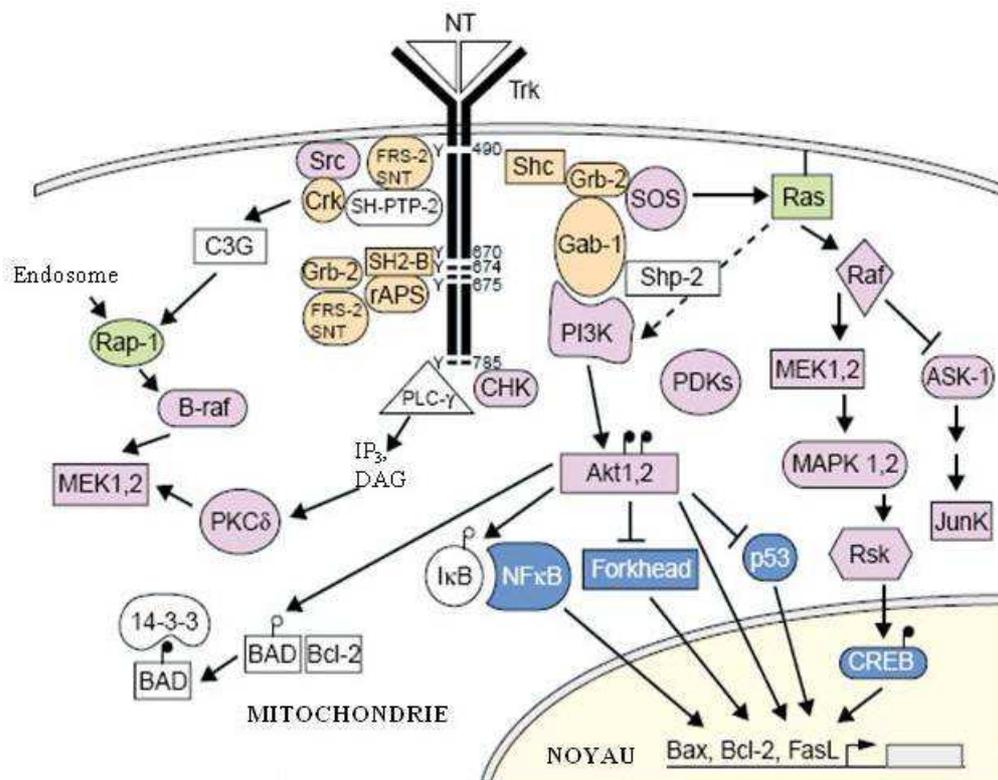
La forme complète est exprimée dans les cellules neuronales du SNC et également dans d'autres types cellulaires non-neuronaux, alors que la forme tronquée se retrouve aussi bien dans les neurones que dans les cellules gliales [82].

➤ **TrkC**

Ce récepteur, qui présente également une structure tyrosine kinase conservée, est le récepteur spécifique de la NT-3 [83].

• **Fonctions des récepteurs Trk**

Les cascades intra-cellulaires recrutées par ces récepteurs impliquent essentiellement 3 voies de signalisation (MAPKinases, PI3K/AKT, PLC γ), schématisées dans la **Figure 4** [84]. Ainsi, par exemple, les différentes protéines adaptatrices recrutées lors de la dimérisation des récepteurs favorisent l'activation de Ras, acteur indispensable à la différenciation et à la survie neuronales [84]. L'activation des récepteurs favorise également le recrutement des molécules Cdc42 et Rac [84]. Bien qu'impliquées dans les processus de différenciation et de survie neuronales, les NTs activent également des protéines de la famille des RhoGTPases participant ainsi à l'organisation du cytosquelette et à la motilité cellulaire [84].



Patapoutian et Reichardt, *Current opinion in neurobiology*, 2001

Figure 4 : Voies de signalisation mise en jeu lors de l'interaction NT/Trk

La fixation du peptide sur le récepteur entraîne sa dimérisation, l'activation d'une cascade de phosphorylation et le recrutement de protéines adaptatrices et d'enzymes, permettant ainsi l'activation de diverses voies cellulaires. Les deux tyrosines situées (Y490 et Y785 pour TrkA) dans le domaine intracellulaire vont être phosphorylées suite à l'interaction ligand/récepteur et vont constituer des points d'ancrage pour différentes protéines adaptatrices et enzymes. Y490 phosphorylée entraîne le recrutement de la protéine adaptatrice Shc, tandis que Y785 induit le recrutement de la PLCγ. Les autres tyrosines kinases phosphorylées (Y670, Y674, et Y675) peuvent également recruter d'autres adaptatrices comme SH2B, APS, et Grb2. Le recrutement de ces différentes protéines adaptatrices va déclencher l'activation des voies MAPK (Ras, Rap), PI3K, PLCγ conduisant à des signaux de prolifération et de survie cellulaire. L'activation de la voie des MAPK active des facteurs de transcription comme CREBp (cAMP-Response-Element Binding protein) *via* les kinases de la famille de Rsk.

c. - La sortiline : dualité fonctionnelle

• Fonction de transporteur

La sortiline ou NTSR-3 est une protéine de 95 kDa appartenant à la famille des protéines de transport Vps10p-D (Vacuolar Protein Sorting Domain). Elle exerce une fonction de transport des NTs mais également une fonction de récepteur de type I [85]. Identifiée dans un premier temps comme co-récepteur de la RAP (Receptor-Associated Protein) [85], la sortiline a été plus récemment identifiée comme protéine de la famille des protéines Vps10p-D qui comporte également la protéine SorLA et des protéines SorCS 1-3 [86] (**Figure 5**).

Cette protéine comme les protéines de transport Vps10p-D, possède un domaine extracellulaire riche en motifs cystéine, une séquence peptide signal, un pro-peptide au niveau N terminal, une partie transmembranaire et un court domaine intracellulaire comportant une séquence consensus hexapeptidique d'internalisation [86]. Le domaine intracellulaire est dépourvu d'activité catalytique, ce qui nécessite la présence d'un corécepteur afin de permettre la transmission des signaux [86].

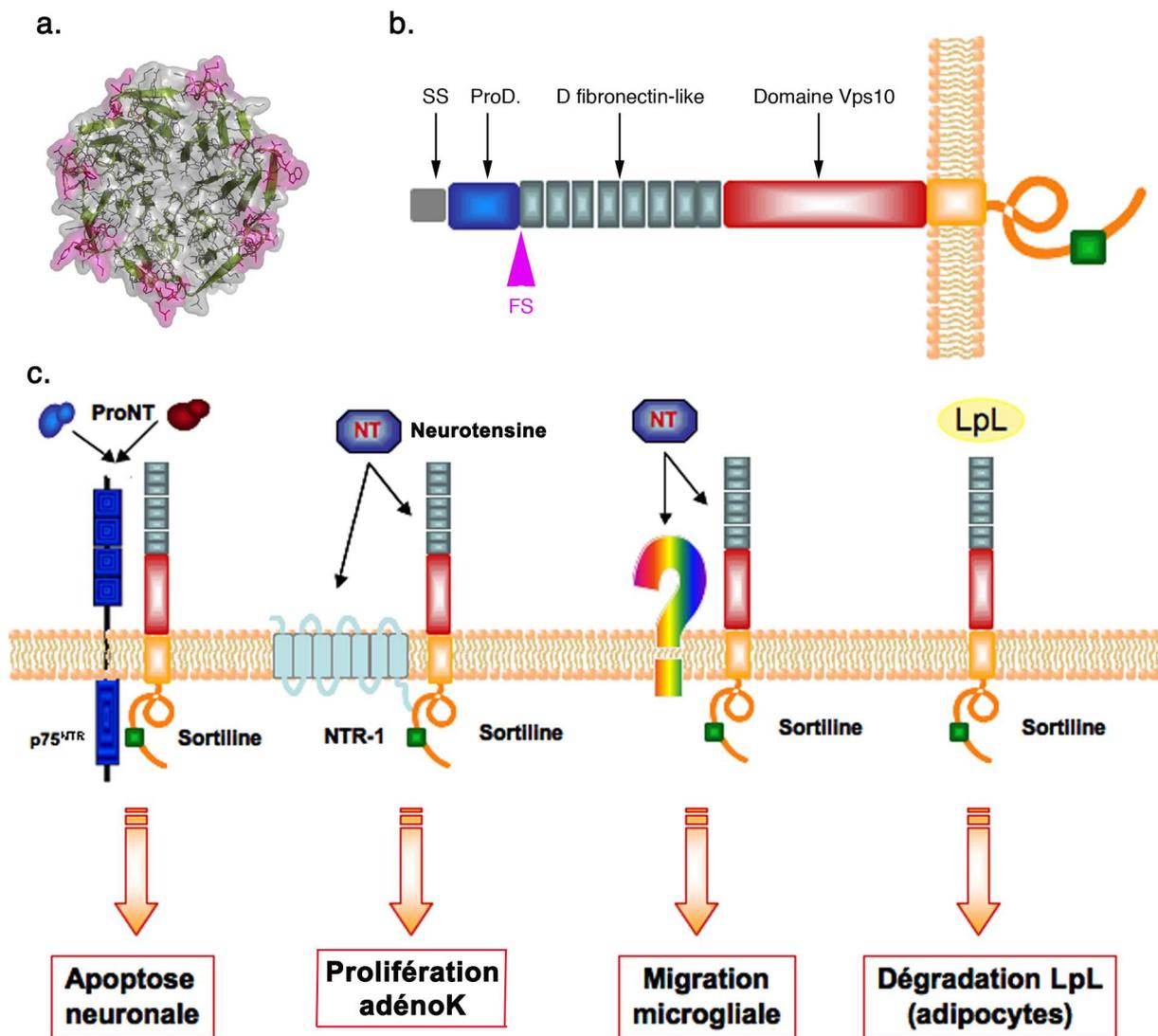


Figure 5: Structure et corécepteurs de la sortiline.

a. Représentation tridimensionnelle du site de liaison aux pro-NTs de la sortiline. b. Structure protéique de la sortiline comportant un domaine extra-cellulaire formé d'un pro-domaine (proD.) et d'une séquence signal (SS) clivée sous l'action de furines protéases (FS), d'un domaine fibronectin-like, d'une séquence homologue propre aux protéines Vps10. Après une courte hélice trans-membranaire, le domaine intra-cellulaire comporte une séquence consensus hexapeptidique d'internalisation (■). c. La sortiline, protéine dépourvue de domaine de transduction du signal, s'associe avec $p75^{NTR}$ pour engendrer un signal pro-apoptotique au niveau des cellules neuronales. Elle permet également la transduction d'un signal prolifératif au niveau des cellules adénocarcinomeuses par son association avec NTR-1 et favorise la migration microgiale, le partenaire membranaire restant actuellement inconnu. La fixation de la lipoprotéine lipase (LpL) à la sortiline permet également son internalisation et sa dégradation cellulaire. D'après J Mazella, *Cellular Signalling* 2001 et Piardini, *Neuropeptides* 2008 [86].

Elle est essentiellement localisée au niveau du néocortex, de l'hippocampe, du gyrus dentelé [85, 87]. Toutefois, de nombreuses données indiquent que cette protéine est également distribuée dans des tissus non neuronaux tels que la prostate, les testicules, le pancréas, le cœur, l'intestin et les muscles [85]. L'expression de ses transcrits est cependant faible dans les tissus spléniques, thymiques et médullaires [85]. Ce n'est que récemment que la présence des transcrits et de la protéine sortiline a été caractérisée au niveau lymphocytaire B par notre équipe [88] puis des lymphocytes NK [89].

La sortiline, protéine majoritairement intra-cellulaire (85 à 90%), possède une fonction de protéine de transport des NTs, fonction dépendante du clivage préalable du pro-peptide N terminal par des furines protéases [90, 91]. Ce clivage protéolytique du pro-peptide est également indispensable à la fixation des autres ligands de la sortiline, notamment de la RAP et de la neurotensine [92] et est indispensable à l'adressage membranaire de la protéine [90].

Le pro-NGF et le pro-BDNF, interagissent, par leurs pro-domaines, avec la sortiline et sont ainsi transportées de l'appareil de Golgi vers la membrane par cette protéine (**Figure 1**) [14, 93, 94]. Néanmoins, l'existence d'autres protéines de transport des NTs est évoquée d'une part en raison de l'absence d'interaction entre la NT-4 et la sortiline [93] et d'autre part avec les modèles de souris SORT^{-/-}, ayant un développement embryonnaire cérébral sub-normal [95].

•Fonction de co-récepteur

La sortiline, exprimée à la membrane est dépourvue de fonction catalytique en raison d'un segment intra cellulaire très court. Elle doit donc s'associer à d'autres protéines pour transmettre un signal [14]. C'est ainsi, qu'en s'associant avec le récepteur p75^{NTR} elle favorise la transmission des signaux pro-apoptotiques [14]. En effet, il a été démontré que la sortiline présentait une affinité plus importante pour les pro-NTs que pour les NTs [14]. L'affinité de la sortiline pour le NGF est faible (Kd de 90 nM) par rapport à celle du pro-NGF (Kd 5nM) [14]. Les voies de signalisation faisant intervenir l'hétérodimère p75^{NTR}/sortiline ne sont pas bien connues. Toutefois, elles pourraient impliquer la voie JNK [14].

B. La neurotensine

La neurotensine est un polypeptide identifié pour la première fois en 1973 par l'équipe de Carraway [96]. Ce neuropeptide, isolé à partir d'extraits d'hypothalamus bovins, présente des caractéristiques capables d'induire des phénomènes d'hypotension. Comme tout neuropeptide, la neurotensine est issu d'un précurseur commun, qui après clivage protéolytique conduira à la formation du peptide mature [96]. La neurotensine est principalement localisée au niveau du SN et au niveau du système digestif. Compte tenu de sa double localisation, ce neuropeptide possède des caractéristiques à la fois de neurotransmetteur et d'hormone neuroendocrine.

1. Structure et fonction de la neurotensine

La neurotensine est un tridécapéptide composé de 13AA (pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu) et de masse moléculaire de 1,5 kDa [96]. La structure du gène codant pour ce neuropeptide a été établie au départ à partir de cellules de muqueuses entériques canines. Ainsi, a été mis en évidence un précurseur de 170 AA, la pro-neurotensine, qui après clivage protéolytique génère 2 types de neuropeptides : la neurotensine et la neuromédine N (NN) (**Figure 6**) [96]. D'une espèce à l'autre, la séquence polypeptidique est hautement conservée au niveau de la séquence hexapéptidique au niveau carboxyl terminal [97, 98]. Chez le rat, le gène codant pour la neurotensine est constitué de 4 exons, l'exon 4 étant l'exon codant pour les formes mature NN et neurotensine. Chez l'Homme, il est situé au niveau du chromosome 12 [97, 98].

Le site fonctionnel de la neurotensine est situé entre les AA 8 et les AA 13 au niveau carboxyl terminal [97, 98].

Au niveau cérébral, la neurotensine est essentiellement impliquée dans la nociception [99]. Au niveau digestif, la neurotensine induit différents effets biologiques notamment la stimulation de la sécrétion pancréatique, la motilité du colon, et la translocation des acides gras [99].

Ce neuropeptide est donc caractérisé par des propriétés trophiques au niveau gastrointestinal en condition normale et en condition tumorale. Les effets de ce neuropeptide en situation pathologique seront abordés dans la section « - La neurotensine et ses récepteurs » page 61.

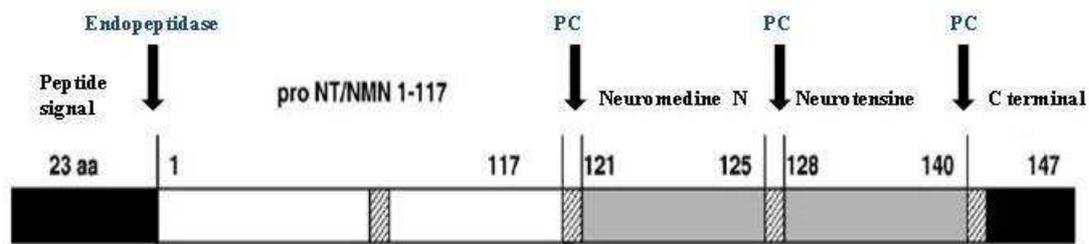


Figure 6: Structure peptidique de la pro-neurotensine humaine

La formation du précurseur pro-neurotensine (pro-NT/NMN) résulte du clivage (flèches noires) par des enzymes spécifiques (endopeptidases) de la séquence du peptide signal de 23 AA. Ce peptide permet également l'adressage des peptides vers la voie de sécrétion. La neuromédine N (NN) et la neurotensine sont bordées en N-terminal et en C-terminal de doublets dibasiques Lysine-Arginine qui vont être reconnus par des convertases (proconvertase, PC). Après clivage, les peptides matures (neuromedine N et neurotensine) seront générés et stockés dans des granules de sécrétion spécifiques de leur zone d'action. (D'après Ernst et *al.* 2006)[100]

2. Localisation de la neurotensine

a. Au niveau central

Au niveau du SNC et du SNP, la neurotensine présente une distribution hétérogène en fonction de ses différentes actions de neurotransmetteur et de neuromodulateur. La neurotensine est exclusivement localisée dans les cellules nerveuses [101]. Elle est colocalisée avec de nombreux neurotransmetteurs notamment au niveau des voies dopaminergiques et sérotoninergiques [102], exprimée au niveau des zones impliquées dans le traitement de la douleur (raphé, aire périaqueducule grise), des voies cardiovasculaires ou encore des voies impliquées dans les processus de thermorégulation (hypothalamus ventromédian et dorsomédian) [102]. La neurotensine est fortement exprimée au niveau hypothalamique. La distribution de la neurotensine dans le SNC ne représente que 10 % de l'ensemble de son expression [102].

b. Au niveau périphérique

La quasi-totalité de la neurotensine présente dans l'organisme est située au niveau périphérique. En effet, ce neuropeptide est localisé essentiellement au niveau du tractus gastro-intestinal où il exerce une action neuroendocrinienne [102]. La neurotensine est également présente au niveau cardio-vasculaire, musculaire, et de l'épiderme [102]. Ce neuropeptide, peut également être colocalisé, comme observé au niveau du SNC, avec d'autres neurotransmetteurs et hormones [102].

La neurotensine est sécrétée dans la circulation par les cellules endocrines de l'intestin (cellules N) [103] et intervient dans les processus de digestion. En effet, après un repas, les concentrations de neurotensine dans le sang augmente de 10-20 pM à 230 pM [104].

La neurotensine a essentiellement pour effets biologiques la modulation de la transmission dopaminergique, de la nociception, du relargage des hormones pituitaires et la régulation de la prise alimentaire [102].

3. Récepteurs de la neurotensine

La neurotensine exerce son action par l'interaction avec 2 types de récepteurs. Les récepteurs NTSR-1 et NTSR-2 qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et le récepteur NTSR-3, membre de la famille des Vps10p-D.

a. NTSR-1

Le premier récepteur isolé à partir de cellules de rat puis de cellules humaines fut le récepteur NTSR-1 [105, 106]. Ce récepteur, de la famille des RCPG de type Gq, a été identifié comme le récepteur de haute affinité pour la neurotensine (concentration de l'ordre subnanomolaire) [106-108]. La majorité des effets de la neurotensine au niveau des SNC et SNP est transmise par ce récepteur [109].

Le gène codant pour ce récepteur est constitué de trois introns et d'une séquence tétranucléotidique répétée en aval du site de polyadénylation [110]. Au niveau 5', on trouve plusieurs sites de liaison aux facteurs de transcription et une séquence de régulation négative. Chez l'homme, ce gène est situé sur le bras long du chromosome 20 [111].

Comme tout récepteur de la famille des RCPG, NTSR-1 présente une structure en hélice avec 7 domaines transmembranaires. Le récepteur humain est constitué de 418 AA comportant 4 sites de N-glycosylation situés dans l'extrémité aminoterminal et dans la 2^{ème} boucle extra-cellulaire (E2) ; deux cystéines dans les boucles extracellulaires E1 et E2 suggérant l'existence d'un pont disulfure. Des études de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier les boucles impliquant dans la fixation du ligand sur son récepteur. Ainsi, les boucles E2 et E4 seraient impliquées dans la liaison neurotensine / récepteur, la 3^{ème} boucle intracellulaire (I3) serait le site de couplage aux protéines Gq [112]. L'extrémité C-terminale contient les résidus nécessaires au découplage et à l'internalisation du récepteur. La phosphorylation du groupement sérine 415, thréonine 416 et sérine 417 est essentiel au processus de découplage. Les acides aminés, thréonine 422 et tyrosine 424 seraient indispensables aux processus d'internalisation du récepteur [113].

Le découplage et la phosphorylation de NTSR-1 favorisent la fixation de la β arrestine au niveau cytoplasmique, entraînant les phénomènes d'endocytose [110]. De nombreux RCPG sont internalisés au niveau intracellulaire après la fixation de leur ligand. Ces récepteurs vont pouvoir soit, retourner au niveau membranaire, soit être dégradés au niveau du lysosome. Ces mécanismes font intervenir les phénomènes de resensibilisation, désensibilisation et permettent un contrôle de l'expression des gènes. Ainsi, la fixation de la

neurotensine sur son récepteur, va favoriser la diminution de l'expression des sites de liaisons et favoriser son internalisation (**Figure 7**) [114].

Le récepteur est localisé au niveau du système nerveux chez l'adulte, essentiellement au niveau des neurones de la substance noire, l'aire tegmentaire ventrale, les noyaux de l'amygdale, le striatum, le cortex cingulaire, entorhinal et olfactif [110].

Au niveau périphérique chez le rat, les ARNm codant pour le NTSR1 semblent principalement localisés au niveau du côlon, du foie, du duodénum et dans une moindre mesure dans le pancréas [115].

Chez l'homme, NTSR1 est également localisé au niveau du pancréas ormal, protégeant les cellules β de l'apoptose induite par IL1-beta [116]. On le retrouve également au niveau utérin, principalement au niveau des cellules musculaires striées ; les glucocorticoïdes ainsi que les estrogènes permettent l'augmentation de l'expression de ce récepteur [117]. A noter que si l'expression de la forme mature à 54 kDa est retrouvée au sein des tissus utérins normaux ou leiomyomateux, en revanche, l'expression de variant d'épissage est restreinte aux cellules tumorales [117].

L'expression de NTSR1 est ubiquitaire au niveau du tube digestif, les cellules neuroendocrines, les mastocytes et adipocytes coliques exprimant ce récepteur [118].

b. NTSR-2

Le NTSR-2 a été décrit pour la première fois par l'équipe de Jean Mazella, est identifié comme le récepteur de basse affinité pour la neurotensine, avec une constante de dissociation de l'ordre du nanomolaire [114]. Ce récepteur présente également une sensibilité aux ions sodium. A la différence du récepteur de haute affinité, la distribution de ce récepteur dans le SNC se fait au niveau des neurones et des cellules gliales [119, 120].

Les premières données concernant la localisation cérébrale de NTSR-2 ont été obtenues par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique du récepteur à basse affinité, la lévocabastine [119]. La localisation cérébrale du NTSR-2, plus diffuse que celle du NTSR1, concerne les cortex cingulaire, préfrontal, pariétal occipital, temporal, insulaire et entorhinal), la formation hippocampale (CA1 et subiculum dorsal) et les tubercules quadrijumeaux antérieurs. Il semble donc que le NTSR2 soit préférentiellement exprimé dans le cortex cérébral et dans les aires cérébrales impliquées dans la perception de la douleur [121].

Les ARNm codant pour le NTSR2, quant à eux, sont plutôt localisés chez le rat dans le tractus gastro-intestinal au niveau du fundus Kitabgi, 1984 #2186} mais également dans

l'utérus [122]. Chez l'homme, la présence de NTSR-2 est également ubiquitaire dans le tractus digestif, les études immunohistochimiques ayant révélées sa localisation membranaire au niveau des cellules pariétales gastriques, des cellules neuroendocrines, ainsi que des muqueuses gréliqués et coliques [123].

Des différences dans le devenir de ce récepteur après activation sont observées par rapport au récepteur de haute affinité. Ainsi, contrairement au récepteur NTSR-1, NTSR-2 est recyclé à la membrane après son internalisation (Figure 7). Ce phénomène est dû à la présence d'un résidu tyrosine au niveau de la 3^{ème} boucle extracellulaire (E3). Ce recyclage est observé chez la souris mais pas chez l'homme. En effet, le récepteur humain diffère du récepteur murin par la présence d'un résidu cystéine à la place du résidu tyrosine, rendant impossible le recyclage de ce dernier [124].

L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques et de modèles animaux KO pour le récepteur NTSR-1 a permis de mettre en évidence que le récepteur NTSR-2 serait impliqué dans la transmission des effets analgésiques et hypothermiques de la neurotensine [125, 126]. Son rôle dans ces mécanismes est confirmé par sa localisation au niveau des structures cérébrales impliquées dans la douleur [127].

c. NTSR-3

La neurotensine peut également se lier à une autre catégorie de récepteur : le récepteur NTSR-3 ou sortiline. Les caractéristiques de NTSR-3 ont déjà été abordées précédemment pour ses fonctions de transporteur des NTs ou de co-récepteur de p75^{NTR} (chapitre I.1.1.b). NTSR-3 est un récepteur de type 1 appartenant à la famille des Vps10p récepteurs (Figure 2 page 42) [128]. Ses fonctions pro-apoptotiques liées à la fixation des pro-NTs sont contrebalancées par des phénomènes d'internalisation mais également de clivage de ces domaines extra- et intracellulaires.

L'apoptose induite par l'interaction des pro-NTs sur l'hétérodimère p75^{NTR} / sortiline est par ailleurs limitée par l'internalisation du récepteur hétérodimérique, la cinétique et les facteurs déclenchant cette endocytose étant actuellement inconnus [129, 130].

Le domaine extra-cellulaire de la sortiline peut être clivé par TACE, ce clivage semblant être faible dans les modèles de cellules transfectées (0,01%.min⁻¹), et ce comparativement à d'autres membres de la famille Vps10 ou de p75^{NTR} [131]. L'adjonction de pro-NGF ou de neurotensine dans le milieu de culture n'influence pas le niveau de clivage de la sortiline, suggérant l'existence d'un mécanisme de clivage ligand-indépendant [131, 132].

Le clivage du domaine extra-cellulaire de la sortiline rend accessible la partie intracellulaire juxta membranaire à l'action des γ -sécrétases, la fonction biologique du clivage du domaine intra-cellulaire de cette protéine restant pour l'instant inconnue [86].

La neurotensine par l'intermédiaire de ce récepteur exerce ses effets sur les mécanismes d'activation et de migration des cellules microgliales qui expriment constitutivement ce récepteur [133, 134]. Sa localisation au niveau du SNC concerne l'hippocampe et des cortex cingulaire, piriforme et le thalamus ventral ainsi que les tubercules quadrijumeaux antérieurs [87].

La sortiline est également retrouvée au niveau cérébral au cours de l'embryogenèse avec une distribution superposable à celle du NGF [87].

Des études en Northern Blot ont confirmé qu'elle est fortement exprimée au sein de tissus non-neuronaux variés comme la prostate, les testicules, le pancréas, le cœur, l'intestin et les muscles [85].

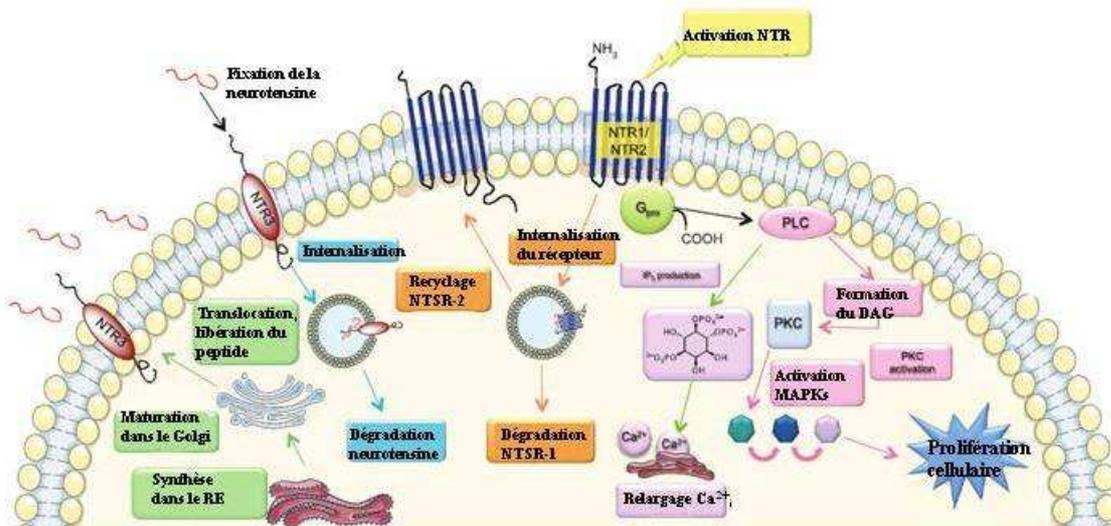


Figure 7: Les différents mécanismes cellulaires impliquant la neurotensine et ses récepteurs

La liaison de la NT au récepteur NTSR-1 ou NTSR-2 induit la stimulation de la phospholipase C. Cette activation a pour conséquence la production d'inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG) à partir de phospholipides membranaires (PiP2). IP3 provoque alors la mobilisation du calcium intracellulaire au niveau du RE. L'activation de la PLC conduit également à la formation de DAG. Ces phospholipides vont être capables d'activer la PKC et de médier des signaux de prolifération. L'activation du récepteur RCPG par son ligand se traduit dans un 2^{ème} temps par l'internalisation du complexe ligand-récepteur. NTSR-1 sera dégradé tandis que NTSR-2 sera recyclé et transloqué à la membrane. D'après Myers et al. 2009

Lors de lésions corticales cérébrales d'origine traumatique ou ischémique, les neurones des zones lésées se caractérisent par la surexpression membranaire de p75^{NTR} et une apoptose induite par le pro-NGF [135]. En effet, la neutralisation du pro-NGF produit au niveau de ces zones lésées protège les cellules neuronales de l'apoptose et permet la restauration cellulaire [135]. Il est vraisemblable que cette action pro-apoptotique du pro-NGF conduisant à la dégénérescence soit directement liée à l'interaction de cette pro-NT sur l'hétérodimère p75^{NTR} / sortiline.

L'implication *in vivo* de l'hétérodimère p75^{NTR} / sortiline dans l'apoptose secondaire à une lésion nerveuse périphérique a été récemment mise en évidence dans des modèles murins. Le pro-NGF par son interaction avec p75^{NTR} est ainsi responsable de la mort des cellules oligodendrocytaires après traumatisme médullaire [61]. L'hyperexpression de l'hétérodimère p75^{NTR} / sortiline est étroitement corrélée à l'apoptose des cellules de Schwann après axotomie du nerf facial [136], à l'apoptose neuronale du ganglion rachidien postérieur L4/5 suivant la section du nerf sciatique [137], ainsi qu'à la dégénérescence rétinienne post-ischémique dans des modèles murins [138]. L'interaction du pro-BDNF avec l'hétérodimère p75^{NTR} / sortiline est ainsi directement responsable de l'apoptose des neurones sensitifs après axotomie, la neutralisation de la sortiline ou du pro-BDNF par des anticorps bloquants permettant d'arrêter la mort neuronale [139]. L'apoptose des neurones sénescents est également sous la dépendance du pro-NGF et de son interaction avec la sortiline, l'expression membranaire de la sortiline augmentant au cours du vieillissement [140].

Les fonctions biologiques de la sortiline ne sont pas confinées au transport et à l'interaction avec les pro-NTs ; cette protéine possède en effet un rôle de *transporteur du glucose* au niveau des tissus adipeux et osseux par son interaction avec l'isoforme 4 de la protéine transporteuse du glucose (Glu4) [91], et permet ainsi la régulation de la réponse insulinique des cellules musculaires murines [141] ; aucune donnée n'est actuellement disponible quant à l'équilibre glycémique des souris SORT^{-/-}.

La sortiline est également un des *récepteurs de la lipoprotéine lipase* [142], de la *RAP* ainsi que de la *SAP* (« Sphingolipid Activator Protein ») et est impliquée dans le transport intra-cellulaire post-golgien de ces différentes protéines [85, 128, 142, 143].

La neurotensine, par sa liaison avec la sortiline permet également *l'induction de la migration des cellules microgliales*, la protéine membranaire assurant la transduction du signal restant inconnue [144].

La *SAP* ainsi que la *lipoprotéine lipase* sont transportées par la sortiline au niveau du même site de fixation que les pro-NTs, des compétitions d'affinités entre ces différentes protéines et la sortiline pouvant là encore moduler le niveau d'excrétion des pro-NTs [128, 143].

C. Neuropeptides et pathologies du SN

1. Les neurotrophines

Les NTs sont des acteurs indispensables de la plasticité et du bon fonctionnement neuronal. Compte tenu de leurs fonctions essentielles, les recherches se sont intéressées aux changements éventuels de ces neurotrophines lors des processus neurodégénératifs. On a pu ainsi observer que des mutants TrkA étaient impliqués dans le développement du syndrome humain CIPA (« Congenital Insensitivity to Pain and Anhidrosis ») [145, 146]. Ce syndrome héréditaire rare est dû à un défaut de la signalisation des NTs et entraîne des neuropathies [147].

Dans la maladie d'Alzheimer, l'apparition d'un déficit cholinergique est l'une des caractéristiques de cette pathologie. Dans des modèles transgéniques de maladie d'Alzheimer et chez des rats âgés détériorés, il a été observé une altération du transport rétrograde du NGF [148, 149]. Etant donné le rôle majeur du NGF en tant que facteur de survie des neurones cholinergiques, ces observations suggèrent que les changements survenant dans le transport rétrograde du NGF pourraient être un des événements précoces conduisant au déficit cholinergique et au développement de la pathologie [148, 149].

Le rôle du BDNF dans les pathologies neuro- psychiatriques et en particuliers dans les troubles de l'humeur est confirmé depuis une dizaine d'années. Ainsi, l'hypothèse monoaminergique reposant sur un déficit cholinergique initialement proposé dans la dépression n'est plus l'unique hypothèse afin d'expliquer l'étiologie de cette pathologie. L'hypothèse de l'expression génique semble à présent prédominer. Cette dernière suggère que la diminution de l'expression du gène codant pour le BDNF pourrait expliquer le développement de la dépression [150]. Ces observations sont corrélées avec les faibles taux sériques de BDNF constatés chez des patients présentant une dépression majeure caractérisé

et suggère ainsi l'implication de ce facteur neurotrophique dans les troubles de l'humeur [150]. Le rôle des NTs n'est pas restreint à ce type de pathologies puisque leur implication dans les troubles bipolaires a récemment été souligné [151, 152]. En effet, des études sur des souris KO pour ce gène ont mis en évidence le rôle de cette NT dans les troubles de l'humeur [153]. L'action des anti-dépresseurs reposerait sur la régulation de l'expression du BDNF susceptible d'activer la neurogenèse hippocampique et ainsi d'améliorer les mécanismes de plasticité cérébrale et d'adaptation chez le sujet dépressif.

Les pro-NTs et p75^{NTR} interviennent également dans les processus neurodégénératifs de la maladie d'Alzheimer. En effet, la voie d'activation de l'apoptose et par conséquent de pro-NT/p75^{NTR} est activée après un dommage ou un stress cellulaire au niveau du cerveau [135, 154]. La balance entre les voies p75^{NTR} et TrkA est également impliquée dans l'évolution de la pathologie, notamment dans la formation des plaques β amyloïdes [155-157]. L'utilisation de la neurotensine comme ligand compétiteur a permis de mettre en évidence que la neurotoxicité induite par le pro-NGF était due à l'association p75^{NTR}/NTSR-3 [140, 158]

2. La neurotensine

Compte tenu de son rôle dans les voies dopaminergiques et glutaminergiques, l'implication des récepteurs à la neurotensine, notamment du récepteur de haute affinité NTSR-1 a été établie dans des pathologies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, ou encore la maladie de Huntington [159]. Ce neuropeptide et ses récepteurs sont également impliqués dans la physiopathologie de pathologies psychiatriques comme la schizophrénie [159].

Les NTs et la neurotensine sont donc des neuropeptides primordiaux dans le maintien de l'homéostasie neuronale par l'équilibre entre la balance mort / survie des populations neuronales et astrocytaires. Ils peuvent agir séparément ou en synergie *via* la protéine de transport et co-récepteur la sortiline.

Compte tenu de leurs rôles prolifératifs et anti-apoptotique, ces neuropeptides et leurs récepteurs pourraient favoriser le développement de pathologies autres que neurodégénératives, notamment dans les processus oncogéniques.

II Neuropeptides et processus oncogéniques

A.- La neurotensine et ses récepteurs

La présence ubiquitaire des NTs dans l'organisme a largement été démontrée depuis leur découverte dans les années 50. Leur implication dans des processus majeurs de survie cellulaire a conduit à rechercher leur fonction dans l'oncogénèse. Plusieurs équipes ont décrit l'expression anormale de NTSR-1 dans différents types de cancers solides [107, 160] ce qui permet actuellement d'envisager des essais thérapeutiques en oncologie à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique de NTSR-1 (le Meclinertant[®] ou SR 48692, Sanofi-Aventis).

En condition physiologique chez le rat, la neurotensine stimule la prolifération des cellules du système digestif [161, 162]. Les premières données sur l'implication de la neurotensine et son rôle dans les processus tumoraux datent des années 1980. Lors de l'étude de la sécrétion de la calcitonine par les cellules néoplasiques de carcinome de la thyroïde chez le rat, l'équipe de Zeytinoglu observe également un phénomène inattendu, ces cellules carcinomateuses synthétisent et sécrètent également de la neurotensine [163]. Chez l'homme, l'association entre l'expression de la neurotensine et la tumorigénèse est découverte pour la première fois au niveau du cancer du pancréas dans les années 80 [164]. Cette association neurotensine / oncogénèse solide est confirmée quelques années plus tard, au niveau de différents cancers (cancer du pancréas, carcinome de la thyroïde, adénocarcinome colique, cancer du poumon) où l'expression de la neurotensine et/ou de ses récepteurs est observée au niveau des cellules tumorales [165].

Lors de l'interaction de la neurotensine avec son récepteur de haute affinité NTSR-1, l'effet principalement observé est l'activation de la PLC [166]. Il s'ensuit la formation de DAG et d'IP3 modulant ainsi la concentration intracellulaire de calcium. Le calcium en se liant à la calmoduline va permettre l'activation de la NO synthase et de protéine kinase [166]. De nombreuses études mécanistiques ont été effectuées afin d'établir le rôle *in vitro* de la neurotensine et de ses agonistes sur la prolifération des cellules tumorales [166]. Ishizuka et son équipe rapportent l'effet trophique de la neurotensine exogène *in vitro* sur la lignée pancréatique humaine MIAPaCa-2, effet qui jusqu'alors n'avait été observé que chez le rat [166]. Les taux de calcium, d'AMP cyclique et d'IP3 intracellulaires sont augmentés de façon dose-dépendante en présence de neurotensine exogène. Ceci a confirmé l'activation des mécanismes intracellulaires de transduction du signal liés à la fixation de la neurotensine sur ses récepteurs de haute et de basse affinité [166]. Outre l'activation des voies de signalisation de la PLC et de la PKC, la neurotensine active également la voie des MAPK [167]. Une autre

étude, réalisée avec les cellules MIA PaCa-2 a mis en évidence le rôle de la neurotensine dans l'activation de la voie des MAPK, entraînant l'activation des kinases ERK et JNK puis l'activation des facteurs de transcription c-Fos et c-jun via l'AP1[167]. Les signaux de survie ainsi activés contribuent à la prolifération de ces cellules tumorales. Ce neuropeptide, par son action sur les voies de transduction, active de façon dose dépendante le facteur de transcription de la famille des IEG (Immediately Early Gene) Krox-24 ou EGR-1 (Early Growth Response-1) dans la lignée d'adénocarcinome colique humaine HT-29 qui expriment naturellement les récepteurs de la neurotensine NTSR [167].

Les effets trophiques de ce facteur sont mis en exergue dans de nombreux types de cancers solides autres que les adénocarcinomes pancréatiques et coliques où l'effet prolifératif de la neurotensine a été initialement décrit [166]. La neurotensine contribue ainsi à la prolifération des cellules malignes de la prostate, de la vessie, du sein, du pancréas, du poumon, de la plèvre (carcinome bronchique non à petites cellules et mésothéliomes) [107, 114, 160, 168, 169] ainsi que des adénomes hypophysaires [170] habituellement bénins et n'exprimant pas les récepteurs NTSR-1 et NTSR-2.

Une dérégulation de l'expression du récepteur de haute affinité NTSR-1 a été observée dans de nombreux cancers humains, faisant état d'une relation entre la surexpression de NTSR-1 et l'augmentation de la prolifération des cellules tumorales liées à la neurotensine [171-174]. Des études récentes ont établi que la surexpression de NTSR-1 était associée à l'agressivité tumorale et au mauvais pronostic de différents cancers solides tels que les carcinomes bronchiques non à petites cellules [114], les adénocarcinomes mammaires [169], coliques [175], prostatique [176] et ORL [177].

Par RT-PCR, réalisées avec des lignées humaines de cancer de la prostate à différents stades, des différences d'expression de récepteurs ont été mises en évidence entre les tissus tumoraux et non-tumoraux. Ainsi, NTSR-1 et NTSR-2 sont surexprimés dans les cellules malignes tandis que l'expression NTSR-3 reste constante quel que soit le type de tissus [176]. Une différence d'expression des NTSR selon les différents grades de malignité a parallèlement été démontrée [166]. Ainsi, NTSR-1 est surexprimé dans les cellules les moins différenciées associées à un haut grade de malignité, à l'inverse de NTSR-2 dont l'expression est détectée dans les cellules les plus différenciées [176].

La neurotensine, lors des processus cancérigènes, agit sur l'homéostasie en favorisant les processus de prolifération et de différenciation [166]. Toutefois, l'équilibre peut également être rompu lors de mécanismes d'échappement aux voies apoptiques, souvent observés lors des résistances aux thérapies anticancéreuses [166]. Les données concernant le

rôle de la neurotensine dans ces phénomènes sont peu nombreuses. Une étude, réalisée sur une lignée cancéreuse humaine d'adénocarcinome mammaire (MCF-7), a démontré pour la première fois l'effet anti-apoptotique d'un agoniste pharmacologique de la neurotensine (JMV 449) [178]. Les effets de cet agoniste ont été observés lors d'un stress cellulaire (privation sérique) et une diminution de l'apoptose pour deux tiers des cellules a été observée [178]. L'effet anti-apoptotique de JMV 449 est établi par son action sur l'activation du gène Bcl-2 *via* la voie des MAPK [178]. De plus, les analyses de RT-PCR ont permis de détecter uniquement les récepteurs NTSR-1 et NTSR-3 dans ces cellules, avec une surexpression de NTSR-1 [178].

Le rôle de la neurotensine a essentiellement été démontré au niveau des tumeurs solides [166]. Toutefois, il existe des données concernant son rôle dans l'évolution de tumeurs hématologiques. Une étude de pharmacocinétique démontre la présence des récepteurs NTSR au sein de lignées leucémiques lymphocytaires T Jurkat et Molt-4 [179]. De plus, l'équipe de Bensussan à l'Hôpital Henri Mondor de Créteil a étudié l'effet de ce neuropeptide sur les processus de prolifération et de migration des cellules T de lymphomes cutanés (Cutaneous T cell Lymphoma, CTCL) issues de 6 patients (dont 3 présentaient un syndrome de Sézary) [180]. Cette étude a rapporté que la neurotensine se fixait d'avantage sur les CTCL malins que sur les lymphocytes sains. De plus, l'analyse par RT-PCR des NTSR sur une lignée Il-2 dépendante établie à partir des CTL malins d'un patient, confirme l'implication du récepteur NTSR-1 dans la prolifération tumorale [180]. Cette même équipe, quelques années plus tard, a étudié l'effet chemotaxique de la neurotensine lors du syndrome de Sézary, syndrome associant des lésions cutanées (de type psoriasis) à une prolifération excessive des LT CD4⁺ [181]. La migration des cellules de Sezari induite par la neurotensine est inférieure à celles des lymphocytes T normaux, les effets chemotaxiques exercés par la neurotensine sur ces cellules étant liés à la fixation de ce neuropeptide sur NTSR-1 et à l'activation de la voie de la PI3K [181].

Ces études viennent souligner l'importance de la neurotensine et de l'expression de NTSR-1 dans la carcinogénèse et démontrent l'importance de la mise en évidence de ce neuropeptide et de ces récepteurs comme facteurs de pronostic et cibles thérapeutiques dans de nombreuses tumeurs solides.

La neurotensine n'est cependant pas le seul neuropeptide dont la fonction de facteur trophique pour les cellules tumorales a été identifiée. Compte tenu de leurs fonctions pro- et

anti-apoptotiques, les NTs ont également été impliquées dans le développement de processus oncogéniques.

B. - NTs et oncogénèse

L'identification des NTs dans les processus tumorigènes ne débute que dans les années 90. Compte tenu de leur localisation, le premier type de cancer impliquant les NTs est situé au niveau du SN sympathique. Les variations d'expression des récepteurs Trk dans le neuroblastome ont mis en évidence qu'une déficience de la machinerie NGF/Trk favorisait le processus pathologique [182]. En effet, des études ont montré une corrélation entre les forts taux d'expression des transcrits de TrkA et l'agressivité clinique [183]. De même, des forts taux d'expression de TrkB et l'interaction TrkB/BDNF seraient associés à l'agressivité de la maladie [184]. Cette interaction TrkB/BDNF est également impliquée dans les mécanismes d'échappement thérapeutique [184]. En effet, les tumeurs de stades les plus avancés sécrètent du BDNF suggérant un mécanisme autocrine de survie [185]. A l'inverse, l'expression du récepteur TrkC est associée à des stades moins agressifs de neuroblastome.

En conditions non pathologiques, TrkA par son interaction avec le NGF est un acteur clé de la prolifération et de la différenciation des neurones sympathiques [186]. Un défaut dans l'expression des gènes des récepteurs Trk conduit à leurs effets pathogènes dans des processus tumoraux. Ces déficiences ont ainsi pu être démontrées dans des pathologies telles que les carcinomes, les sarcomes, le cancer du sein, le cancer de la prostate et les leucémies [187, 188].

Les différentes études menées sur l'interaction des récepteurs Trk dans les processus de survie et de mort ont ainsi permis de mettre en évidence la particularité et le rôle spécifique de chacun de ses récepteurs et de leurs ligands en conditions non pathologiques et pathologiques [71].

Depuis leurs découvertes, la neurotensine et les NTs ont été identifiées comme participant à des phénomènes majeurs de maintien de l'homéostasie. Du fait de certaines dérégulations, ces neuropeptides ont également été pointés dans de nombreux phénomènes pathogènes. L'ensemble des recherches a démontré leur présence et leur action au niveau neuronal et non-neuronal. Ces neuropeptides participent non seulement au développement du SN mais également au maintien de l'équilibre dans d'autres systèmes, notamment le système immunitaire.

III Neuropeptides et système immunitaire: application aux MAI

A.NTs et système immunitaire

Les premières données concernant le rôle des NTs dans le système immunitaire ont été reportées au niveau de mastocytes chez le rat [189]. Le NGF exogène entraînait une infiltration mastocytaire progressive des organes de rats nouveau-nés. Les relations étroites existant entre système immunitaire et NTs ont tout d'abord été établies lors des phénomènes d'allergies [190-193] puis le champ d'action des NTs s'est élargi à l'ensemble des effecteurs de la réponse immune, la plupart des études s'étant toutefois focalisée sur le rôle du NGF dans la réponse immune normale et pathologique [89, 194].

1. NGF

En dehors de son rôle au niveau du système nerveux, le NGF a aussi une action reconnue dans l'immunité et l'inflammation.

Tout d'abord, la présence de médiateurs de l'inflammation tels l'IL-1 ou le TNF- α augmente la synthèse de NGF aussi bien par les cellules du système nerveux que par les fibroblastes, les mastocytes ou les cellules musculaires lisses bronchiques [195].

•NGF et pathologies allergiques

Le NGF est la NT majeure retrouvée dans les pathologies allergiques. Il a été tout d'abord observé que les taux plasmatiques de NGF étaient augmentés chez des patients atteints de kératoconjonctivites[196]. L'augmentation des concentrations sériques de NGF a ensuite été rapportée dans diverses pathologies allergiques ; ainsi une étude cas-témoin réalisée sur 49 patients souffrants d'asthme, de rhinoconjonctivite ou d'urticaire-angioedeme a démontré que les taux sériques de NGF étaient plus élevés chez les patients que chez les témoins (49,7 pg/mL contre 3,8 pg/mL) [197]. En revanche, aucune différence dans l'expression du NGF n'était observée en fonction du type d'allergie [197].

Ce rôle du NGF dans l'allergie a été particulièrement bien étudié dans l'asthme. Ainsi, des taux élevés de NGF ont été relevés dans le sang et dans le LBA de patients

asthmatiques alors qu'ils diminuent sous traitement par corticoïdes inhalés [198]. De plus, de très nombreuses cellules ont été identifiées comme source de NGF dans les voies aériennes inflammatoires : mastocytes, monocytes et macrophages, lymphocytes T mais aussi cellules alvéolaires, fibroblastes ou encore cellules musculaires lisses [198]. Une partie de ces cellules impliquées dans la réponse allergique sont également des cibles pour le NGF : celui-ci participe à l'écotaxie, à la différenciation et à la survie des mastocytes et serait capable d'induire leur dégranulation [199]. Chez l'Homme, il a été démontré que ces mastocytes possédaient le récepteur TrkA, à l'état fonctionnel puisque l'ajout de son ligand entraîne sa phosphorylation, permettant ainsi l'activation des signaux intracellulaires de type MAPK et des IRG [200]. Une autre étude réalisée sur les mastocytes du péritoine chez le rat a mis en évidence le pouvoir chimio-attractant dose-dépendant du NGF ; En effet, ces cellules sont attirées de manière dose-dépendante par le NGF, *via* une modification de leur cytosquelette (filaments d'actine, lamellipodes) [201]. Cet effet chimio-attractant fait intervenir les voies de transduction des MAPK et de la PI3K. En présence d'inhibiteurs spécifiques de ces différentes voies (PD98 059 ; LY294 002) et du récepteur TrkA (K-252a), plus aucune migration de ces cellules n'était observée [201]. Parallèlement, *in vivo*, l'expression locale du NGF est par ailleurs corrélée aux processus de dégranulation des mastocytes [197].

Le NGF agirait également sur les éosinophiles activés qui expriment alors TrkA à la membrane : il serait un facteur chimiotactique pour ces cellules, entraînerait la libération d'enzymes comme l'EPO (Eosinophil PerOxydase) et augmenterait leur survie [190]. De même, les plasmocytes pulmonaires chez des souris sensibilisées et exposées à un allergène expriment TrkA [202]. L'ajout de NGF augmente leur durée de vie *via* l'augmentation d'expression de Bcl2 alors que cet effet est antagonisé par l'utilisation d'un inhibiteur de TrkA. Celui-ci entraîne également une diminution des concentrations locales d'IgE [202].

•NGF et cellules lymphocytaires B et T

Hors contexte de l'asthme, différents travaux ont montré une action directe du NGF sur les cellules du système immunitaire. Plusieurs équipes ont montré que les LB et les LT activés étaient des sources de NGF [196, 203], mais ces cellules sont également des cibles de cette NT.

1) NGF et lymphocytes B

Les lymphocytes B murins et humains normaux produisent du NGF biologiquement actif, sécrétion autocrine augmentée après activation mitogénique [203-206]. L'augmentation de la transcription du NGF après stimulation mitogénique est sous la dépendance de l'activation de NfκB, et de la présence de BDNF [207].

Le NGF exogène exerce, par l'intermédiaire de son récepteur à haute affinité TrkA, un effet prolifératif dose-dépendant dans les lymphocytes B normaux humains et murins, [208-211]. Cet effet prolifératif est synergique, *in vitro*, de celui exercé par l'IL-4 et l'IL-2 [210].

Le NGF constitue un facteur exocrine de survie pour les cellules B humaines et murines également par son interaction avec TrkA, l'adjonction d'Ac antagonistes de p75^{NTR} ne modifiant pas la viabilité de ces lymphocytes [204]. Par ailleurs, le NGF est produit par les B mémoires, et sa neutralisation, *in vitro*, par des anticorps antagonistes induit la disparition de l'expression intra-cellulaire de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, conduisant ainsi à l'augmentation de l'apoptose affectant plus particulièrement les cellules B IgG (sγ+) ou IgA (sα+) positives et conférant ainsi au NGF un rôle de facteur autocrine de survie des cellules B mémoires [204, 206, 212].

Le NGF empêche également l'apoptose des LB exposés à un sérum anti-IgM via le récepteur TrkA et l'activation de la phosphokinase Cζ (PKCζ) et de la Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) [213]. Cette action proliférative et anti-apoptotique a été particulièrement bien montrée *in-vitro* pour des cellules de lignées humaines myélomateuses ou lymphomateuse B matures essentiellement: l'ajout de NGF, même à très faibles doses, augmente la production d'Ig, l'incorporation de thymidine tritiée, ces différents effets étant antagonisés par l'ajout d'un sérum anti-NGF [214]. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par l'ajout d'IL-6 mais ne sont pas modifiés par l'utilisation d'un anti-IL-6, indiquant des voies de signalisation différentes [214].

Le NGF est également capable d'induire la prolifération de LB humains sanguins et de LT mais à des concentrations élevées pour ces derniers [209].

De plus, tout comme BAFF, le NGF est capable d'induire la production d'IgG par les LB humains indépendamment de la voie du CD40/CD40L mais ne participe pas à la commutation isotypique [209]. Le NGF stimule également la production clonale d'Ig, en réponse à une stimulation antigénique spécifique, chez la souris.

Il a également été montré que le NGF stimulait, de manière dose dépendante, la production d'IgG4 de lymphocytes humains normaux, en condition de co-culture

lymphocytaire T et de stimulation mitogénique [214]. L'influence des pathologies allergiques et/ou du TGF β sur cette production d'IgG4 n'a cependant pas été étudiée [214].

Les lymphocytes B humains normaux possèdent à leur surface le récepteur à haute affinité TrkA, détecté par Western Blot [204], immunofluorescence indirecte et cytométrie en flux [210, 215], le stress, les stimulations mitogéniques induisant une augmentation de l'expression membranaire de ce récepteur [210, 215]. Les lymphocytes B circulants expriment également p75^{NTR}, la protéine étant détectable en Western blot, immunocytochimie et cytométrie en flux [204, 209, 210, 215, 216]. L'expression membranaire de ce récepteur, comme pour TrkA, augmente après un stress [215] et après stimulation mitogénique, et apparaît majoritaire en présence de faible concentration extra-cellulaire de NGF [204, 210, 217].

2) NGF et lymphocytes T

Les cellules du thymus de rat expriment les 2 récepteurs au NGF (TrkA et p75^{NTR}) et produisent du NGF dans les phases précoces du développement, démontrant une nouvelle fois le rôle de régulateur du SI de cette NT [218].

Le NGF est également capable d'induire *in vitro* la prolifération des LT, d'augmenter l'expression du récepteur à l'IL-2 à leur surface [219].

Les lymphocytes T humains circulants normaux possèdent le récepteur à haute affinité TrkA détectable par RT-PCR, Western Blot, cytométrie en flux et immunofluorescence [204, 209, 220], l'expression de TrkA étant majoritairement retrouvée au niveau des lymphocytes Th2 [196].

p75^{NTR} est détecté dans les lymphocytes T humains par Northern Blot, western blot et cytométrie en flux avec une séquestration majoritaire intra-cellulaire du récepteur [194].

L'ensemble des effets du NGF sur le système immunitaire est récapitulé dans la **Figure 8** ci-dessous.

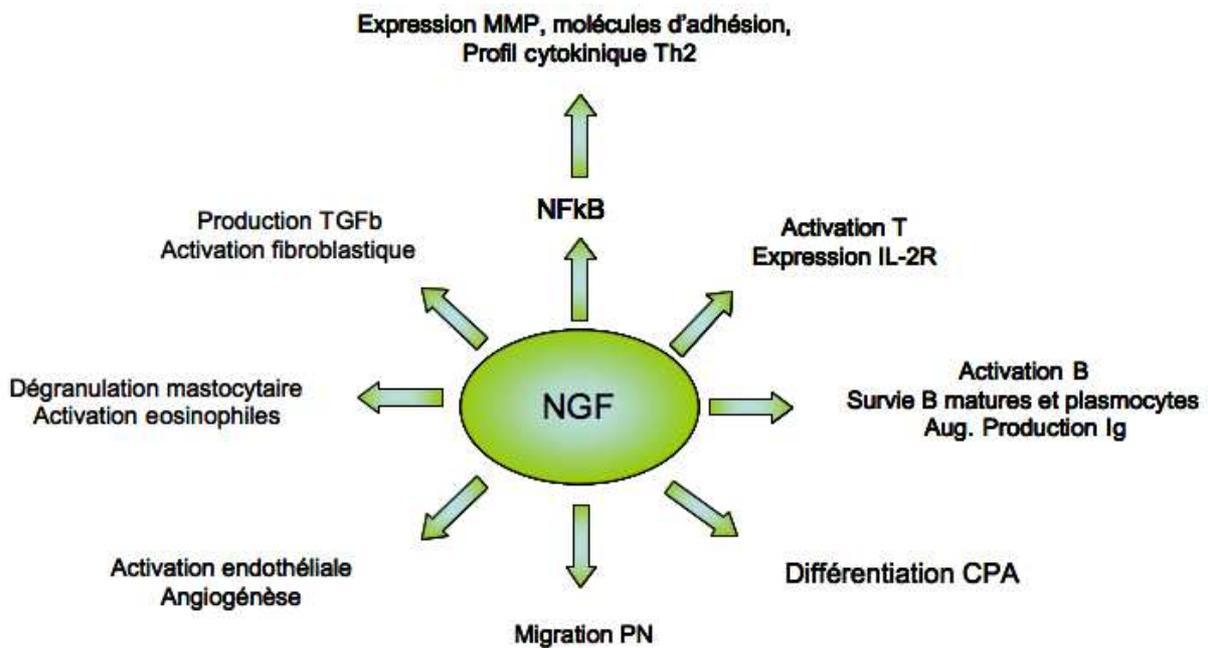


Figure 8: Synthèse des différents rôles du NGF dans le système immunitaire

3) NGF, anti-NGF et thérapeutiques

Le rôle fondamental du NGF dans la douleur a conduit au développement d'un anticorps monoclonal humanisé anti-NGF, le *tanezumab*. Celui-ci fait actuellement l'objet d'essais cliniques dans les douleurs articulaires arthrosiques ou liées à la cystite interstitielle. La phase III aurait du être terminée fin 2011[221] mais a du être interrompue fin juin du fait de la survenue d'une accélération des processus de destruction articulaire chez certains patients, alors que l'objectif principal de l'étude (disparition des douleurs articulaires *versus* placebo) venaient d'être atteint. Cependant, d'autres essais thérapeutiques sont actuellement en cours concernant son action analgésique dans les métastases osseuses des cancers mammaires et prostatiques ou la pancréatite chronique.

Le NGF recombinant est également utilisé en thérapeutique pour sa capacité à favoriser la régénération neuronale. Malgré des résultats peu satisfaisants dans le traitement de polyneuropathies, plusieurs équipes ont rapporté des améliorations spectaculaires de lésions de kératoconjonctivite sèche ou d'ulcères cutanés vascularitiques multi-résistants aux thérapeutiques immunosuppressives après application locale de NGF recombinant avec une excellente tolérance [222]. Les mécanismes de son efficacité ne sont pas encore complètement élucidés, mais passent très vraisemblablement par la restauration du système nerveux sympathique lésé mais également pour ce qui est de la cicatrisation cutanée par ses capacités à stimuler les cellules fibroblastiques et l'angiogénèse.

2. BDNF

1) **BDNF et maturation B**

L'expression constitutive du BDNF a été démontrée au niveau lymphocytaire [223]. Ce facteur intervient très tôt dans le développement B. En effet, l'utilisation de modèles de souris Knock Out pour le BDNF, a entraîné un arrêt au stade pré-B du processus de maturation B. Cette même équipe a également montré qu'à ces stades précoces, les LB étaient dépourvus de transcrits de BDNF, le BDNF nécessaire à la maturation des LB étant sécrété par les cellules du stroma de la moelle osseuse [224]. A noter qu'il n'y avait par contre pas d'anomalies au niveau des LT [224].

2) **BDNF et lymphocytes B normaux**

Les lymphocytes humains B matures produisent également du BDNF en culture, cette production étant augmentée après stimulation mitogénique [223, 225] mais non influencée par l'IL-6 ou le TNF- α [226]. Le BDNF permet d'augmenter la production d'IgE de lymphocytes B isolés du sang périphérique de sujets allergiques sans influencer celle d'IgG4 ou d'IgA [227]. La stimulation de la synthèse d'IgE induite par le BDNF est partiellement bloquée *in vitro* par l'IFN- γ ou l'IL-12 et stoppée par la combinaison de ces deux cytokines Th1 [227].

La production lymphocytaire B de BDNF est diminuée chez des patients atteints de troubles bipolaires par rapport aux volontaires sains, suggérant l'existence d'une modulation de la synthèse lymphocytaire de cette NT par les troubles de l'humeur [151].

3) **BDNF : rôle anti-apoptotique sur les cellules lymphocytaires B et plasmocytaires**

Cet effet du BDNF a particulièrement été bien étudié chez les plasmocytes malins ou issus de lignées myélomateuses qui expriment quasiment tous son récepteur TrkB [228]. La présence de BDNF dans le milieu de culture de cellules myélomateuses permet d'augmenter leur survie [228]. Cette résistance à l'apoptose due au couple BDNF/TrkB a également été montrée par la protection apportée face à l'apoptose induite par la dexaméthasone ou par le bortezomib [228]. L'action anti-apoptotique du BDNF sur les cellules plasmocytaires

tumorales est due à une activation des différentes voies de prolifération (MEK-ERK est PI3K/AKT) [229].

Outre cet effet anti-apoptotique, le BDNF induit également, *in vivo*, la migration des cellules myélomateuses ainsi que la sécrétion de VEGF par les cellules du stroma médullaire, facilitant ainsi la dissémination tumorale [230].

En revanche, le BDNF ne semblait pas initialement avoir d'effet autocrine sur les lymphocytes B et T matures du sang périphérique concernant leur prolifération, leur production de cytokines ou leur apoptose [223]. Cependant, des études plus récentes ont montré que le BDNF réduisait l'apoptose induite par les situations de stress comme la déprivation sérique chez certaines lignées B matures [231]. Nous avons également confirmé dans notre laboratoire que la sécrétion autocrine de BDNF par des lignées lymphocytaires B matures et plasmocytaires réduisait l'apoptose induite par la déprivation sérique ou l'activation de FAS [88]. Cette boucle autocrine de survie impliquant BDNF mature et expression membranaire de son récepteur TrkB était contre-balançée par la sécrétion autocrine de pro-BDNF et sa liaison à l'hétérodimère sortiline-p75^{NTR} [88].

4) BDNF et lymphocytes T

Les lymphocytes T murins et humains produisent du BDNF. La production de BDNF est augmentée en culture par la substance P, ainsi que lors de la stimulation par LPS, les anti-CD3 ou l'activation de la voie CD40 [223, 232, 233]. Il semble ainsi exister une régulation positive de l'expression de BDNF au niveau des cellules T activées *in vitro* par des cytokines pro-inflammatoires [223] mais également *in vivo* dans des modèles expérimentaux de SEP ou de maladie asthmatique [234].

A l'inverse de ce qui observé pour les lymphocytes B, les souris BDNF^{-/-} ne présentent pas d'anomalie du nombre de T circulants CD4 ou CD8+ bien qu'il existe une diminution du nombre de thymocytes chez ces souris, les populations lymphocytaires T restant en revanche équilibrées [224]. Le BDNF ne semble pas avoir d'action anti-apoptotique ou proliférative sur les lymphocytes T normaux [223].

5) Expression de TrkB par les lymphocytes

B et T

Les lymphocytes B humains et murins normaux expriment la forme tronquée de TrkB détectable en RT-PCR mais également par cytométrie en flux après activation mitogénique [37, 224, 231]. L'ensemble des lignées B et plasmocytaires expriment les transcrits codant pour la forme tronquée TrkB95 kDa, l'expression membranaire de ce récepteur étant négligeable en conditions basales de culture mais étant induite par les conditions de stress pro-apoptotique comme la déprivation sérique, l'activation de Fas ou l'exposition à la dexaméthasone [88, 228, 231].

L'expression du récepteur TrkB au niveau T semble varier en fonction du niveau d'activation de la cellule T ou de la lignée étudiée. Les lymphocytes T, sécréteurs de BDNF, infiltrant les lésions de démyélinisation au cours de la SEP sont dépourvus du récepteur TrkB145kDa [234] à l'inverse des lymphocytes T normaux circulants de volontaires sains ou de lignées T [37, 234]. Le récepteur TrkB 95 kDa est détectable par cytométrie en flux au niveau des T circulants [37], mais semble majoritairement exprimé par les LT de profil Th1 [227].

6) BDNF, cellules immunitaires et système

nerveux

Il est maintenant bien établi que les lymphocytes et les monocytes sont des sources importantes de BDNF au sein du système nerveux [223]. Alors que la présence d'infiltrats lymphocytaires est souvent considérée comme responsable des lésions tissulaires dans certaines maladies du système nerveux central comme la sclérose en plaques, plusieurs travaux tendent depuis peu à montrer qu'ils auraient au contraire un rôle de neuroprotection via la sécrétion de BDNF. Ce serait même plutôt une sécrétion déficiente de BDNF par ces cellules immunitaires qui expliquerait en partie la physiopathologie de cette maladie [233]. Une équipe a également pu montrer récemment que le niveau d'expression de l'ARN de BDNF était diminué dans les lymphocytes de sujets atteints de psychose maniaco-dépressive, particulièrement chez les patients suicidaires [235]. Il manque cependant encore trop d'éléments pour savoir si cette diminution est le reflet d'une anomalie concomitante des cellules cérébrales ou si c'est elle qui est directement la cause de la diminution des taux sériques de BDNF [235].

3. Neurotrophine 3

Actuellement, c'est principalement dans la physiopathologie de l'allergie que la NT-3 a pu être impliquée. En effet, tout comme pour le NGF, les concentrations en NT-3 du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) sont augmentées chez les patients asthmatiques [236]. De plus, les éosinophiles circulants expriment constitutivement NT-3 [236]. Une autre équipe a pu montrer que la NT-3 augmentait également la survie des plasmocytes pulmonaires spécifiques du pneumallergène des voies aériennes inflammées ainsi que celle des éosinophiles du LBA probablement par un mécanisme autocrine ou paracrine puisque les cellules musculaires lisses bronchiques produisent de la NT-3 [202]. Les éosinophiles du LBA ont aussi une expression membranaire accrue de CD69, marqueur d'activation, *via* la NT-3 [236].

La NT-3 paraît également être impliquée dans la maturation thymique. En effet, chez le rat, des transcrits codant pour NT-3 et TrkC sont détectables au niveau du thymus [218]. De plus, l'expression de TrkC augmente durant la maturation du thymus chez les oiseaux diminuant progressivement chez l'animal adulte suggérant une implication du couple NT-3/TrkC dans la maturation lymphocytaire T [237]. Concernant une éventuelle influence de la NT-3 sur les LB, les données de la littérature sont rares et très parcellaires sans qu'il puisse être montré un effet anti-apoptotique ou inducteur de la synthèse d'Ig.

Une seule étude est en faveur d'une expression membranaire de TrkC au niveau des B humains circulants normaux non stimulés [194].

Des transcrits codant pour TrkC sont détectables au niveau de clones T humains Th1 mais également au niveau de lymphocytes T normaux stimulés par un anticorps agoniste anti-CD3 [37]. L'adjonction d'IL-2 ou d'IL-4 dans le milieu de culture de clones T humains n'augmente pas en revanche la transcription de ce récepteur [37]. Une expression membranaire de TrkC est détectable par cytométrie en flux au niveau des T circulants [194].

4. Pro-neurotrophines et immunité

Actuellement, seuls le pro-NGF et le pro-BDNF ont fait la preuve d'une activité biologique. Ils ont tous les deux une action essentiellement pro-apoptotique.

Le pro-NGF a également été impliqué au niveau de certaines cellules de l'immunité innée, les lymphocytes Natural Killers (LNK) où il a également un rôle pro-apoptotique par la liaison à la sortiline pouvant ainsi jouer un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire innée [89].

Le rôle pro-apoptotique du pro-BDNF vis à vis de lignées lymphocytaires B matures et plasmocytaires de part son interaction avec l'hétéro-dimère p75^{NTR} / sortiline a également été démontré dans notre équipe [88]

Ce rôle pro-apoptotique passe ainsi par la liaison de la NTs immature avec la sortiline. L'apoptose médiée par les proNTs et par le complexe p75^{NTR}-sortiline est finement régulée aussi bien par le clivage contrôlé des pro-NTs que par la disponibilité membranaire de la sortiline, elle-même régie par d'autres mécanismes dont la protéine chaperonne NRH2 qui empêche la dégradation lysosomale de la sortiline [55]. Ces différents niveaux de régulation permettent ainsi d'éviter une apoptose massive des nombreuses cellules exprimant le récepteur p75^{NTR} à leur surface. Jusqu'à récemment, sa présence au sein des LB humains normaux n'avait été décrite que par notre laboratoire en intracytoplasmique [88]. Une étude a cependant pu montrer chez un petit échantillon de volontaires sains que la sortiline est exprimée à la surface de la très grande majorité des LNK, de près de 50% des LB alors qu'elle n'est que très peu retrouvée à la surface des LT. Cette même équipe n'a quasiment pas trouvé de p75^{NTR} membranaire quelle que soit la sous-population lymphocytaire considérée et a mis en évidence une expression de TrkA rare à la surface des LB, absente chez les LT et présente chez la moitié des LNK. A noter que chez les LNK, il n'y a presque pas de sortiline en intracytoplasmique - à l'inverse de ce qui a été observé dans les neurones plaçant pour un rôle autre que la régulation du trafic intracellulaire - et que l'expression de p75^{NTR} augmente nettement à la surface cellulaire après 48H de déprivation sérique ou après priming des LNK par l'IL-12. L'ajout de pro-NGF entraîne une augmentation de l'apoptose des LNK particulièrement s'ils ont aussi été exposés à l'IL-12, cet effet étant antagonisé par l'apport de neurotensine. Cependant, s'il n'est pas ajouté de pro-NGF au milieu de culture, l'apport de neurotensine ne modifie en rien la survie des LNK, probablement parce que ces cellules n'ont pas dans ces conditions de cultures de sécrétion propre de pro-NGF [89].

La sortiline est également capable d'entraîner la migration de cellules immunitaires dans des zones lésées du SNC. En effet, après fixation de la neurotensine à la sortiline, les cellules de la microglie, macrophages résidents de l'encéphale et de la moelle épinière, émettent de nombreux filopodes grâce à des modifications de leur cytosquelette actinique et vont phagocyter les neurones endommagés. Les voies de signalisations mises en jeu seraient celles des MAP-Kinases et de la PI3K [144].

5. Localisation salivaire, immunité.

La majorité du NGF circulant provient de sa sécrétion salivaire. Il a été démontré sur des modèles murins que cette production salivaire de NGF était indispensable à la réponse infectieuse anti-parasitaire. Une partie du BDNF circulant provient également des glandes salivaires, les taux sériques de cette NT n'étant plus augmentés par le stress après parotidectomie [28].

Parallèlement, la salive humaine contient du proNGF et du proBDNF ainsi que les formes matures de ces NTs. Cependant, il semblerait qu'il existe une importante variabilité inter-individus : toutes les formes ne sont pas exprimées par toutes les personnes testées et les concentrations varient énormément. Comme pour les taux sanguins, il semble y avoir une diminution des taux salivaires de NTs avec l'âge [238, 239]

Les NTs et les proNTs salivaires participeraient à la protection et à la réparation des muqueuses orales et gastriques ainsi qu'au maintien des cellules gustatives au même titre que les autres facteurs de croissance, l'EGF ou le transforming growth factor (TGF) possiblement via une action autocrine ou paracrine. En effet, divers travaux ont pu montrer que les cellules de la cavité orale ou de tractus gastrointestinal exprimaient de façon importante TrkB et p75^{NTR} [240]. La présence de TrkA, TrkC et p75^{NTR} a également été retrouvée au niveau des cellules acinaires et canaliculaires des glandes salivaires chez la souris et chez l'homme [241].

En pathologie humaine, on observe une augmentation de la concentration salivaire de NGF au cours des brûlures linguales chroniques [242].

6. Implication des neuropeptides dans les MAI.

Le NGF semble la NT majoritairement impliquée dans ces processus. Beaucoup de cellules immunitaires sécrétrices de NGF contribuent à la dérégulation du système immunitaire entraînant les pathologies auto-immunes.

In vitro, les lymphocytes activés et les monocytes sécrètent du NGF [243]. De plus, plusieurs expériences réalisées *in vitro*, ont démontré que la sécrétion du NGF était associée à l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires de type Il-1 β ou TNF α [195, 244, 245]. L'effet chimioattractant et prolifératif du NGF a déjà été démontré sur les mastocytes, ce qui suggère que l'interaction NGF/mastocytes détient une fonction essentielle dans les processus auto-immuns.

Les variations d'expressions du NGF ont été observées dans diverses MAI. Ainsi, lors de la SEP, de la polyarthrite rhumatoïde (PR) ou du lupus érythémateux disséminé (LED)

les concentrations plasmatiques de NGF sont augmentées par rapport aux témoins volontaires sains [246, 247].

L'équipe de Besser [37] fait apparaître, lors d'une étude sur les sous populations des PBMC humains que les NTs influencent le profil Th1 ou Th2. En effet, cette étude révèle, qu'à l'état basal les cellules Th expriment la forme tronquée du récepteur TrkB. De plus, seules les cellules de profil Th1 expriment la forme complète du récepteur, à l'issue d'une stimulation mitogénique, mettant en évidence le rôle de ces NTs dans l'orientation lymphocytaire et donc dans la réponse exacerbée inflammatoire [37].

Le BDNF participe également à la dysrégulation de la réponse immunitaire. Ainsi, il a été démontré que les PBMC de patients atteints de sclérose en plaque récurrente-rémittente sécrètent de faible quantité de BDNF par rapport aux individus sains [233].

a. Neurotrophines et polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde constitue le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires et se caractérise par une destruction articulaire progressive liée à une synovite inflammatoire. La lésion initiale articulaire se caractérise par un infiltrat monocytaire et par la production locale d'IL-6, d'IL-1 et de TNF- α , avec recrutement secondaire lymphocytaire T CD4+, activation B et production de facteur rhumatoïde et d'anticorps anti-peptides citrullinés, production locale de cytokines pro-inflammatoires, activation fibroblastique avec surproduction de MMP [248]. Le pronostic articulaire de cette affection a été transformé ces dernières années par l'avènement des biothérapies, en particuliers des anti-TNF qui permettent de limiter les phénomènes inéluctables de destruction articulaire.

Les concentrations sériques de NGF semblent plus élevés chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde que chez les sujets contrôles [249] mais ne sont pas influencés par les traitements anti-TNF, les taux restant stables malgré l'amélioration du score de sévérité clinique (DAS score) et la diminution parallèle des taux sériques d'IL-6 [250]

Des taux élevés de NGF ont été mis en évidence au niveau des tissus synoviaux de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde [246, 251], cette élévation de taux synoviaux de NGF est par ailleurs retrouvée dans des modèles murins expérimentaux de polyarthrite rhumatoïde [252]. Des travaux plus récents ont démontré une présence majoritaire de pro-NGF dans la polyarthrite rhumatoïde [253]. On retrouve également une surexpression de NGF, du BDNF et de la NT-3 au niveau des tissus synoviaux de patients atteints de

polyarthrite rhumatoïde ou de spondylarthrite, conjointement avec une surexpression des récepteurs Trk et de p75^{NTR} [254, 255]. Il existe par ailleurs une corrélation positive au sein de ces tissus entre l'intensité des lésions vascularitiques et de l'infiltration lymphocytaire avec l'expression respective de TrkA et de p75^{NTR} [255]. Parallèlement la néo-angiogénèse sous-chondrale est corrélée à l'expression locale du NGF [256]. À l'opposé, l'intensité des lésions vascularitiques est inversement corrélée à l'expression locale de la NT-3 [255]. L'expression synoviale de TrkA et de p75^{NTR} décroît progressivement au cours du traitement par anti-TNF (infliximab) suggérant une implication directe du NGF dans les processus inflammatoires locaux conduisant à la destruction articulaire [255]. Ces résultats contrastent avec l'absence de diminution des taux sériques de cette NT après traitement par anti-TNF [250]

b. Lupus érythémateux disséminé

Le LED est une maladie auto-immune systémique, à prédominance féminine, caractérisée par une hyperactivité B conduisant à la production d'anticorps anti-nucléaires et plus spécifiquement d'anticorps anti-DNA natifs et d'anti-Sm, ainsi que par une activation T de profil Th2 [257].

Les études réalisées concernent essentiellement l'augmentation des concentrations sériques de NGF chez des patients par rapport aux sujets contrôles aussi bien chez les enfants que chez les adultes lupiques [247, 249, 258]. Des concentrations sériques élevées de NGF ont été mises en évidence chez des patients lupiques par rapport aux témoins dans deux études pilotes, sans précision sur les relations existant entre l'élévation des taux et l'activité de la maladie [247, 249]. Plus récemment, une étude réalisée sur 10 enfants atteints de LED (atteinte cutanée n=6, articulaire n=4, rénale n=6, SLEDAI moyen 22±13) a mis en évidence une augmentation des concentrations sériques de NGF (ELISA) par rapport à 13 témoins appariés par l'âge et le sexe [258]. L'augmentation des taux de NGF atteignait 5 à 10 fois les valeurs obtenues chez les témoins ; par ailleurs, il existait une corrélation significative entre l'élévation des concentrations de NGF et le score d'activité clinico-biologique (SLEDAI) [258]. L'augmentation des concentrations sériques de NGF au cours du LED est également corrélée à l'augmentation des concentrations sériques d'IL13 [259].

Les souris hybrides NZB/W présentent une hyperactivation B, produisent des anticorps anti-nucléaires et sont atteintes d'un lupus systémique affectant les différents organes cibles avec développement rapide d'une glomérulonéphrite lupique [260]. Les taux sériques de NGF augmentent rapidement dans ce modèle murin, et atteignent leur maximum vers le

huitième mois de vie, ce qui correspond au développement de l'atteinte rénale du lupus mais également au développement d'un neuro-lupus [261]. Les taux spléniques et rénaux de NGF sont également augmentés au 8^{ème} mois de vie chez ces souris lupiques, et ce conjointement à la diminution de l'expression hypothalamique et hippocampique de cette NT [261].

L'étude d'un cas de neuro-lupus a mis en évidence que les taux plasmatiques de BDNF étaient augmentés [262]. Récemment, le rôle du BDNF comme biomarqueur des épisodes psychotiques a été confirmé par la même équipe [263]. Parallèlement, la survenue de poussée de psychose lupique et les anomalies du bilan neuropsychologique sont associées à l'existence du variant BDNF Val66Met [264].

Il n'existe pas de données à ce jour concernant l'interaction de la NT-3 dans cette pathologie.

c. Syndrome de Sjögren primitif

Le SGS associe classiquement un syndrome sec essentiellement oculaire et buccal à un terrain dysimmunitaire marqué par la présence d'anticorps antinucléaires ainsi qu'à un envahissement lymphocytaire des glandes salivaires et des autres glandes muqueuses de l'organisme. C'est pour cette raison que le SGS a été décrit sous le terme d'épithélite auto-immune [265]. Cette épithélite auto-immune s'accompagne d'une hyperactivation B locale et systémique ayant pour corrolaire, hypergammaglobulinémie, présence d'anticorps anti-SSA et SSB, élévation des chaînes légères libres sériques et de la β 2microglobulinémie. La classification actuelle du SGS repose sur la version révisée en 2002 des critères américano-européens [266]. Elle est basée sur une association de critères objectifs et subjectifs de syndrome sec oculo-buccal et nécessite la présence d'une histologie des glandes salivaires marquée par un infiltrat lymphocytaire ou celle d'autoanticorps nucléaires de spécificité SSA (pour *Sicca Syndrome*) ou SSB. La spécificité de cette classification est très élevée, de 97,4% avec pour corollaire une sensibilité un peu plus faible de 89,4%.

Bien que le NGF ait été découvert pour la première fois au niveau des glandes salivaires et que ce syndrome soit caractérisé par une infiltration lymphocytaire T au niveau de ces glandes, les données concernant l'interaction NTs et SgS sont rares.

Récemment, au sein du laboratoire, l'interaction entre élévation des taux sériques de NGF et de BDNF chez des patients atteints de SgSp a été mise en évidence [267]. Dans cette étude, il a été démontré que l'expression de ces NTs était corrélée à l'activité de la maladie.

Les concentrations plasmatiques de BDNF ont été corrélées à l'activation lymphocytaire B et T. En revanche, seuls les taux de NGF ont été associés à l'hypergammaglobulinémie [267].

d. Sclérodermie systémique

La sclérodermie est une maladie auto-immune caractérisée par 3 processus, une atteinte fibrosante cutanée et systémique, une atteinte microvasculaire et des anomalies immunologiques (anti-centromères, anti-TPO, anti-SCL70) [268-272]. Les NTs pourraient moduler les 3 versants physiopathologiques de cette connectivité.

Les données de la littérature concernant le rôle des NTs dans cette pathologie impliquent essentiellement le NGF et le BDNF [273].

Le NGF serait impliqué dans les phénomènes de fibrose pulmonaire et cutanée de cette maladie de part son rôle comme facteur autocrine de survie des kératinocytes. En effet, il a été démontré une augmentation des taux de NGF cutanés dans la sclérodermie [274].

Les NTs pourraient également être impliqués dans les phénomènes de microangiopathies observés lors de cette pathologie. L'angiogénèse, l'activation et l'apoptose des cellules endothéliales, les phénomènes de vasoconstriction sont d'autant de processus modulés par ces NTs. Le NGF favorise ainsi l'angiogénèse et la synthèse de facteurs angiogéniques tels que le VEGF [275]. Il a également été démontré que le BDNF pourrait induire l'angiogénèse dans les tissus ischémiés [276]. L'augmentation au niveau local des taux de BDNF lors des processus d'inflammation et de stress oxydatif survenant dans les tissus ischémiés contraste avec la réduction des taux sériques observée lors des syndromes coronariens sévères [277].

Au cours de cette pathologie, les atteintes microvasculaires débutent généralement par un syndrome de Raynaud, et peuvent progresser vers des ulcérations digitales et une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). Une possible interaction pourrait être établie entre les NTs et circuit de l'endothéline impliquée dans l'HTAP. Il a été démontré que la NT-3, dont la synthèse est régulée positivement par l'endothéline-1, était impliquée dans les pathologies cardiovasculaires [278, 279]. De plus, l'expression de p75^{NTR} au niveau pulmonaire, régule la susceptibilité de l'endothélium à l'endothéline-1 et au NO [280].

Le NGF est capable d'induire la prolifération des fibroblastes ainsi que la production de collagène [281]. Les propriétés sont médiées par le TGF β [282, 283] cytokine clé impliquée dans les processus de fibrose de cette pathologie [284]. De plus, le NGF pourrait être également impliqué dans ces processus de fibrose par un autre mécanisme. En effet, TrkA

est aussi connu pour être le récepteur du CTGF (Connective Tissue Growth Fator) autre facteur impliqué clé dans cette atteinte systémique [285].

Une augmentation de l'expression de ce facteur a été démontrée au niveau cutané pour des patients atteints de sclérodermie, en particulier aux premiers stades de la maladie [274].

De plus, une augmentation des taux circulants de NGF a été observée chez des patients à des stades plus avancés notamment lors d'atteintes articulaires sévères [286].

Toutefois, les données concernant l'implication des NTs dans la sclérodermie restent éparses et portent exclusivement sur le NGF.

B. La neurotensine dans le système immunitaire

Il existe très peu de données concernant le rôle de la neurotensine et de ses récepteurs au niveau lymphocytaires. Seules deux études rapportent la caractérisation de NTSR fonctionnels dans les lymphocytes T tumoraux issus de lymphomes de Sezari [179, 180]. Les données concernant son implication dans la réponse immune normale et pathologique restent à ce jour peu nombreuses.

L'implication de la neurotensine dans la réponse inflammatoire a été étudiée dans le cadre des maladies inflammatoires intestinales, la présence de ce neuropeptide étant ubiquitaire au sein du tube digestif. La neurotensine régule ainsi la motricité intestinale, la prolifération des cellules épithéliales et possède une action neuro-immunomodulatrice locale en augmentant la chemotaxie, l'activation mastocytaire, et la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6) [118, 287-289]. La neurotensine module ainsi la réparation muqueuse dans des modèles murins de colites inflammatoires, indépendamment de la voie des Cox2 [290]. La neurotensine est également capable d'augmenter la libération de NO par les macrophages activés par le LPS et l'IFN gamma [291].

Cependant, l'implication de ce neuropeptide dans l'homéostasie lymphocytaire B et les MAI reste à définir.

Objectifs de ce travail

Objectif général

Les NTs et les pro-NTs sont des neuropeptides impliqués dans les phénomènes de régulation de la balance mort / survie aussi bien dans les processus neuronaux, tumoraux qu'immunitaires. Leur action dans les processus de maturation et différenciation lymphocytaire B a été mise en évidence ces dernières années. L'action de ces neuropeptides dépend de la voie d'activation qui prédomine, à savoir Trk dépendante qui transduit des signaux de prolifération ou p75^{NTR} dépendante qui transduit des signaux pro-apoptotiques. La sortiline est la protéine qui va déterminer l'orientation de ces signaux. Dans un cas, cette protéine «cargo» va transporter les NTs matures jusqu'à leur site d'action et permettre un signal de prolifération, et dans un autre cas, elle va s'associer au récepteur p75^{NTR} et permettre la transduction des signaux de mort. Cette protéine, également connue comme récepteur de la neurotensine, pourra également s'associer avec les récepteurs NTSR afin de délivrer un signal de prolifération lié à la neurotensine.

Les récentes données du laboratoire [88] ont démontré pour la première fois un mécanisme de survie lymphocytaire B faisant intervenir le BDNF via sa molécule de transport la sortiline.

Compte tenu des différentes fonctions de ces neuropeptides et de la découverte de cette nouvelle voie de survie lymphocytaire B, le but de ce projet a été d'étudier l'interaction entre ces neuropeptides et leurs récepteurs dans le développement et la physiopathologie lymphocytaire B.

Objectifs spécifiques

La neurotensine et ses récepteurs sont des facteurs trophiques impliqués dans les processus neuronaux et tumoraux. La présence du récepteur NTSR-3 ou sortiline a été mise en évidence au niveau lymphocytaire B dans des processus de survie.

Un des objectifs de ce travail a été d'étudier l'expression de la neurotensine et de ses récepteurs au niveau des LB et de déterminer leur rôle éventuel dans les processus de prolifération et de survie.

Compte tenu de la dualité de fonction de la sortiline, le deuxième objectif a été d'étudier le rôle des NTs et de leurs récepteurs dans les dérégulations du système immunitaire, en particulier au niveau des maladies auto-immunes (MAI), maladies caractérisées par une prolifération excessive des LB.

Matériels et Méthodes

I Neurotensine, récepteurs à la neurotensine et lignées lymphocytaires B humaines

A. Culture cellulaire

1. Lignées lymphocytaires B humaines

Sept lignées lymphocytaires B humaines à différents stades de maturation ont été utilisées (Erreur ! Source du renvoi introuvable.)

- la lignée RS4 est une lignée lymphomateuse pro-B, BCR négative.
- Nalm6 et 697 sont des lignées issues de lymphomes lymphoblastiques, de phénotype pré-B.
- les lignées BL2 (IgM λ) et BL41 (IgM κ) de phénotype B mature proviennent de lymphomes de Burkitt, EBV négatif.
- RPMI est une lignée plasmocytaire provenant d'un myélome à IgG. La lignée U266 de phénotype plasmocytaire a été isolée à partir d'un myélome à IgE.

L'ensemble de ces lignées a été gracieusement fournies par les professeurs J. Feuillard (Limoges) et K. Lassoued (Amiens).

Les différents stades de maturation sont résumés en Erreur ! Source du renvoi introuvable..

a. Conditions de cultures

Les lignées B humaines sont entretenues en conditions basales en flasques de 75 cm² dans du milieu RPMI 1610+Glutamax® (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplémenté

avec 10 % de sérum de veau foetal (SVF, Invitrogen) décomplémenté par chauffage à 56°C pendant une heure et enrichi de 1 mM de pyruvate de sodium, 50 UI / ml de pénicilline-streptomycine, 1 % d'acides aminés non essentiels et 1 % de MEM vitamines (Invitrogen).

Les cultures sont maintenues à 37°C en atmosphère humide (95 %) dans un incubateur sous 5 % CO₂.

•Privation sérique

Un stress cellulaire est généré en cultivant les 7 lignées, à la densité de 2 à 3.10⁶ cellules/mL, dans du RPMI 1640+Glutamax® sans SVF mais supplémenté en pyruvate de sodium, vitamines, acides aminés non essentiels et antibiotiques selon les mêmes proportions utilisées en conditions basales.

•Neurotensine exogène

Une stimulation par 40 µM de neurotensine exogène (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) est réalisée à 24, 48 et 72 heures de culture des cellules en présence en conditions basales (10 % SVF) et de stress sérique (0 % SVF) durant 1 à 3 jours. La concentration optimale de 40 µM de neurotensine a été préalablement définie par une étude de viabilité cellulaire (tests XTT) en présence de concentrations de neurotensine allant de 10 à 100 µM.

•Apoptose induite par la voie Fas/CD95

L'apoptose induite par Fas a été étudiée en incubant les cellules cultivées en RPMI avec et sans SVF 24 heures avec un Ac agoniste du récepteur Fas conservé sans azide à une concentration de 100 ng/mL (clone 7C11, Immunotech, Marseille France) [292].

•Privation sérique et/ou l'activation de Fas

Les effets du blocage de p75^{NTR}, de la neutralisation du BDNF sur la modulation de l'apoptose induite (par la privation sérique et/ou l'activation de Fas) sont étudiés grâce à différents Ac agonistes ou antagonistes conservés sans azide :

- **Ac monoclonal anti-p75^{NTR}** antagoniste de la fixation du NGF sur p75^{NTR} (clone ME20.4, 4µg/mL, SantaCruz Biotech, CA) [293].
- **Ac monoclonal antagoniste de BDNF** (clone 35928.11, 10 µg/mL, Calbiochem, Fontenay sous Bois, France) [294].

•Inhibiteurs des récepteurs à la neurotensine

Trois inhibiteurs spécifiques de NTSR-1, NTSR-2 et NTSR-3 ont été testés à différentes concentrations durant 1 à 3 jours de privation sérique:

- **Ac monoclonal antagoniste de NTSR-1** (clone B-N6; 50 à 100 nM, Diaclone) [295],
- **Antagoniste pharmacologique de NTSR-2**, la levocabastine (2, 4 et 8 µM) (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) [296],
- **Ac polyclonal antagoniste de la sortiline (NTSR-3)** (10 µg/mL, R&D System, Lille France) [88].

2. Autres lignées cellulaires

La lignée humaine de cancer colorectal stade 2 HT29 (American Type Culture Collection, ATCC, LGC Promochem SARL, Molsheim, France) a été utilisée comme témoin positif d'expression de la neurotensine et de ses récepteurs NTSR-1 à -3 [297].

Conditions de culture

La lignée HT29 est cultivée en flasques de 75 cm² à la densité cellulaire de 10⁶ cellules/cm² dans du milieu MacCoy's 5A (Eurobio, Courtaboeuf, France) supplémenté avec 10 % de SVF et 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine (Invitrogen).

II Détection des transcrits

Des études de RT-PCR ont été réalisées afin d'identifier la présence des transcrits de la neurotensine et de ses récepteurs NTSR-1, NTSR-2 et NTSR-3 au sein des différentes lignées B.

1. Extraction des ARN totaux

L'extraction est effectuée avec le kit «SV Total Isolation System» (Promega) sur les différentes lignées en conditions basales de culture (10 % SVF) ainsi qu'après 24, 48 ou 72 heures de privation sérique. L'extraction est effectuée sur glace, à l'aide de matériels et d'eau garantie RNase-free (Invitrogen).

Chaque échantillon de 2.10^6 cellules est lavé une fois au PBS puis le culot cellulaire obtenu est homogénéisé dans 175 μ L de tampon d'extraction RLA (RNA Lysis Buffer) par pipetages successifs à l'aide d'une aiguille 25G. La solution obtenue est ensuite transférée dans un tube Eppendorf en présence de 350 μ L de tampon RDB (RNA Dilution Buffer) puis placée dans un bain à 70°C pendant 3 min et ensuite immédiatement centrifugée à 12000 g pendant 10 min à 4° C.

La purification des ARN est alors réalisée sur colonnes selon les indications du fournisseur. Un traitement à la DNase 1 (Promega) est systématiquement réalisé afin de limiter les contaminations par l'ADN génomique.

Les ARN extraits sont repris dans 20 à 30 μ L d'eau RNase free (Invitrogen) puis quantifiés par technique spectrométrique (ND-1000 Spectrophotometer Nanodrop Technologies, Wilmington, NC), et immédiatement congelés à -80°C.

L'intégrité des ARN extraits est systématiquement vérifiée par électrophorèse sur gel à 0,5 % d'agarose (Invitrogen).

2. Transcription inverse (RT)

La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) est effectuée à l'aide du kit SuperScript™ III First-Strand System (Invitrogen). Un thermocycleur programmable

(Applied Biosystem Gene Amp, Applied, Foster City, CA) constitué d'un bloc chauffant est utilisé pour l'obtention des ADNc.

Un µg d'ARN total est complexé à 50 µM d'oligo (dT) et 10 mM d'un mélange de dNTP durant 5 min à 65°C. La réaction est ensuite immédiatement arrêtée sur glace. Le tampon, 25 mM de MgCl₂, 0,1 M de DTT, 40 U/µL de RnaseOUT et 1 µL de l'enzyme SuperScriptTM III Reverse Transcriptase sont ensuite ajoutés. Le mélange est alors incubé à 50°C pendant 50 minutes puis la réaction est terminée à 85°C durant 5 minutes. Le mélange est immédiatement placé sur glace. Un µL de RNase H est ensuite rajouté afin d'inactiver l'enzyme et le mélange est incubé à 37°C durant 20 min.

Les ADNc obtenus sont conservés au -20°C jusqu'à leur utilisation.

3. Polymérisation en chaîne (PCR)

L'amplification des transcrits de la neurotensine et de ses récepteurs est réalisée par la réaction de PCR. Cette réaction est effectuée à l'aide d'un thermocycleur programmable (Applied Biosystem Gene Amp, Applied, Foster City, CA) pourvu d'un bloc chauffant permettant d'obtenir différentes températures pour chacune des étapes.

Deux microlitres d'ADNc à amplifier sont mélangés à 2µL de tampon spécifique, 2,5 µM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 10 pmoles de chacune des deux amorces spécifiques (amorces 5' et 3') et à 1 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen) pour un volume final de 20 µL. Après une étape de dénaturation initiale à 94°C durant 2 minutes, les 35 cycles de PCR sont réalisés suivant la séquence suivante : la première étape du cycle de dénaturation de l'ADN réalisée à 94°C pendant 30 secondes est suivie d'une étape d'hybridation des amorces pendant 30 secondes à la température idéale pour chaque couple d'amorces (Figure 9). Une dernière étape de polymérisation est effectuée à 72°C durant 45 secondes.

Deux contrôles internes sont effectués durant l'amplification. Un témoin négatif sans ADNc, qui permet de contrôler l'absence de contamination du mélange utilisé et un témoin positif utilisant des amorces spécifiques d'un gène de ménage (dans notre cas la Glyceraldehyde-3-Phosphate Déhydrogénase, GAPDH) afin de vérifier l'intégrité de nos échantillons.

Les séquences des amorces 5' et 3' utilisées pour chacune des amplifications réalisées par PCR, la température optimale d'hybridation, la taille attendue des produits d'amplification, sont précisées dans la Figure 9.

Désignation	Séquences des amorces	Taille du fragment amplifié	Température d'hybridation	Localisation en 3'	Référence de la banque de données	
A.	NTSR-1					
	F	GADCACAGCACATTCAAGCAT	200 bp	60.3	1215	NM_002531.2
	R	GTGGTTGGTCACCATGTAG				
	NTSR-2					
	F	CGAACTGGAGACCCCGGACCG	240 bp	60	608	NM_012344.3
	R	GACTCTGGGCTTCGGGGGT				
B.	NTSR-1					
	F	GGCACCACAAACAGTTTAGAGC	120 bp	61.4	1283	NM_018766.2
	R	GCAGACCACAAAGGGATTACC				
	NTSR-2					
	F	GCCTGGTGAGACACAAAGGAT	201 bp	60.9	866	NM_008747.2
	R	GCGTGTGGTCACCATGTAG				
Neurotensine	NTSR-3					
	F	CCTGGCTGGCACACTCCACA	220 bp	62.2	1859	NM_019972.2
	R	GGCTGCTCCACCGACTCTGA				
	Neurotensine					
	F	GTGTGGACCTGCTTGTACAGA	269 bp	60.9	63	NM_024435.2
	R	TCATGCATGTCTGCTGCTTC				
GAPDH						
	F	GGTGGAAATCATATTGGAAACATG	145 bp	58	-	
	R	GTCCGAGTCAACGGATTTCG				

Figure 9: Séquences et références des amorces utilisées en RT-PCR et permettant de mettre en évidence les transcrits codant pour la neurotensine et ces différents récepteurs (NTSR-1, NTSR-2, NTSR-3), chez l'homme (A) et chez la souris (B)

4. Migration des séquences amplifiées

Une électrophorèse sur gel à 1,4 % d'agarose (Invitrogen) dilué dans du tampon Tris-Acetate-EDTA 0,5 X (TAE, Invitrogen) et supplémenté de 10 µg/mL de Bromure d'Ethidium (BET, Sigma-Aldrich) est réalisée afin de séparer les séquences amplifiées. Après polymérisation du gel, les échantillons de PCR sont additionnés de tampon de charge (Invitrogen). Parallèlement, un marqueur de masse moléculaire (100 bp DNA ladder, Invitrogen) est déposé permettant de déterminer la taille des fragments obtenus.

L'ADN est ensuite visualisé sous éclairage UV après migration des échantillons.

5. Séquençage des ADNc

Afin de confirmer la présence des transcrits codant pour la neurotensine et ses différents récepteurs NTSR-1, NTSR-2, NTSR-3, les produits de PCR sont purifiés à l'aide du kit Marligen-Bioscience (USA) selon les indications du fournisseur.

Les fragments amplifiés sont ensuite analysés par séquençage à l'aide des amorces spécifiques de chaque transcrit. Un tube réactionnel est préparé pour chaque amorce, avec 30 ng (2,5 µL) de produit de PCR purifié, 1 µM d'amorce (2,5 µL), 2,5 µL de tampon de séquence 5X (Big Dye Sequencing Buffer) et 2,5 µL de mix de séquence (Big Dye, contenant des dXTP, des ddXTP marqués, du tampon de réaction et de la Taq polymérase). Une étape de dénaturation initiale à 96°C pendant une minute est d'abord effectuée puis la réaction d'amplification des produits de PCR est réalisée durant 25 cycles selon les étapes suivantes: une dénaturation à 96°C pendant 10 secondes, une hybridation à 50°C pendant 5 secondes et une élongation à 60°C pendant 4 minutes.

Les produits de séquence sont purifiés par chromatographie d'exclusion à l'aide du kit Dyeex® de Qiagen (Courtaboeuf, France), lyophilisés et réhydratés en formamide. Les séquences nucléotidiques sont analysées sur un séquenceur automatique ABI Prism 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems) couplé au logiciel Sequencing Analysis5.2®

(Applied Biosystems), puis décryptées à l'aide du logiciel Chromas®. Les séquences obtenues sont ensuite comparées à la banque de données Genbank à l'aide du logiciel FinchTV, logiciel qui affiche le chromatogramme de la séquence (version 1.3.1 Geospiza Inc.).

B. Etudes protéiques

1. Le western blot

La technique de western blot a été utilisée afin de mettre en évidence la présence protéique de la neurotensine et de ses différents récepteurs.

a. Lysat cellulaire

Après un lavage en PBS, 2 à 3.10^6 cellules sont lysées à l'aide d'une aiguille 25 G dans 150 à 200 μ L de tampon de lyse (constitué de 5 M NaCl, 1 % NP40, 100 mM NaVO₃, 100 mM PMSF, 0,5 mM EDTA, 5 mM de tampon Chaps, pH 7,6) pendant 30 minutes sur glace. Le lysat est ensuite centrifugé pendant 10 min à 4°C à 13000 g. Le surnageant, constitué des protéines cellulaires totales, est conservé à - 80°C.

b. Dosage protéique

Cinq μ L de chaque échantillon protéique sont retenus pour l'analyse de la concentration protéique totale selon la méthode colorimétrique de Bradford (SigmaAldrich). Une gamme étalon est réalisée à partir de l'albumine bovine (Bovin Serum albumine, BSA, Euromedex, Mundolsheim, France). La réaction colorimétrique est analysée à une longueur d'onde de 595 nm, à l'aide d'un lecteur de plaques.

c. Séparation des protéines par électrophorèse

Un échantillon de 50 µg de protéines est dilué dans du tampon Laemmli (Biorad, Marne-la-Coquette, France) puis dénaturé durant 5 min à 95°C. Le mélange obtenu est déposé dans chaque piste. Un marqueur moléculaire (Prestained Protein Ladder Plus, Euromedex) couplé à un chromophore bleu, employé selon les recommandations du fournisseur, est utilisé comme référence.

Les protéines dénaturées vont alors migrer par électrophorèse suivant leur poids moléculaire. Un gel de polyacrylamide contenant du Sodium Dodecyl Sulfate (SDS-PAGE, Polyacrylamide Gel Electrophoresis) permettant de charger les protéines négativement est utilisé afin de permettre la migration à travers le réseau d'acrylamide. La concentration des gels de polyacrylamide (entre 10 et 12 %) est optimisée suivant le poids moléculaire de la protéine recherchée. La migration s'effectue à ampérage constant (30 mA) dans du tampon de migration CAPS (3-Cyclohexylamino-1-propanesulfonic acid, Biorad, France). Un transfert (transfert semi liquide, Bio-Rad) sur membrane de PolyVinylidene Fluoride (PVDF, France), est ensuite effectué pendant 1 heure à 125 mA dans du tampon CAPS. La membrane de nitrocellulose est ensuite placée dans une solution de rouge Ponceau (Sigma-Aldrich) afin de vérifier la qualité de l'électrophorèse protéique et de son transfert.

Saturation et détection

Afin de bloquer les sites éventuels de fixation non spécifique des Ac primaires, les membranes sont incubées dans une solution de saturation (PBS-Tween 0,1 % contenant 5 % de lait écrémé) pendant une heure à température ambiante.

Selon les anticorps utilisés (Tableau I), les membranes sont incubées soit 12 heures à 4°C soit 2 heures à température ambiante avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de saturation.

Après 3 lavages au TBS-Tween 0,1 %, les membranes sont incubées durant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire correspondant couplé à la peroxydase (Tableau I).

Après 3 lavages en TBS, les membranes sont révélées à l'aide d'une solution chimiluminescente (Enhanced ChemiLuminescent, ECL reagent, Amersham Life Science, France).

Tableau I: Récapitulatif des différents anticorps utilisés en cytométrie (cyto), immunofluorescence indirecte (IFI) et western blot (WB)

Anticorps utilisés	Références	Fournisseurs	Hôte	Isotype	Epitopes reconnus	Applications		
						Cyto	IFI	WB
Cluster de différenciation								
CD19-PC7	IM3628	Beckman Coulter	Souris	IgG1	Extracellulaire	1/200		
CD3-PC7	737657	Beckman Coulter	Souris	IgG1	Extracellulaire	1/200		
CD4-FITC	A07750	Beckman Coulter	Souris	IgG1	Extracellulaire	1/200		
CD25-PC5	IM2646	Beckman Coulter	Souris	IgG1	Extracellulaire	1/200		
Récepteurs à la neurotensine								
NTSR-1	857040000	Diaclone	Souris	IgM	Extracellulaire	1/200		
NTSR-1	ANT-015	Alomone	Lapin	IgG				1/200
NTSR-2	ANT-016	Alomone	Lapin	IgG	Intracellulaire, C terminal	1/200	1/200	1/200
NTSR-3	AF3154	R et D systems	Chèvre	IgG	Extracellulaire	1/200	1/100	
NTSR-3 (C-20)	Sc-25055	Santacruz	Chèvre	IgG	N terminal			1/200
NTSR-3	Ab 16640-100	Abcam	Lapin	IgG		1/100		
Neurotensine								
Neurotensine FL-170	Sc-20806	Santacruz	Lapin	IgG	AA 1-170 forme totale		1/200	
Neurotrophines								
NGF (H-20)	Sc-548	Santacruz	Lapin	IgG	Forme précurseur (27 kDa) et forme mature (13 kDa)	1/200		
BDNF clone 35909	MAB2281	R et D systems	Souris	IgG1		1/200		
NT-3 (N-20)	Sc-547	Santacruz	Lapin	IgG	Forme mature (35 kDa)	1/200		
Récepteurs aux neurotrophines								
TRKA clone 165131	MAB1751	R et D systems	Souris	IgG1	Extracellulaire	1/200		
TRKB clone 72509	MAB3971	R et D systems	Souris	IgG1	Extracellulaire	1/200		
TRKC clone 75213	MAB3731	R et D systems	Souris	IgG1	Extracellulaire	1/200		
p ^{5NTR} (NGFR5)	Sc-58567	Santacruz	Souris	IgG1	N terminal	1/200		
Récepteur Fas								
CD95	IM2387	Immunotech	Souris	IgM	C terminal			
Gènes de ménage								
GAPDH	Sc-25778	Santacruz	Lapin	IgG				1/1000
Actine	A5441	Sigma	Souris	IgG				1/10000

Les signaux émis sont détectés grâce à un imageur Syngene, modèle Gbox-Chemi-XT (Genesnap Syngene, Cambridge, UK). Afin de quantifier les protéines contenues dans chaque lysat cellulaire protéique, les membranes sont réhybridées avec un Ac dirigé contre la GAPDH (Santacruz Biotech). Une quantification des expressions protéiques de chaque échantillon cellulaire est réalisée en comparant l'intensité d'expression de la protéine d'intérêt à l'intensité de la GAPDH (Genetool, Syngene) [298].

2. Etude immunocytochimique par immunofluorescence indirecte

L'expression de la neurotensine et de ses récepteurs à l'état basal et en condition de stress pro-apoptotique a été étudiée par la technique d'immunofluorescence indirecte. Les cellules sont d'abord lavées au PBS à 370 g durant 10 minutes. Après numération, 100 µL de PBS contenant 20000 cellules sont déposées sur une lame en verre recouverte de téflon (Menzel-Glaser) (Fischer scientifique, France). Après séchage, les cellules sont fixées au paraformaldéhyde 4 % (PFA, Sigma Aldrich) durant 10 min à température ambiante (TA).

Les cellules sont ensuite lavées en PBS puis perméabilisées, dans le cas de recherche d'antigènes intracellulaires, à la saponine (Invitrogen, France) durant 20 min à TA. Après un autre lavage au PBS, une saturation des sites non spécifiques est effectuée à l'aide d'une solution de PBS contenant 5 % de BSA, pendant 2 heures. Après saturation, les cellules sont incubées avec les anticorps primaires dilués dans la solution de saturation pendant toute la nuit à 4°C (**Tableau I**). Un contrôle isotypique est effectué pour chaque Ac primaire dans les mêmes conditions, avec selon les cas, des immunoglobulines irrelevantes de souris, de lapin ou de chèvre utilisées à la même concentration que l'Ac primaire (**Tableau II**).

Les cellules sont ensuite lavées 3 fois au PBS, puis incubées avec l'anticorps secondaire correspondant dilué au 1/5000 dans du PBS (**Tableau II**) pendant 30 minutes à l'obscurité et à TA. Les cellules sont alors lavées 2 fois au PBS puis une fois à l'eau distillée. Les lames sont alors montées à l'aide du milieu de montage liquide (Mounting Medium, Dako).

La détection des différents marquages se fait soit par microscopie à fluorescence (Leica DMRX, Rueil Malmaison, France) soit par microscopie confocale (Carl Zeiss S.A.S, LSM 510, Jena, Allemagne).

Tableau II: Isotypiques et anticorps secondaires utilisés en WB, IFI et cytométrie

Anticorps utilisés	Références	Fournisseurs	Hôte	Applications		
				Cytométrie	IFI	WB
Contrôles isotypiques						
IgM	857913020	Diaclone	Souris	Dilution identique à celle de l'anticorps primaire		
IgG	sc-2027	Santacruz	Lapin			
IgG	sc-2025	Santacruz	Souris			
IgG	Sc-2028	Santacruz	Chèvre			
Anticorps secondaires pour la cytométrie et l'IFI						
FITC	11-5890	eBiosciences	Souris	1/1000		
Alexa 488	A11001	Invitrogen	Souris	1/1000	1/2500	
Alexa 488	A11008	Invitrogen	Lapin	1/1000	1/2500	
Alexa 594	A11058	Invitrogen	Chèvre		1/2500	
Anticorps secondaires pour le western blot						
IgG-HRP	sc-2031	Santacruz	Souris			1/1000
IgG-HRP	sc-2317	Santacruz	Lapin			1/1000
IgG-HRP	sc-2020	Santacruz	Chèvre			1/1000

3. L'immunoprécipitation

L'analyse des interactions entre les différents récepteurs à la neurotensine est effectuée à l'aide de la méthode d'immunoprécipitation (IP) par utilisation de billes d'agarose A/G+ (Santacruz)

Les cellules sont d'abord lysées dans une solution de lyse (constituée de 5 M NaCl, 1 % NP40, 100 mM NaVO₃, 100 mM PMSF, 0,5 mM EDTA, 5 mM de tampon Chaps, pH 7,6) permettant de limiter la dénaturation des sites de liaisons de l'anticorps pendant 30 minutes dans de la glace.

Le lysat est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 4°C à 13000 g. Après quantification du surnageant protéique par la méthode de Bradford, 250 µg de protéines sont incubés avec 20 µL de billes d'agarose A/G+ durant 30 minutes, à 4°C, sous agitation, afin de limiter les fixations non spécifiques (étape de «preclearing»). Après une centrifugation de 2 minutes à 4°C, à 10000 g, le surnageant est mis à incuber 12 h avec 2,5 µg d'anticorps isotypique correspondant à la protéine immunoprécipitée (**Tableau I**) et 20 µL de billes d'agarose A/G+. Après centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment, le culot contenant les billes est conservé à 4°C. Le surnageant protéique est repris dans un nouveau tube avec 20 µL de billes et 2,5 µL d'anticorps anti-NTSR-1, NTSR-2 ou NTSR-3 selon l'interaction recherchée.

Ce mélange est ensuite incubé 12 h, sous agitation, à 4°C. Après une dernière étape de centrifugation, le surnageant qui correspondant à la fraction protéique libre, est conservé à 4°C. Le culot est alors lavé 3 fois avec du tampon de lyse durant 2 minutes à 10000 g, à 4° C.

La technique de Western blot est ensuite employée sur la fraction libre et la fraction fixée, ainsi que sur la fraction isotypique.

4. La cytométrie en flux

La caractérisation des neuropeptides et de leurs récepteurs dans les différentes conditions de culture est mise en évidence au niveau intracellulaire et membranaire par la technique de cytométrie en flux (FACS, Fluorescence Activating Cell Sorting).

Les cellules sont lavées au PBS à 370 g durant 10 minutes puis déposées à la densité de 2.10^5 dans des tubes de cytométrie. Les cellules sont ensuite fixées pendant 15 minutes par une solution de PFA 4 % puis lavées une fois en PBS. Les cellules sont perméabilisées 15 minutes avec de la saponine pour la détection des antigènes intra-cellulaires. Les cellules sont ensuite incubées durant 30 minutes à température ambiante avec les Ac primaires dilués dans une solution de saturation (PBS 1 % BSA) (Les différents Ac primaires utilisés en cytométrie de flux sont récapitulés dans le Tableau I page 93.

Des contrôles isotypiques correspondant aux anticorps d'intérêt sont également effectués.

Après un lavage en PBS, les cellules sont incubées 30 min à 4°C avec les Ac secondaires dilués dans la solution de saturation (**Tableau II**). Les cellules sont ensuite lavées puis remises en suspension dans 500 µL de PBS avant analyse par cytométrie en flux (LSR, Fortessa, Becton Dickinson). Les résultats obtenus sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes.

C. Voies de prolifération et d'apoptose

1. La prolifération cellulaire par test EDU

L'EDU (5-éthynyl-2'-déoxyuridine), analogue de la thymidine, est incorporé par les cellules au cours de la phase S. Le test utilisé (Click-It-EDU[®], Invitrogen) permet de détecter la prolifération cellulaire grâce à la quantification de la synthèse d'ADN par détection antigénique de l'incorporation de l'EDU secondairement couplé à un fluorochrome (Alexa Fluor 488). La quantité d'EDU incorporée est alors visualisée par cytométrie en flux après réaction catalytique cuivre-dépendante.

Les cellules sontensemencées à la densité de 10^6 /mL dans des plaques 24 puits en condition basale de culture, ainsi qu'en condition de privation sérique. Après 21 h d'incubation, l'EDU est ajouté dans chaque puits à la concentration finale de 30 μ M et l'incubation poursuivie pendant 3 h. Les cellules sont ensuite lavées en PBS, fixées 15 min en PFA 4 % puis perméabilisées 20 min avec de la saponine avant d'être incubées 30 min à température ambiante avec 100 μ L de «Click-It[™] Reaction Cocktail». Après 2 lavages en PBS-1 % BSA, les cellules sont immédiatement analysées par cytométrie en flux (LSR, Fortessa, BD).

2. Dosage des nucléosomes solubles par ELISA Cell Death

La proportion de cellules en apoptose est évaluée par le dosage des nucléosomes solubles générés au cours de ce processus de mort cellulaire. Afin de déterminer l'influence éventuelle de la neurotensine exogène sur l'apoptose des différentes lignées B, le dosage des nucléosomes solubles est réalisé dans des différentes conditions de stress cellulaire (privation sérique combinée ou non à l'activation de la voie de Fas) par technique ELISA selon les instructions du fournisseur (Cell Death Detection ELISA Plus ; Roche Diagnostic, Meylan, France).

Les cellules ($5 \cdot 10^4$ cellules/puits) sontensemencées dans des plaques 96 puits. Au bout de 24, 48 ou 72 heures d'incubation en présence des différentes molécules étudiées, les plaques contenant les cellules sont centrifugées à 370 g pendant 10 minutes. Le surnageant de culture est alors enlevé et remplacé par 200 μ L de tampon de lyse. Après 30 minutes de lyse, les plaques sont à nouveau centrifugées. Le surnageant (20 μ L) de chaque condition est ajouté

à des puits sensibilisés à la streptavidine et contenant un Ac anti-histone couplé à la biotine ainsi qu'un Ac anti-DNA couplé à la peroxydase. Un contrôle positif de réaction, ainsi qu'un contrôle négatif sont systématiquement réalisés. L'ensemble des composants est incubé 2 heures à température ambiante sous agitation douce. Trois lavages sont ensuite réalisés.

L'ABTS ou 2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid (substrat de l'enzyme) est incubé 10 à 15 minutes dans l'obscurité à température ambiante jusqu'à l'apparition de la réaction colorimétrique. La quantité d'ABTS oxydé (intensité colorimétrique) correspondant à la quantité d'ADN fragmenté est immédiatement mesurée grâce à un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 405 nm (Labsystem).

Les résultats sont évalués en index apoptotique. Cet index est déterminé pour chacune des conditions par rapport à l'état basal qui est arbitrairement fixé à 1. Chaque expérimentation a été effectuée au minimum 3 fois.

III Neurotensine, récepteurs à la neurotensine et lymphocytes

B sains humains

A. Isolement des cellules mononucléées sanguines

1. Séparation des lymphocytes B par tri magnétique positif

Les PBMC (peripheral blood mononuclear cells) de 13 témoins volontaires sains (8 hommes et 5 femmes, âge moyen $29,5 \pm 7$ ans) sont séparées par gradient Ficoll (Eurobio, Courtaboeuf, France). Trente-cinq mL de sang total prélevé sur tube EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) sont dilués au $\frac{1}{2}$ dans du PBS stérile. Deux volumes de cette solution sont déposés sur un volume de Ficoll (Eurobio, Courtaboeuf, France) puis immédiatement centrifugés à 278 g pendant 30 min.

L'anneau d'interphase contenant les PBMC est récupéré à l'aide de la pipette puis les cellules sont lavées par centrifugation dans 50 mL de RPMI à 278 g pendant 10 minutes. Le culot cellulaire est alors repris dans un ml de tampon de tri froid (4° C) (PBS, 0,5 % BSA, 2 mM EDTA (SigmaAldrich)) puis un comptage est effectué sur cellule de Malassez.

Les lymphocytes B circulants sont ensuite isolés par tri magnétique positif (CD19 Human MicroBeads MACS, Miltenyi Biotec SAS, France). Après un lavage de 10 min à 370 g en tampon de tri, les cellules sont resuspendues à la densité de $10^7/80$ μ L de tampon puis mises en contact avec les billes magnétiques recouvertes d'anticorps d'anti-CD19 humain (20 μ L/ 10^7 cellules). Après incubation de 15 min sous agitation douce à 4° C, les cellules sont relavées dans 2 mL de tampon. Le culot cellulaire est alors repris dans 500 μ L de tampon. L'étape de séparation magnétique s'effectue ensuite à l'aide d'une colonne MS (Magnetic Separation Column, Miltenyi Biotec) placée dans un champ magnétique. Les 500 μ L de solution cellulaire sont alors déposés dans la colonne et les cellules non fixées aux billes éliminées. Après 4 lavages de 500 μ L, la colonne est séparée de son aimant, et les cellules B fixées sont recueillies stérilement dans 1 mL de tampon de tri. Une nouvelle numération cellulaire avec contrôle de viabilité en bleu de trypan est réalisée.

La pureté du tri est systématiquement vérifiée par analyse en cytométrie à l'aide d'un anti-CD19 humain couplé à la PE-cyanine 7 (Beckman Coulter). Les cellules triées sont conservées pour une pureté $\geq 95\%$.

2. Culture cellulaire

Les lymphocytes B normaux sont cultivés dans des plaques 96 puits à fond rond (Nunc, VWR, Fontenay-sous-bois, France) à la densité de 2.10^6 cellules/mL. Ces lymphocytes sont cultivés dans du milieu RPMI+Glutamax contenant 20 % de SVF décomplémenté, 1 % de MEM vitamines, 1 % de sodium pyruvate, 1 % d'acides aminés non essentiels, 1 % de Glutamine ainsi qu'1 % de peni-streptomycine (Invitrogen) et enrichi de Pokeweed (PWM), facteur mitogénique, utilisé à la concentration de 20 µg/mL (Lectin from *Phytolacca Americana*, SigmaAldrich).

Après 3 à 7 jours de culture, les lymphocytes B sont comptés et leur viabilité est déterminée par un test au bleu de Trypan. Les cellules B stimulées sont alors utilisées pour l'extraction d'ARN, de protéines ou pour l'étude de l'expression de la neurotensine et de ces différents récepteurs par immunofluorescence et cytométrie en flux.

3. Extraction d'ARN

L'extraction des ARN totaux a été effectuée par le kit RNeasy Micro (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

Les étapes de RT-PCR et de PCR sont effectuées comme détaillée dans la section « Détection des transcrits » page 87.

4. Extraction protéique et immunofluorescence indirecte

Ces deux techniques ont été réalisées conformément aux protocoles détaillés (voir la section « Etude immunocytochimique par immunofluorescence indirecte »).

IV Neurotensine, récepteurs à la neurotensine et lignées B murines

A. Cultures cellulaires

1. Lignées murines

Six lignées murines à différents stades de maturation B ont été utilisées :

- 18.81 et 70Z/3 sont des lignées de phénotype pré-B
- Wehi et CH12 sont des lignées de phénotype B mature
- Les lignées S-194 et NS1 sont des lignées de phénotype plasmocytaire

Toutes ces lignées ont été fournies par l'UMR CNRS 6101, Limoges, dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Laurent Delpy.

2. Conditions de culture

Les cellules sanguines proviennent de rates de souris sauvage (C57bl/6). Elles sont cultivées à la densité de 10^6 cellules/mL dans du RPMI supplémenté à 10 % SVF (Invitrogen), de 1 mM de sodium pyruvate, de 0,1 mM d'acides aminés non essentiels, de 50 μ M β -mercaptoethanol, de 100 U/mL penicilline et de 100 μ g/mL streptomycine (Gibco).

B. Neurotrophines et lymphocytes B murins

1. Séparation des cellules pre-B murines

Pour l'analyse des cellules pré-B, les cellules B220⁺ CD43 issues de la moelle osseuse de souris ont été isolées par FACS-Vantage (BD Biosciences) avec une pureté supérieure à 90%. Les marquages ont été réalisés à l'aide d'anticorps anti-B220 (CD45R, marqueur pan-B) (RA3-6B2, e-Bioscience) et anti-CD43 (Ly-48, marqueur des pro-B murins, S7, BD Biosciences) selon un protocole validé dans la littérature [299].

2. Séparation des lymphocytes B par tri magnétique positif

Pour la séparation des LB spléniques de souris C57bl/6 (n=3) âgées de 6 mois, un tri magnétique négatif est effectué (CD43 Mouse MicroBeads MACS, Miltenyi Biotec SAS, France) selon les indications du fournisseur. Cette méthode permet en effet d'isoler les cellules B matures CD43⁻ du reste des splénocytes.

Après dissection de l'animal, la rate est broyée dans du milieu RPMI contenant des antibiotiques (pénicilline/streptomycine, Invitrogen) puis filtrée à l'aide d'un tamis de 0,4 µm (Becton Dickinson, BD, France). La solution obtenue, déposée sur une solution de Ficoll (Eurobio, France), à raison de deux volumes de solution sur un volume de Ficoll, est mise à centrifuger 30 min à 370 g. Après récupération de l'anneau d'interphase, les cellules sont centrifugées 10 min à 370 g dans 50 mL de RPMI. Après numération cellulaire et selon les indications du fournisseur, les cellules CD43⁻ sont isolées. La viabilité cellulaire est contrôlée par un test au bleu de trypan.

V Neurotrophines, récepteurs aux NTs et MAI

A. Neurotrophines, récepteurs aux NTs et LED

1. Principaux objectifs de cette étude et critères de jugement

Le protocole Neuroled est un protocole local de recherche clinique, dont le promoteur est le CHU de Limoges et dont le financement a été obtenu de l'AREML (Association de Recherche et d'Entraide de la Maladie Lupique).

a. Critères d'inclusions

➤ *Sélection des patients*

26 patients (sexe féminin n=24, âge moyen 44±12 ans) atteints de lupus érythémateux disséminé (LED) selon les critères de l'Association Américaine de Rhumatologie (ARA) ont été inclus après le recueil de leur consentement éclairé [300].

➤ *Sélection des témoins*

26 témoins (sexe féminin n=24, âge moyen 45±3 ans), appariés par l'âge et le sexe et indemnes de LED ont été inclus après le recueil de leur consentement éclairé.

b. Critères de non-inclusion

Afin de limiter les biais de sélection liés aux variations des NTs lors de certaines pathologies, les personnes atteintes de cancers, souffrants de dépression ou ont été exclues de l'étude [301-303]. Les patients bénéficiant d'une corticothérapie basale supérieure à 20 mg/jour de prednisone ou prednisolone, de fortes doses de corticostéroïdes pouvant diminuer les taux circulants de NGF et de BDNF [304] et moduler le profil d'activation lymphocytaire des patients lupiques [305].

L'association à un traitement anti-dépresseur fera l'objet d'une exclusion (en raison de leur augmentation possible des concentrations sériques de BDNF) [306, 307]. Par contre les autres traitements psychotropes ne seront pas des critères d'exclusion en raison de la fréquence des complications neurologiques périphériques ainsi que rhumatologiques

nécessitant le recours à des benzodiazépines ou à des les anti-convulsivants, ces traitements ne modifiant pas à notre connaissance les concentrations sériques de neurotrophines.

Les patients ou témoins incapables de comprendre ou d'adhérer au protocole, ayant signé le formulaire de refus, faisant l'objet d'une mesure de sauvegarde de justice ou privés de liberté, les personnes mineures ou majeures faisant l'objet d'une mesure de protection légale ainsi que les femmes enceintes ont été exclus.

c. Données biologiques et cliniques

➤ Paramètres cliniques recueillis

Les paramètres cliniques recueillis spécifiquement pour cette étude sont:

- **le score d'activité de SLEDAI** [308] pour les patients atteints de LED
- **l'échelle SF 36 de qualité de vie** [309] pour tous les patients et témoins, afin de déterminer l'influence éventuelle de la qualité de vie dans cette maladie chronique sur les taux sériques de neurotrophines.

Cette échelle de qualité de vie (Medical Outcomes Study-Short form-36) est un profil de 36 questions regroupées en 8 domaines explorant l'activité physique (10 items), les limitations liées à l'état physique (4 items), les douleurs physiques (2 items), la santé perçue (5 items), la vitalité (4 items), la vie et les relations avec les autres (2 items), les limitations liées à l'état psychique (3 items), la santé psychique (5 items) auxquelles s'ajoute un item indépendant : l'évolution de l'état de la santé [310]. Les résultats de cette échelle seront interprétés selon les normes établies par Leplege et *al.* [311].

- **des données cliniques d'activité**, l'ensemble des atteintes systémiques du LED présentes lors de l'inclusion étant colligées.

➤ Paramètres biologiques recueillis

Les paramètres biologiques et immunologiques recueillis sont les suivants :

- NFS
- Fonction rénale, protéinurie
- Dosage des anticorps antinucléaires (immunofluorescence indirecte sur cellules HEp2, (The Binding Site, Saint Egrève, France) et des anti-DNA natifs (ELISA, Phadia, Saint Quentin en Yvelines, France)
- L'existence d'anticorps anti-ENA (Phadia) et d'antiphospholipides (ELISA, Ingen, Chilly Mazarin, France) est systématiquement recueillie

- Dosage des gammaglobulines par immunoelectrophorese.

d. Dosage ELISA de BAFF et des profils cytokiniques Th1 (l'IFN- γ), Th2 (IL-10) et Th-17 (IL-17)

Les dosages de BAFF, de l'IL-10, de l'IFN- γ et de l'IL-17 sérique sont effectués en duplicate par la technique d'ELISA (Quantikine® Human BAFF, IL-10, IFN- γ , IL-17 Immunoassay R&D system, Lille, France) selon les indications du fournisseur.

Les échantillons sont utilisés non dilués (IL-17, l'IFN- γ) ou dilués au 1/2 sont déposés dans des puits préalablement sensibilisés soit avec un Ac monoclonal anti-BAFF, anti-IL-10, anti-IFN- γ ou anti-IL-17. Après le temps d'incubation recommandé par le fournisseur (2 à 3 heures selon la cytokine recherchée), les puits sont lavés à 4 reprises (tampon de lavage, solution commerciale). Une nouvelle incubation aux heures requises et à température ambiante est ensuite réalisée avec un deuxième Ac polyclonal couplé à la peroxydase. Après 4 lavages, la réaction colorimétrique est obtenue en 30 minutes après adjonction d'une solution chromogène de tetramethylbenzidine. La réaction est ensuite arrêtée par l'ajout de 100 μ L d'acide sulfurique. L'absorbance est mesurée à 450 nm par spectrophotométrie (Labsystem).

e. Etude de l'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs au niveau lymphocytaire T et B

La cytométrie en flux a été utilisée afin de mettre en évidence la présence membranaire des récepteurs aux NTs ainsi que leur éventuelle séquestration intracytoplasmique, mais également afin d'étudier les variations d'expression des NTs dans les LB et LT de patients atteints de LED et de volontaires sains. Les anticorps utilisés sont récapitulés dans les **Tableaux I et II**.

Cent microlitres de sang total sont incubés au noir pendant 15 minutes avec 5 μ L d'anticorps anti-CD19, CD3, CD4 et CD25 selon la répartition des tubes décrite dans le tableau 2 puis fixés par 100 μ L de la solution A du Kit Intrastain (DakoCytomation) pendant 15 minutes supplémentaires et lavés une fois en PBS.

Les tubes pour le marquage intra-cytoplasmique sont ensuite perméabilisés avec 100 μ L de la solution B du Kit Intrastain pendant 5 minutes au noir. Tous les tubes sont ensuite

mis en contact pendant 30 minutes à température ambiante au noir avec l'Ac primaire (1µL pour l'anti-sortiline, 2µL pour les anti-TrkA, TrkB, TrkC et BDNF, 2,5µL pour les contrôles isotypiques de lapin et de souris, 5µL pour les anti-p75^{NTR}, NGF, NT-3 et le FoxP3). Une lyse des globules rouges à l'aide d'un tampon de lyse (8,26 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, 30 mg EDTA Na) est effectuée sur les tubes utilisés pour le marquage membranaire durant 10 min. L'ensemble des tubes (membranaire et intracellulaire) est ensuite lavé dans du PBS durant 5 min à 370 g. Le culot cellulaire est ensuite incubé 30 minutes au noir à température ambiante avec 100 µL d'Ac secondaire lapin ou souris préalablement dilués au 500^e dans la solution de saturation. Les cellules sont ensuite à nouveau lavées et resuspendues dans 350 µL de PBS avant analyse par cytométrie en flux (FACS Canto II, BD Le Pont de Claix, France). La liste des différents tubes réalisés est récapitulée dans le **Tableau III**.

Tableau III: Liste des différents marquages réalisés au niveau lymphocytaire B et T dans le protocole NeuroLED (LED), NeuroSGSp (SGS) et dans la sclérodémie systémique (SSc).

	Anticorps primaire	Anticorps secondaire	LED	SgSI	SSc
Marquage membranaire	CD19 seul		*	*	
	CD19+TrkA	Souris	*	*	
	CD19+TrkB	Souris	*	*	
	CD19+TrkC	Souris	*	*	
	CD19+p75 ^{NTR}	Souris	*	*	
	CD19+Sortiline	Lapin		*	
	Isotypique de souris	Souris	*	*	
	Isotypique de lapin	Lapin	*	*	
	CD3 seul		*	*	
	CD3+TrkA	souris	*	*	
	CD3+TrkB	souris	*	*	
	CD3+TrkC	souris	*	*	
	CD3+p75 ^{NTR}	souris	*	*	
	CD3+Sortiline	lapin		*	
	Marquage intracytoplasmique	Isotypique de souris	souris	*	*
Isotypique de lapin		lapin	*	*	
CD19 seul			*	*	*
CD19+TrkA		souris	*	*	
CD19+TrkB		souris	*	*	
CD19+TrkC		souris	*	*	
CD19+p75 ^{NTR}		souris	*	*	
CD19+Sortiline		lapin		*	
CD19+NGF		lapin	*	*	
CD19+BDNF		souris	*	*	*
CD19+NT3		lapin	*	*	
CD3 seul			*	*	*
CD3+TrkA		souris	*	*	
CD3+TrkB		souris	*	*	
CD3+TrkC		souris	*	*	
CD3+p75 ^{NTR}		souris	*	*	
CD3+Sortiline		lapin		*	
CD19+NGF		lapin	*	*	
CD19+BDNF		souris	*	*	*
CD19+NT3		lapin	*	*	
CD4+CD25+FoxP3			*	*	

f. Dosage sérique des neurotrophines par la technique d'ELISA

La détermination des taux de NTs sanguins a été réalisée à l'aide des kits Promega NGF, BDNF et NT-3 Emax® ImmunoAssay System selon les protocoles du fabricant et la méthodologie décrite précédemment par notre laboratoire [267]. Chaque analyse a été effectuée en duplicate, après dilution dans le tampon «block and sample buffer» pour les échantillons sanguins au 1/10 pour NGF, 1/2 pour BDNF et 1/4 pour NT-3.

Les résultats pour chaque prélèvement sont considérés comme valides si l'écart entre les deux dosages est inférieur à 15 %. Ces kits ont une sensibilité permettant de détecter des concentrations circulantes allant de 7,8 à 500 pg/mL pour le NGF, de 1 à 500 pg/mL pour le BDNF et de 4,7 à 300 pg/mL pour le NT-3 avec une réactivité croisée inférieure à 3%.

Ce procédé permet une détection sensible et spécifique de ces NTs par la technique ELISA. Les trois méthodes sont identiques et diffèrent par la spécificité des anticorps utilisés pour l'ELISA (anticorps anti-NGF, anti-BDNF ou anti-NT-3 pour les dosages de la NT correspondante) et les temps d'incubation.

La sensibilisation des plaques Nunc Maxisorp de 96 puits (VWR Fontenay-sous-Bois, France) est obtenue avec 100 µL par puits d'une solution de tampon carbonate «block and sample buffer 1X» (sodium bicarbonate 0,025M, sodium carbonate 0,025M, Sigma Aldrich) contenant soit un Ac polyclonal anti-NGF (10 µL dilués un volume final de 10 mL de tampon carbonate), soit un Ac monoclonal anti-BDNF (10 µL dilués dans un volume final de 10 mL) ou polyclonal anti-NT-3 (20 µL dilués dans un volume final de 10 mL) pendant 12 heures à 4°C. Après un lavage en TBS-0,1% Tween (200 µL dans chaque puits), les plaques sont incubées en tampon carbonate «block and sample buffer 1X» à température ambiante pendant une heure afin de saturer les sites de fixation non spécifiques. Les puits sont ensuite lavés une fois en TBS-0,1% Tween.

Les sérums à tester, préalablement dilués en tampon carbonate selon les modalités décrites précédemment, sont alors déposés en duplicate (100 µL dans chaque puits) ; deux colonnes sont réservées à l'établissement de la courbe d'étalonnage avec le NGF, le BDNF ou la NT-3 standard. Les plaques sont ensuite incubées à température ambiante sous agitation douce pendant 6 heures pour le NGF et la NT-3 et pendant 2 heures pour le BDNF.

Après 5 autres lavages en TBS-0,1% Tween, la plaque est incubée soit avec un Ac monoclonal anti-NGF ou anti-NT-3 (2,5 µL d'anticorps dilués dans un volume final de 10 mL de tampon carbonate) soit avec un Ac polyclonal anti-BDNF (20 µL dilués dans un volume final de 10 mL de tampon carbonate), pendant 12 heures à 4°C pour le NGF et la NT-3 ou pendant 2 heures pour BDNF sous agitation douce à température ambiante. Les plaques sont à

nouveau lavées 5 fois en TBS-0,1% Tween puis incubées à température ambiante sous agitation douce avec l'Ac secondaire anti-Ig de rat conjugué à la peroxydase pendant une heure pour le BDNF et 2,5 heures pour le NGF et la NT-3. Suivent 5 lavages en TBS-0,1% Tween.

La révélation est obtenue par une solution de tétramethylbenzidine (TMB), substrat de la peroxydase, en 5 à 10 minutes à l'obscurité, jusqu'à l'obtention de la réaction colorimétrique. Celle-ci est ensuite arrêtée par l'ajout de 100 μ L d'acide chlorhydrique molaire. L'absorbance est mesurée à 450 nm par spectrophotométrie (Labsystem). Les concentrations des différentes NTs dans chaque échantillon sont déterminées par comparaison avec les courbes d'étalonnage.

B. Neurotrophines, récepteurs aux neurotrophines et sclérodermie

1. Patients et méthodes

a. Critères d'inclusion

Cinquante cinq patients sclérodermiques (SSc) consécutifs (49 femmes, âge moyen $54,2 \pm 12,5$ ans), répondant aux critères révisés de « l'American College of Rheumatology » ont été inclus au sein des CHU de Limoges et de Rouen. La durée d'évolution de la maladie était $5,5 \pm 3,3$ ans lors de la réalisation de cette étude. La cohorte de patients a été divisée en 4 catégories selon la classification de Medsger and Steen (SSc limitée (lSSc) précoce (< 5 ans) ou tardive; SSc diffuse (dSSc) précoce (< 3 ans) ou tardive [312]. Les patients présentant une néoplasie évolutive, ou des affections psychiatriques ont été exclus pour éviter les interférences potentielles de ces pathologies avec les concentrations sanguines de NTs.

Le groupe contrôle était composé de 32 volontaires sains appariés par l'âge et le sexe. Un consentement éclairé a été obtenu de tous les participants à ce protocole, approuvé préalablement par le Comité d'éthique de la commission d'établissement du CHU de Limoges dirigé par le Dr G Terrier (35-2009-17).

b. Données cliniques

La SSc a été classée en limitée (lSSc) ou diffuse selon l'importance de l'atteinte cutanée [313]. Quatre patients (anti-RNP positifs) présentaient un tableau de syndrome de Sharp caractérisé par des manifestations cliniques évocatrices de lupus (n=3) et de polymyosite (n=1).

Le profil clinique est constitué des données suivantes:

- le degré d'atteinte cutanée selon le score de Rodnan modifié basé sur une échelle entre allant de 0 (absence de sclérose) à 51 [314].

- l'existence d'ulcérations digitales, d'une atteinte pulmonaire fibrosante, des atteintes articulaires et digestives. La présence d'une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) a été définie par une PAP moyenne supérieure ou égale à 25 mm de Hg au cathétérisme cardiaque droit.

L'évaluation de la fonction pulmonaire lors de l'étude a été basée sur les données des épreuves fonctionnelles respiratoires: capacité vitale (litre et % de la théorique), DLCO (CO mL/min/mm Hg % de la théorique), DLCO/volume alvéolaire (% de la théorique) et du test de marche de 6 min (mètres et % de la théorique). La sévérité clinique a été évaluée par le score de Medsger [312].

c. Données immunologiques

La recherche d'anticorps anti-nucléaires, d'anti-centromère et d'anti-Scl70 a été réalisée en immunofluorescence sur cellules HEp2 (The Binding Site) et par ELISA (Phadia). La recherche d'anticorps anti-phospholipides et le dosage de gammaglobulines ont fait appel aux techniques détaillées dans le paragraphe V concernant le lupus érythémateux disséminé.

Les dosages sériques du NGF, du BDNF et de la NT-3 ont été réalisés par technique ELISA selon la méthodologie détaillée dans le paragraphe V concernant le lupus érythémateux disséminé.

La production de BDNF par les cellules B et T sanguines a été évaluée par cytométrie en flux chez 5 patients et 5 témoins selon la méthodologie détaillée dans la section « **La cytométrie en flux** ».

C. Neurotrophines, récepteurs aux neurotrophines et syndrome de Goujerot Sjögren

Ce travail fait partie d'un projet de recherche clinique régional débuté en mars 2010 dont il présente les premiers résultats. Il est prévu d'étudier au total les échantillons sanguins de 40 sujets atteints de SGS_p et de 40 sujets sains. Les malades et les contrôles sont appariés selon l'âge (+/- 5 ans) et le sexe. Un consentement éclairé a été obtenu auprès de chacun des participants à cette étude.

1. Patients

a. Critères d'éligibilité

Les sujets atteints de SGS_p doivent répondre aux critères Américano-Européens révisés de 2002 du SGS_p (**Annexe 2**), être âgés d'au moins 18 ans et être affiliés à un régime de Sécurité Sociale. Les sujets non atteints doivent être également âgés d'au moins 18 ans, affiliés à un régime de Sécurité Sociale et indemnes de toute MAI.

b. Critères de non-inclusion

N'ont pu être inclus :

- les personnes présentant des antécédents avérés de pathologies psychiatriques sévères non liées à un syndrome secondaire des anti-phospholipides ou à une atteinte cérébrale spécifique de la maladie.
- Les personnes présentant une addiction avérée connue (cocaïne, dérivés morphiniques, alcoolisme chronique).
- Les personnes prenant un traitement antidépresseur de type inhibiteurs de la recapture de la sérotonine ou tricycliques, ceux-ci modifiant les concentrations sériques de BDNF.
- Les personnes atteintes d'un cancer évolutif.
- Les personnes faisant l'objet d'une mesure de sauvegarde de justice.
- Les personnes incapables de comprendre ou d'adhérer au protocole.
- Les femmes enceintes.

- Les personnes mineures ou les personnes majeures faisant l'objet d'une mesure de protection légale.
- Les personnes privées de liberté.

c. Modalités de recrutement

Vingt-trois patients (19 femmes et 4 hommes) atteints de SGSp ont été inclus prospectivement au cours d'une consultation ou d'une hospitalisation dans le service de Médecine Interne A. Leur moyenne d'âge est de 56,8 ans avec un écart-type de 14,7 ans.

Les 16 volontaires sains appariés par l'âge et le sexe ont été recrutés parmi le personnel médical et paramédical volontaire du CHU de Limoges et les étudiants/enseignants volontaires des Facultés des Sciences et Techniques de l'Université de Limoges. Les inclusions se sont déroulées du 20 Avril au 21 Septembre 2010.

d. Méthodes

1) Marquages en cytométrie en flux

La cytométrie en flux a été utilisée afin de mettre en évidence la présence membranaire des récepteurs aux NTs ainsi que leur éventuelle séquestration intracytoplasmique mais également afin d'étudier les variations d'expression des NTs dans les LB et LT de patients atteint de SGSp et de volontaires sains. Les anticorps utilisés sont récapitulés dans le **Tableau III**.

2. ELISA

Des prélèvements sanguins et salivaires ont été effectués chez les patients. Chez les volontaires sains, seul le prélèvement sanguin a été réalisé. Il est à noter que le recueil salivaire a été impossible chez quatre patients en raison d'un syndrome sec terminal et qu'il a été insuffisant pour réaliser l'ensemble des tests chez deux autres.

La détermination des concentrations de NTs sanguins et salivaires a été réalisée à l'aide des kits Promega NGF, BDNF et NT-3 Emax® ImmunoAssay System selon les protocoles et la méthodologie précédemment décrite. Chaque analyse a été effectuée en duplicate, après dilution dans le tampon «block and sample buffer» pour les échantillons

sanguins au 1/10 pour NGF, 1/2 pour BDNF et 1/4 pour NT-3. Les échantillons salivaires ont été dilués au 1/2 pour NGF et NT-3 et utilisés purs pour BDNF.

VI **Analyses statistiques**

Tous les résultats sont exprimés en tant que valeur moyenne \pm écart moyen, une valeur de $p \leq 0.05$ étant considérée comme statistiquement significative.

Les analyses statistiques des tests de prolifération et d'apoptose ont été réalisées par l'ANOVA à un facteur à l'aide du logiciel SPSS (IBM).

Les analyses statistiques concernant les mesures des concentrations sanguines et salivaires de NTs selon les techniques d'ELISA ont été réalisées par ANOVA et tests de Fisher à l'aide du logiciel Statview 5 (Abacus).

Les différences d'expression des NTs et de leurs récepteurs en cytométrie en flux entre les groupes SGSp et témoins ont été analysées statistiquement selon la même méthodologie.

Les analyses statistiques concernant l'influence des NTs dans l'activité clinique et biologique des différentes maladies auto-immunes étudiées ont été réalisées à l'aide des tests chi-2 corrigés pour les valeurs qualitatives, ANOVA et Mann-Whitney pour les valeurs quantitatives. Les analyses de corrélation ont été réalisées à l'aide d'analyse de régression linéaire et les valeurs de p déterminées par le test de corrélation de Spearman.

Résultats

Ces résultats seront articulés autour de 2 thématiques :

La première partie de ce manuscrit concerne la caractérisation de la neurotensine et de ses récepteurs à l'état basal et lors d'un stress cellulaire (privation sérique, activation de la voie Fas/CD95) au sein de 7 lignées mimant les différents stades de maturation lymphocytaire B.

Les effets de la neurotensine exogène sur la prolifération et l'apoptose de ces différentes lignées seront traités dans un second temps. La fonctionnalité des différents récepteurs à la neurotensine sera étudiée à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques et d'anticorps antagonistes.

La caractérisation de la neurotensine et de ses récepteurs dans des LB circulants issus de donneurs sains puis dans des cellules B murines tumorales et non tumorales sera également développée dans un second temps.

La seconde partie de ce mémoire correspond à l'étude du rôle des neurotrophines et de leurs récepteurs dans l'activité clinico-biologique de différentes maladies auto-immunes systémiques LED, sclérodémie et syndrome de Sjögren primitif sera analysé. La dualité de fonction de NTSR-3 au niveau lymphocytaire sera également étudiée au cours du syndrome de Sjögren primitif.

Partie I

I Neurotensine et maturation lymphocytaire B

A. La neurotensine et ses récepteurs sont exprimés par les lignées B humaines à l'état basal

1. Expression des transcrits

L'analyse par RT-PCR de l'expression de la neurotensine et de NTSR-1, -2 et -3 a été réalisée sur 7 lignées B humaines en condition de culture basale (10% SVF).

Cette analyse a permis de mettre en évidence la présence du récepteur de haute affinité NTSR-1 au sein de toutes les lignées quel que soit le stade de maturation (**Figure 10 A**). A l'inverse, l'expression du récepteur NTSR-2 n'a été détectée que dans la lignée B mature BL2 et la lignée plasmocytaire RPMI (**Figure 10 B**). Le récepteur NTSR-3 a, quant à lui, été détecté dans l'ensemble des lignées B (**Figure 10 C**).

En revanche, bien que l'ensemble des lignées exprime au moins 2 des 3 récepteurs, seules les lignées B matures (BL2, BL41) et les lignées plasmocytaires (RPMI, U266) expriment la neurotensine à l'état transcriptionnel (**Figure 10 D**).

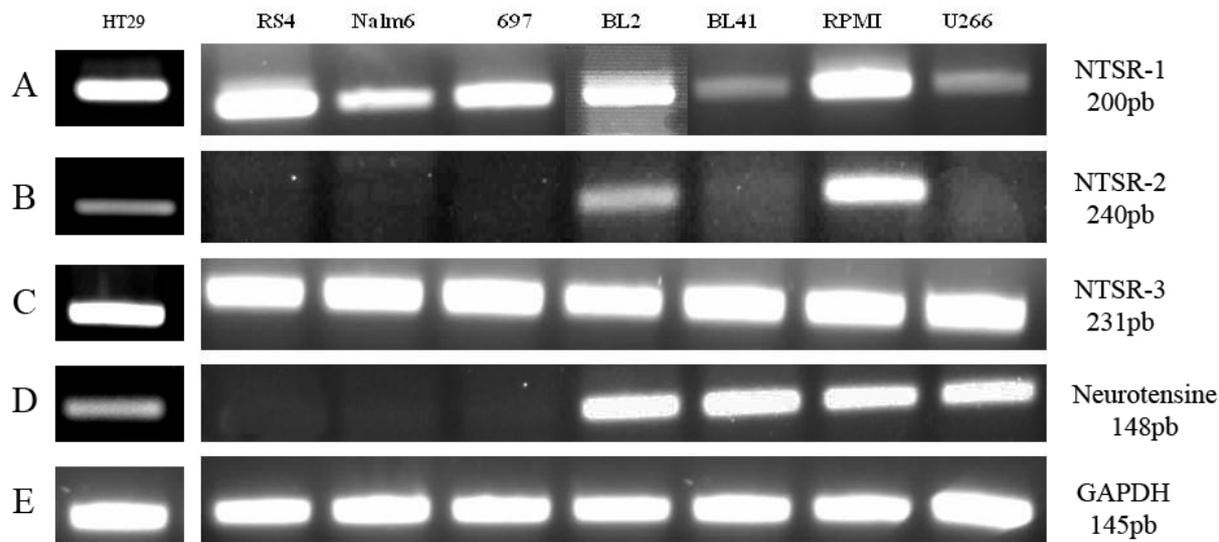


Figure 10: Détection, à l'état basal, des transcrits codants pour les récepteurs

(A) NTSR-1 (200 pb), (B) NTSR-2 (240 pb) et (C) NTSR-3 (231 pb) et (D) pour la neurotensine (148 pb) au niveau de 7 lignées B mimant les différents stades de maturation. La GAPDH (145 pb) utilisée comme contrôle de la réaction (E) et la lignée de cancer colo-rectal HT29 comme témoin positif d'expression. Les RT-PCR présentées sont représentatives des résultats obtenus lors de 3 expériences indépendantes.

L'ensemble des résultats observés en RT-PCR a été validé par séquençage après analyse par élution des différentes bandes détectées, confirmant ainsi l'activité transcriptionnelle des différents récepteurs (NM_002531.2, NM_012344.3, NM_002959.4) et de la neurotensine (NM_006183) dans les lignées B humaines.

2. Expression protéique

a. Western Blot

La présence protéique des 3 récepteurs à la neurotensine a été confirmée par l'analyse en western blot (**Figure 11**).

En condition basale, la présence d'une forme de NTSR-1 vraisemblablement non-glycosylée, de poids moléculaire inférieur (52 kDa) à celui du témoin positif exprimant la forme glycosylée au poids attendu (54 kDa) à été mis en évidence dans les lignées B humaines (**Figure 11**).

Paradoxalement, l'expression protéique de NTSR-2 a été détectée dans l'ensemble des lignées, suggérant l'existence d'une transcription faible à l'état basal (**Figure 11**).

La présence protéique de NTSR-3 a été mise en évidence dans l'ensemble des lignées comme nous l'avions déjà décrit précédemment [88] (**Figure 11**).

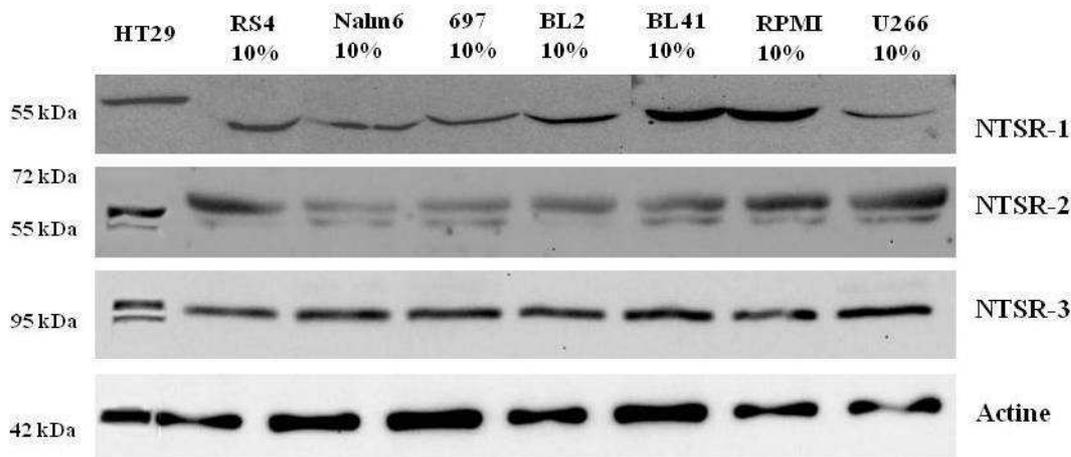


Figure 11: Mise en évidence de l'expression protéique de NTSR-1 (55 kDa), NTSR-2 (65 kDa), NTSR-3 (95 kDa) au niveau des 7 lignées B humaines à l'état basal.

L'actine (42 kDa) sert de contrôle. La lignée HT29 ayant été utilisée comme témoin positif d'expression.

b. Immunofluorescence indirecte

Afin de confirmer les résultats obtenus en western blot, la présence intra-cellulaire des différents récepteurs à la neurotensine a été étudiée par immunofluorescence indirecte à l'aide d'anticorps monoclonaux (anti-NTSR-1) et polyclonaux (anti-NTSR-2, anti-NTSR-3 et anti-neurotensine) (**Figure 12**). Cette analyse a confirmé la présence cytoplasmique des 3 récepteurs quel que soit le stade de maturation (**Figure 12**).

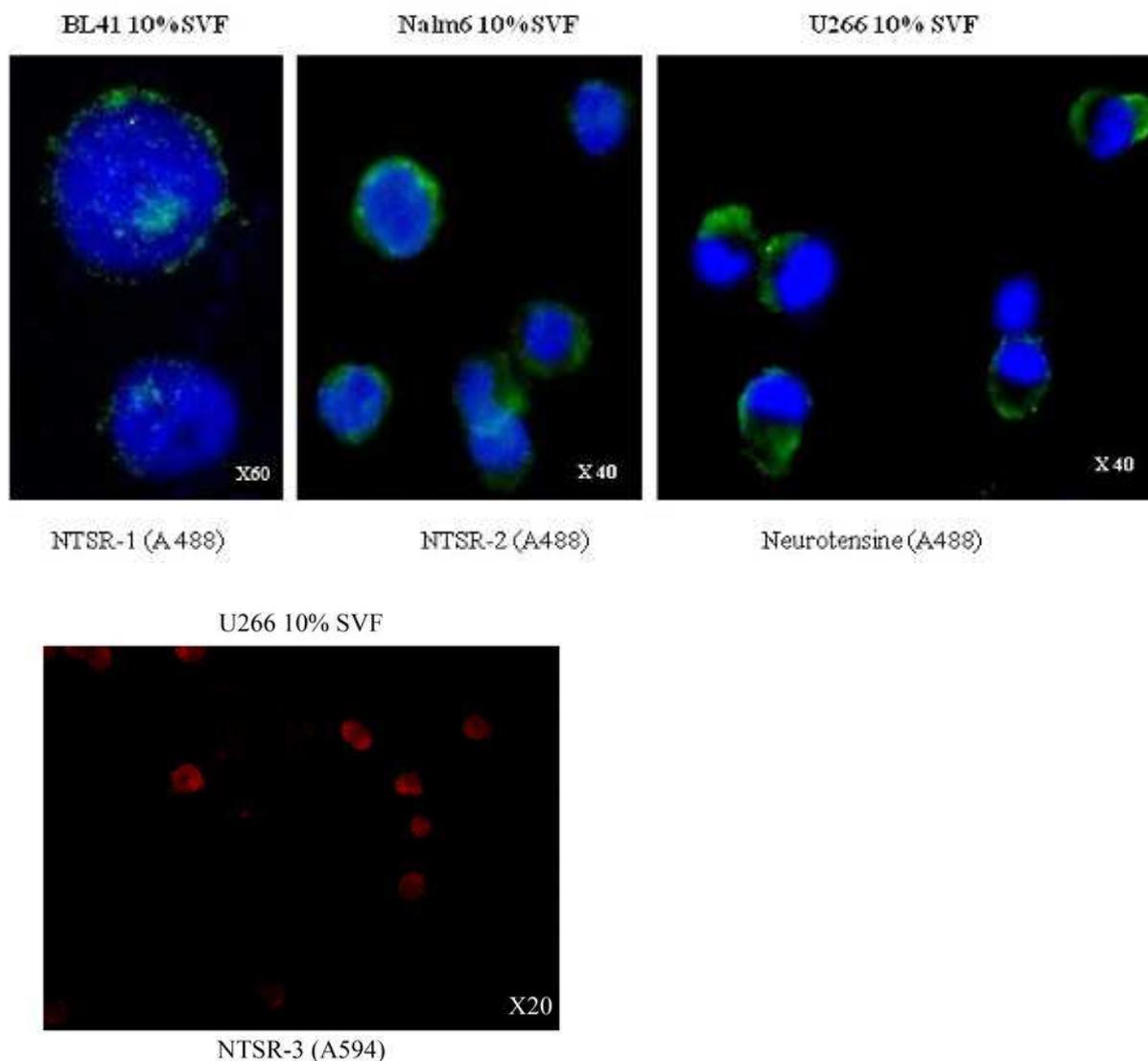


Figure 12: Analyse de l'expression des NTR-1 et -2 sur cellules perméabilisées ainsi que de la neurotensine en conditions basales de culture.

Les différents marqueurs sont identifiés à l'aide d'anticorps monoclonaux (NTSR-1) et polyclonaux (NTSR-2, NTSR-3 et neurotensine) révélés par un anticorps secondaire AlexaFluor A488 ou AlexaFluor A594. Un contre-marquage au DAPI est effectué pour la visualisation du noyau. Les immunofluorescences de NTSR-1, -2 et -3 présentées sont représentatives de l'expression de ces récepteurs par les 5 autres lignées étudiées. En revanche, la présence cytoplasmique de la neurotensine est restreinte aux 2 lignées plasmocytaires étudiées (exemple de U266, à droite).

La présence de la neurotensine n'a été observée que pour les lignées les plus matures (B12, BL41, U266 et RPMI), confirmant ainsi les résultats obtenus par RT-PCR (**Figure 10**). La polarisation de la fluorescence suggère l'existence d'un mécanisme de sécrétion (**Figure 12**).

c. Cytométrie en flux

La localisation membranaire éventuelle des différents récepteurs NTSR-1, -2 et -3 en conditions basales de culture a été étudiée par cytométrie en flux sur cellules non perméabilisées au niveau de 3 lignées Nalm6, BL41 et RPMI. On constate l'absence d'expression membranaire significative de NTSR-1 quelle que soit la lignée étudiée. L'expression membranaire de NTSR-3 est également faible, inférieure à 10% des cellules, quel que soit le stade de maturation. L'expression membranaire de NTSR-2 semble restreinte aux stades les plus matures et concerne alors plus de 40% des cellules (**Figure 13**).

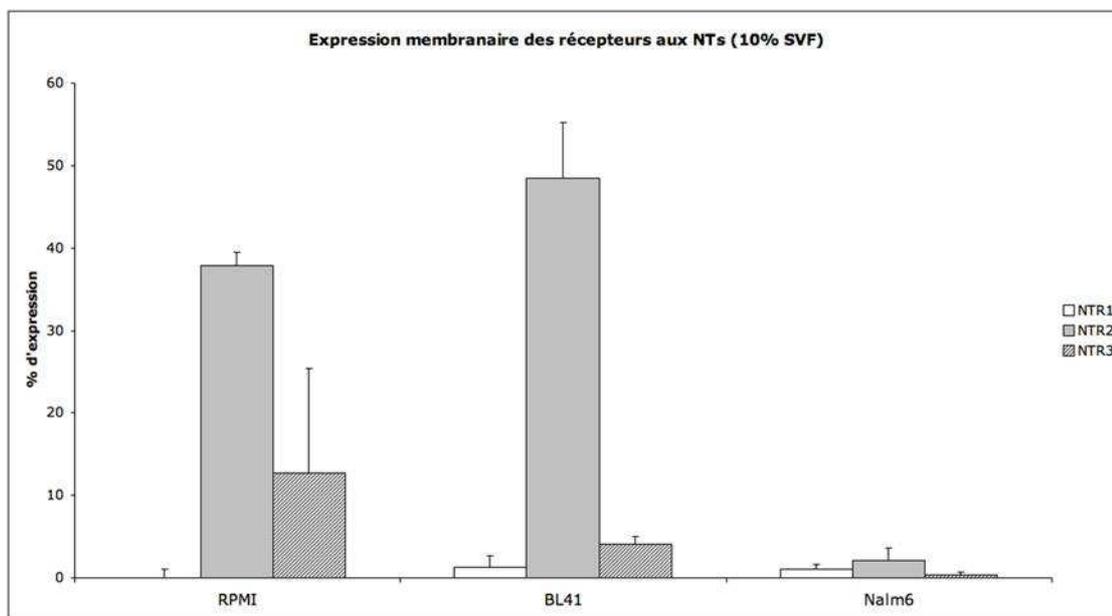


Figure 13: Analyse de l'expression des NTSR-1 -2 et -3 sur cellules non perméabilisées en cytométrie en flux en conditions basales de culture

Les différents marqueurs sont identifiés à l'aide d'anticorps monoclonaux (NTSR-1, à gauche) et polyclonaux (NTSR-2 et -3) révélés par un anticorps secondaire AlexaFluor A488. Les diagrammes sont représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes.

Ces premiers résultats ont confirmé la présence de la sortiline (NTSR-3) au sein d'un multiple panel de lignées B humaines, données que nous avons déjà publiées antérieurement [88]. Ils mettent en évidence, pour la première fois à notre connaissance, la présence transcriptionnelle et protéique des 2 autres récepteurs à la neurotensine, NTSR-1 et -2. Parallèlement, nous avons mis en évidence la synthèse protéique du ligand principal de ces récepteurs, la neurotensine, au sein des lignées les plus matures.

La neurotensine exogène étant capable de diminuer l'apoptose induite par la privation sérique [315], nous avons, dans un premier temps, étudié la modulation de l'expression de ce

neuropeptide et la translocation membranaire éventuelle de ces récepteurs au sein des différentes lignées B après 24 à 72 heures de culture en privation totale de SVF.

B. Le stress cellulaire module l'expression des récepteurs à la neurotensine dans les lignées B humaines

1. Expression des transcrits

L'analyse par RT-PCR a démontré la présence du transcrit NTSR-1 pour l'ensemble des lignées à l'exception de la lignée plasmocytaire U266 (**Figure 14 A**).

Le transcrit NTSR-2 a été détecté pour l'ensemble des lignées (Figure 14 B) alors que son expression était restreinte aux lignées BL2 et RPMI en conditions basales (**Figure 10 B**). La transcription de NTSR-2 est donc induite par la privation sérique dans les lignées les plus immatures.

L'expression des transcrits de NTSR-3 (**Figure 14 C**) est retrouvée au sein de toutes les lignées B, comme en situation de culture basale (**Figure 10 C**).

Les transcrits de la neurotensine ne sont mis en évidence qu'au sein des lignées B matures et plasmocytaires, la privation sérique n'induisant pas, à l'inverse de ce qui est observé pour NTSR-2, l'expression de ce neuropeptide dans les stades plus immatures (**Figure 14 D**).

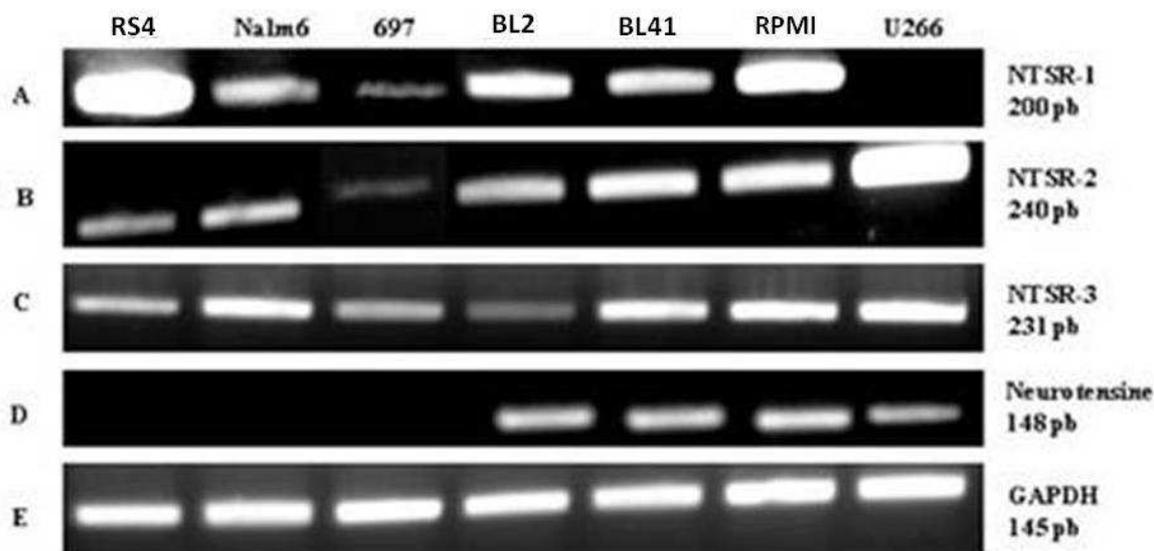


Figure 14: Détection des transcrits codants pour les récepteurs NTSR après 72 heures de cultures en privation sérique

(A) NTSR-1 (200 pb), (B) NTSR-2 (240 pb), (C) NTSR-3 (231 pb) et (D) pour la neurotensine (148 pb) au niveau des 7 lignées B mimant les différents stades de maturation. La GAPDH (145 pb) est utilisée comme contrôle de la réaction (E).

2. Expression protéique

L'analyse en western-blot a mis en évidence la présence de NTSR-1 sous la forme d'une protéine de 54 kDa qui pourrait correspondre à sa forme mature, glycosylée [92] de même poids moléculaire que le témoin positif (lignée HT29) pour les 7 lignées B (**Figure 15**). Ainsi, il a été mis en évidence la présence des deux isoformes de NTSR-1 (52 et 54 kDa) dans les lignées B humaines, en fonction des conditions de culture (**Figure 15**, **Figure 16**, **Figure 16**). L'analyse comparative de l'expression protéique de NTSR-1 entre les deux conditions de culture est résumée (**Figure 16**). L'expression protéique de NTSR-2 et NTSR-3 a également été détectée en condition de stress cellulaire (**Figure 15**). Toutefois, l'expression protéique de NTSR-2 dans la lignée 697 est faible, rejoignant ainsi les résultats observés en RT-PCR en condition de privation sérique (**Figure 14**).

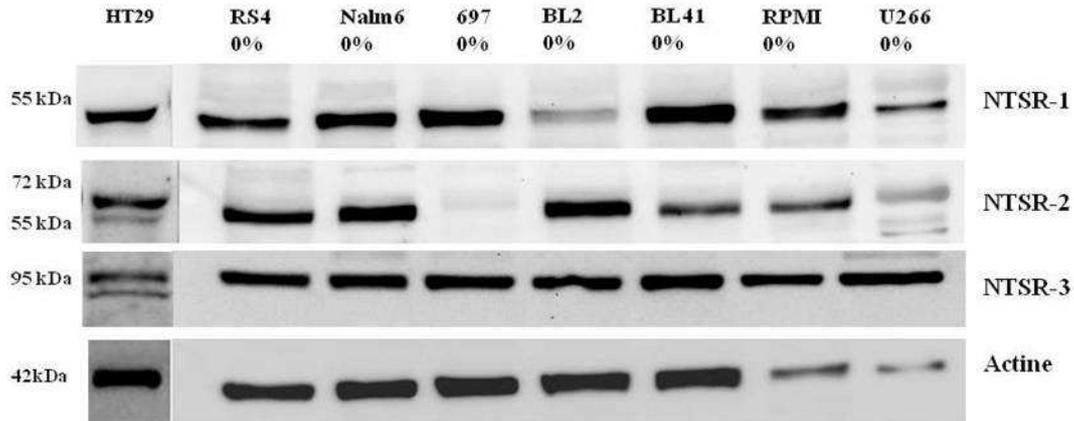


Figure 15: Détection de la présence des récepteurs et de la neurotensine par western blot après 72 h de privation sérique

Mise en évidence de l'expression protéique de NTSR-1 (54 kDa), NTSR-2 (65 kDa), NTSR-3 (95 kDa) au niveau des 7 lignées B humaines en condition de stress sérique. L'actine (42 kDa), est utilisée comme contrôle de réaction et la lignée HT29 comme témoin positif d'expression.

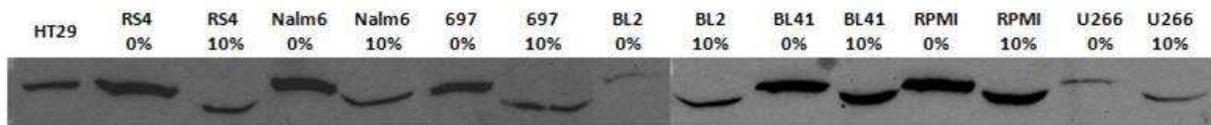


Figure 16: Détection de la présence de NTSR1 par western blot à l'état basal et après 72 h de privation sérique au niveau des lignées B humaines

Mise en évidence de l'expression protéique de NTSR-1 (54 kDa) au niveau des 7 lignées B humaines. La lignée HT29 est utilisée comme témoin positif d'expression.

Nous confirmons parallèlement la présence cytoplasmique, polarisée, de la neurotensine au sein des 2 lignées B matures et des 2 lignées plasmocytaires étudiées, pouvant, là encore suggérer l'existence d'un mécanisme de sécrétion actif (**Figure 17**).

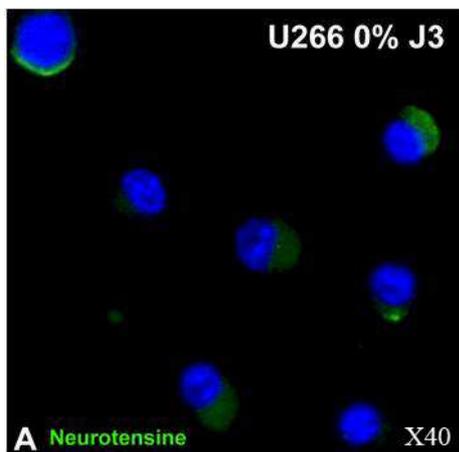


Figure 17: expression de la neurotensine (Alexa-Fluor 488) au niveau de la lignée plasmocytaire U266 après 3 jours de culture en privation sérique (0% J3).

Résultat représentatif de ceux obtenus avec les 2 lignées B matures et de la lignée plasmocytaire RPMI. Un contre-marquage au DAPI est effectué pour la visualisation nucléaire.

II Neurotensine et survie lymphocytaire B

Afin de déterminer le rôle potentiel anti-apoptotique et/ou prolifératif de la neurotensine sur les différentes lignées B, les effets de l'adjonction de neurotensine exogène ont été testés en condition basale et de stress pro-apoptotique.

A. Neurotensine et prolifération lymphocytaire B.

1. La neurotensine n'a aucun effet sur la prolifération des différentes lignées B cultivées en condition basale (10% SVF).

L'effet de la neurotensine exogène (40 μ M) sur la prolifération des lignées pro-B (Nalm6) B matures (BL41 et BL2) et plasmocytaire (RPMI1640) a été évalué par tests EDU après 24 et 48 heures de culture en conditions standard (10 % SVF).

A l'état basal, aucun effet de la neurotensine exogène sur la prolifération cellulaire n'est observé quel que soit le stade de maturation B (**Figure 18**).

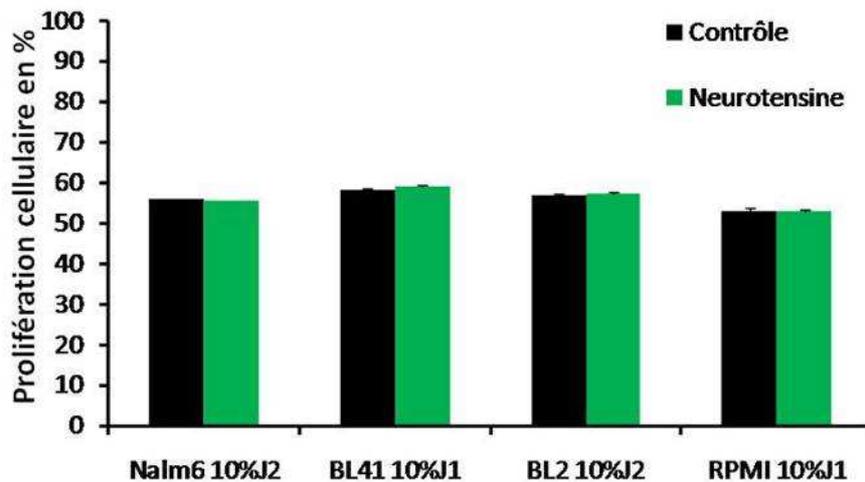


Figure 18 : Effet de la neurotensine exogène sur la prolifération des lignées Nalm6, BL2, BL41 et RPMI après un (10 % J1) à deux jours (10 % J2) de culture en condition basale en présence ou en absence de 40 $\mu\text{mol/l}$ de neurotensine exogène

Les histogrammes en noir représentent le nombre de cellules ayant incorporé l'EDU à l'état basal (10% SVF), les histogrammes en vert représentent le nombre de cellules en phase S en présence de neurotensine exogène (40 μM). L'ensemble des données est représentatif d'au moins 3 expériences indépendantes.

2. La neurotensine augmente la prolifération des lignées lymphocytaires B en condition de stress pro-apoptotique indépendamment du stade de maturation

L'effet de la neurotensine exogène (40 μM) sur la prolifération des lignées pro-B (Nalm6), B matures (BL41) et plasmocytaire (RPMI) a été évalué par tests EDU après 24 et 72 heures de culture en condition de privation sérique (0% SVF), cette cinétique ayant été déterminée par les travaux antérieurs de l'équipe [88].

La neurotensine exogène permet d'augmenter respectivement de $16\pm 0,74\%$ et $11\pm 0,91\%$ la prolifération des lignées pro-B (Nalm6) et B matures (BL41) après 24 heures de privation sérique ($p < 0,05$, Figure 19); en revanche, l'effet sur la prolifération ne s'observe qu'après 3 jours pour la lignée plasmocytaire RPMI8226 ($14\pm 0,73\%$, $p = 0,02$, **Figure 19**).

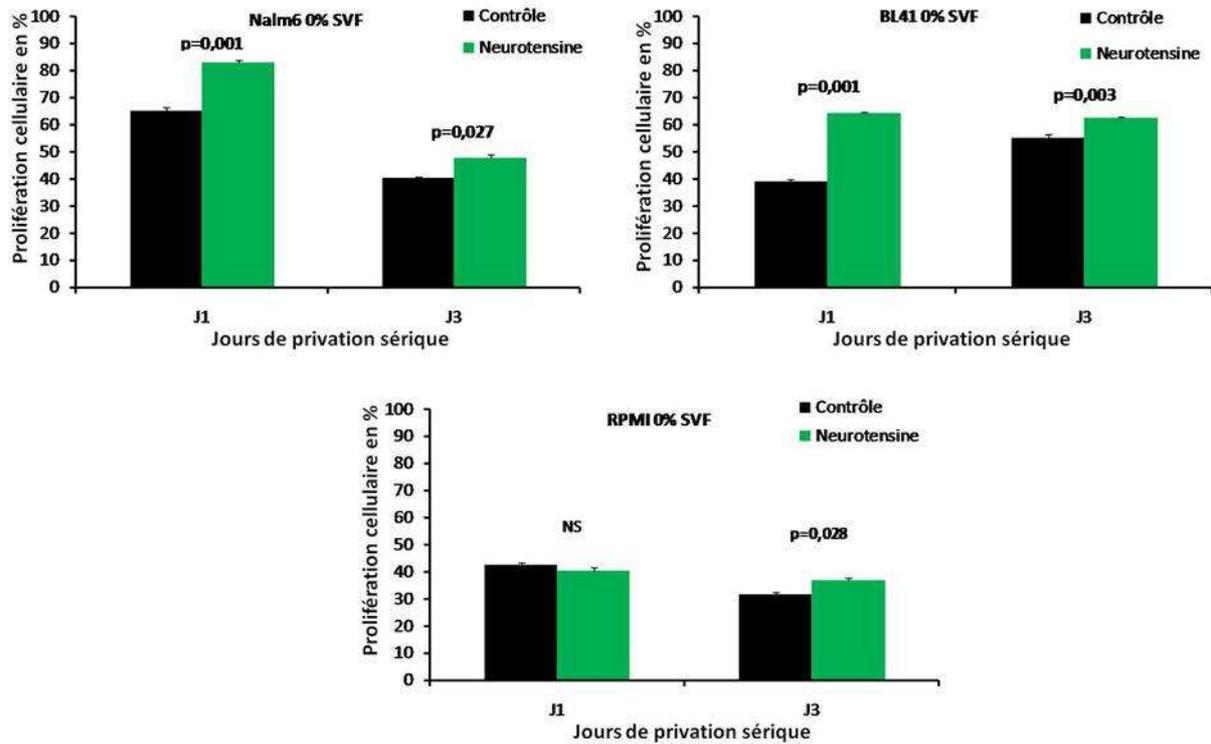


Figure 19: Effet de la neurotensine exogène (40 μ M) sur la prolifération des lignées Nalm6, BL41 et RPMI après 1 et 3 jours de privation sérique.

Les histogrammes noirs représentent le nombre de cellules ayant incorporé l'EDU en privation sérique (0% SVF, histogrammes noirs) et en présence de neurotensine exogène (40 μ M, histogrammes verts). L'ensemble des données est représentatif d'au moins 3 expériences indépendantes. Les résultats statistiquement représentatifs ($p < 0,05$) concernent les valeurs obtenues en comparaison à celles des mêmes conditions expérimentales en l'absence de neurotensine et sont indiqués sur le graphique.

B. La neurotensine est impliquée dans les mécanismes de résistance à l'apoptose en condition de stress cellulaire

1. Modulation de l'apoptose induite par la privation sérique par la neurotensine exogène

La modulation de l'apoptose induite par la privation sérique, par la neurotensine exogène (40 μ M) a été évaluée après 24 à 72 heures (**Figure 20**).

Aucun effet n'a pu être observé pour la lignée pro-B Nalm6 (**Figure 20**); à l'inverse, l'apoptose induite par la privation sérique est significativement réduite par la neurotensine exogène pour les lignées B matures BL41 ($p < 0,002$) et plasmocytaires RPMI ($p < 0,002$) dès 24 heures de déprivation. Un effet similaire est observé après 3 jours de privation sérique sur la lignée plasmocytaire U266 (ratio apoptotique à 0% SVF sans neurotensine = $1,01 \pm 0,02$ vs ratio apoptotique à 0% SVF avec neurotensine = $0,85 \pm 0,05$, $p < 0,004$).

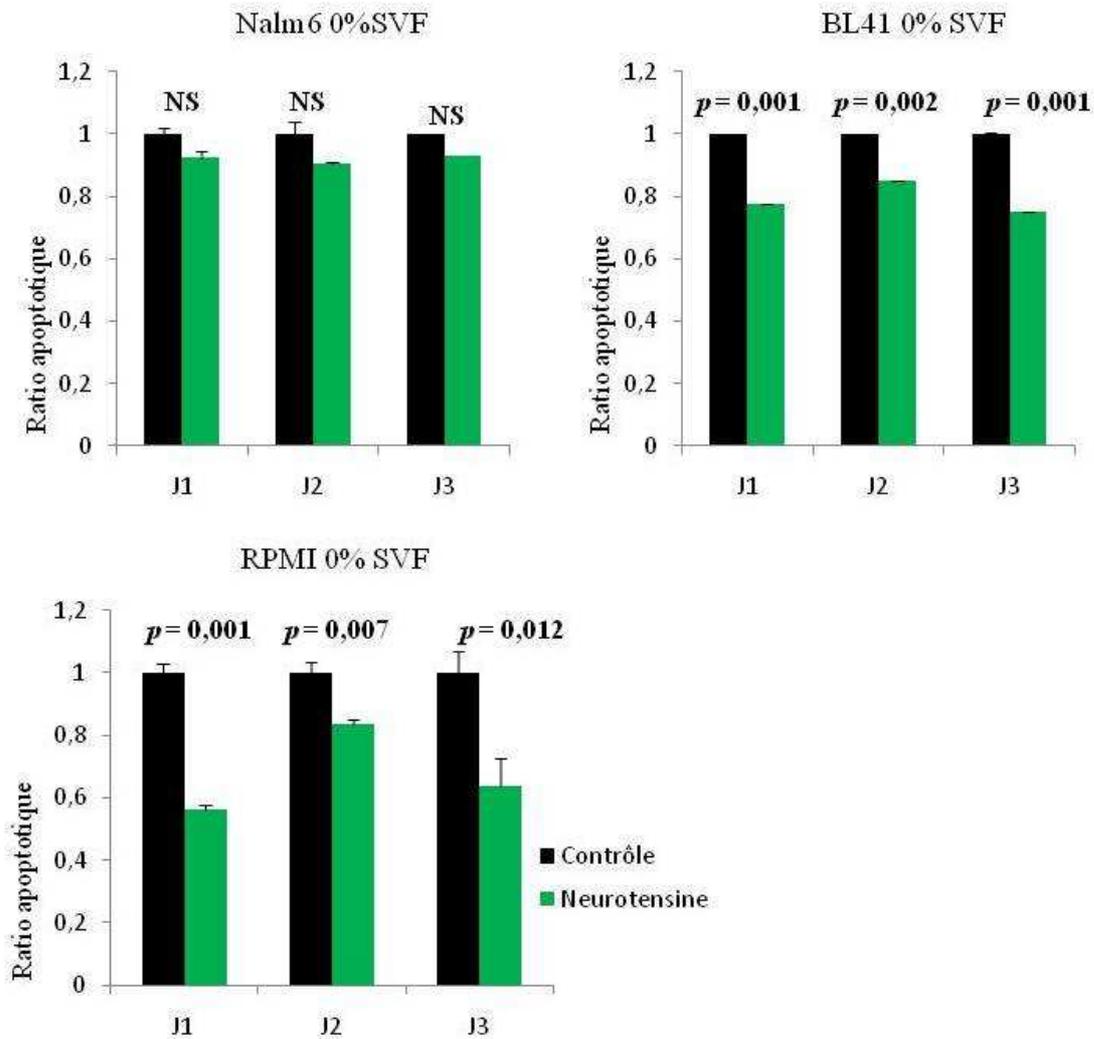


Figure 20: Effet de la neurotensine exogène (40 μ M) sur l'apoptose induite après 24 (J1) à 72 heures (J3) de privation sérique dans les lignées Nalm6, BL41 et RPMI en présence ou en absence de neurotensine exogène.

Les histogrammes noirs représentent le ratio apoptotique obtenu à l'état basal (0% SVF) ramené arbitrairement à 1, les histogrammes en vert représentent le ratio apoptotique obtenu en présence de neurotensine exogène (40 μ M). L'ensemble des données est représentatif d'au moins 3 expériences indépendantes. Seuls les résultats statistiquement représentatifs ($p < 0,05$) concernant les valeurs obtenues par rapport à l'état basal sont indiqués sur le graphique.

2. Modulation de l'apoptose induite par l'activation de Fas par la neurotensine exogène.

La neurotensine exogène permet de limiter l'apoptose induite par 24 heures d'exposition à l'anticorps agoniste anti-Fas (100 ng/mL, clone 7C11) de la lignée B mature BL2 cultivée en condition de privation sérique (0% SVF) ($p=0,001$, 132 Figure 21, à droite). En revanche, l'apoptose induite par l'activation du récepteur Fas n'est pas modifiée en conditions basales de culture (**Figure 21**, à gauche).

Aucun effet significatif sur la modulation de l'apoptose induite par Fas n'a pu être mis en évidence avec la lignée RPMI quelles que soient les conditions de culture (*ie* 10% ou 0% SVF) (**Figure 21**).

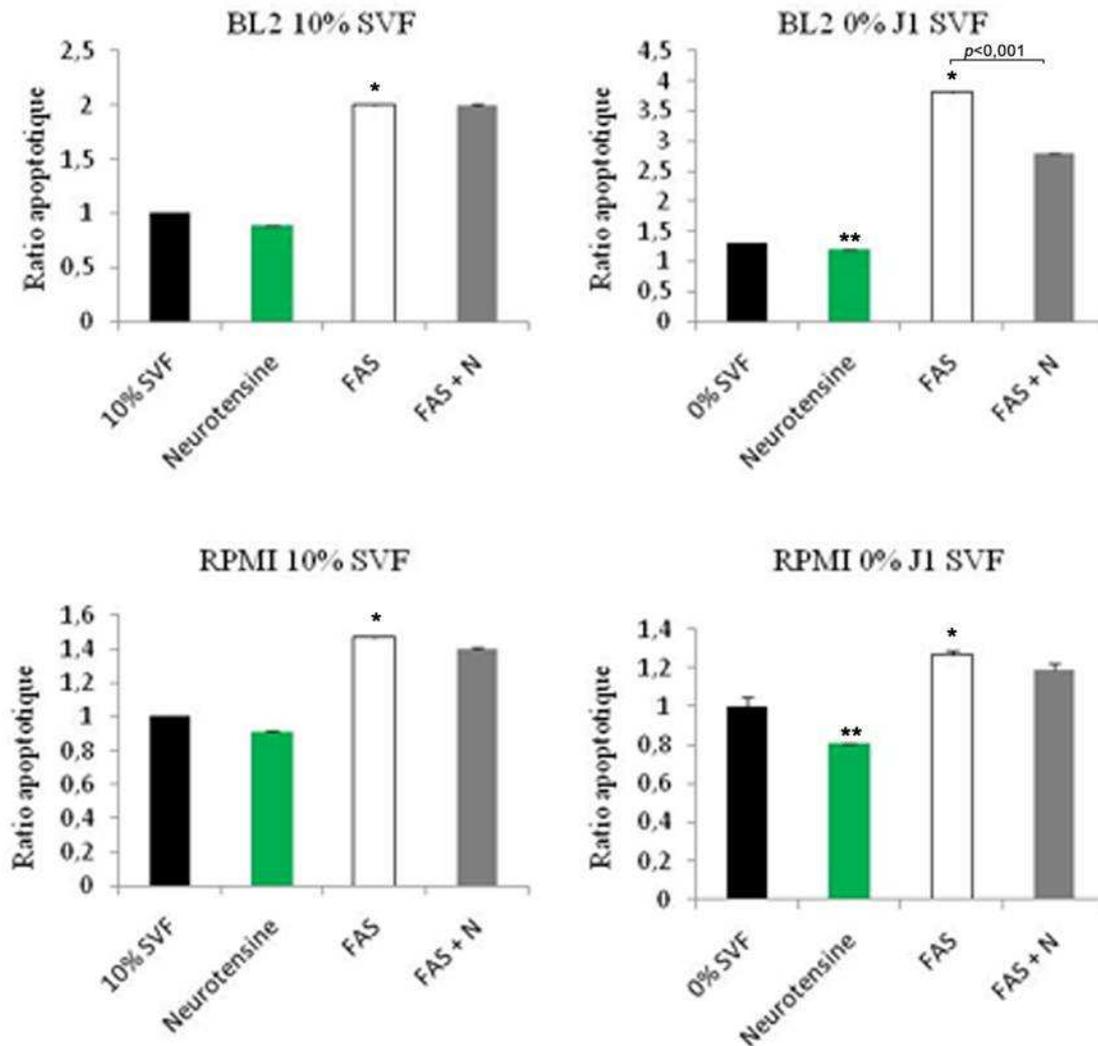


Figure 21: Effet de la neurotensine sur l'apoptose des lignées BL2 et RPMI après activation de la voie FAS (24h).

Les histogrammes représentent les ratios apoptotiques obtenus à l'état basal (10% ou 0% SVF, histogrammes noirs), en présence de neurotensine exogène seule (40 μ M, histogrammes verts), d'un anticorps agoniste du récepteur FAS (clone 7C11, 100 ng/mL, histogrammes blancs) combiné à la neurotensine exogène (FAS+N, histogrammes gris). L'ensemble des données est représentatif d'au moins 3 expériences indépendantes. Les résultats statistiquement représentatifs ($p < 0,05$) concernant les valeurs obtenues après adjonction de neurotensine (**) ou d'agoniste de FAS (*) par rapport à l'état basal sont indiqués sur le graphique. L'apoptose induite par FAS n'est statistiquement réduite par la neurotensine que pour la lignée lymphocytaire BL41 (FAS+N, $p = 0,001$). L'ensemble des résultats a été rapporté à la valeur obtenue à l'état basal arbitrairement définie à 1.

Des résultats similaires concernant une diminution significative de l'apoptose induite par Fas, par 40 μ M de neurotensine exogène ont pu être mis en évidence sur la lignée plasmocytaire U266 après 3 jours de privation sérique uniquement (**Figure 22**).

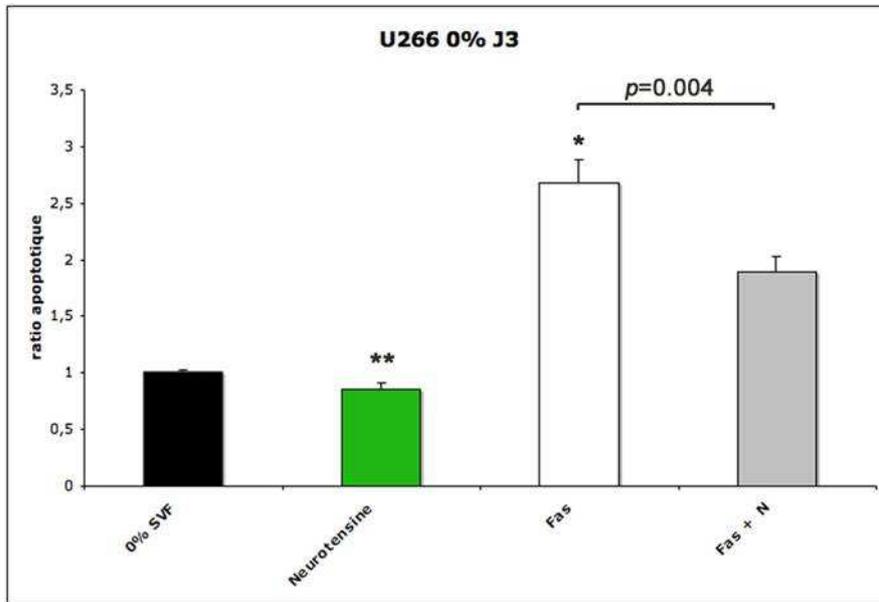


Figure 22: Effet de la neurotensine sur l'apoptose de la lignée U266 à 3 jours de privation après activation de la voie Fas.

Les histogrammes représentent les ratios apoptotiques obtenus à l'état basal (0% SVF, histogrammes noirs), en présence de neurotensine exogène seule (40 μ M, histogrammes verts), d'un agoniste de Fas (clone 7C11, 100 ng/mL, histogrammes blancs) combiné à la neurotensine exogène (Fas + N, histogrammes gris). L'ensemble des données est représentatif d'au moins 3 expériences indépendantes. Les résultats statistiquement représentatifs ($p < 0,05$) concernant les valeurs obtenues après adjonction de neurotensine (**) ou d'agoniste de Fas (*) par rapport à l'état basal sont indiqués sur le graphique. L'ensemble des résultats à été rapporté à la valeur obtenue à l'état basal, arbitrairement définie à 1.

Ainsi, la neurotensine exogène est capable d'augmenter la prolifération des lignées pré-B, B matures et plasmocytaires cultivées en situation de privation sérique. Ce neuropeptide diminue également l'apoptose induite par l'activation de Fas au niveau des lignées les plus matures.

3. Identification des récepteurs impliqués dans l'effet anti-apoptotique de la neurotensine exogène

Afin de déterminer le rôle respectif des différents récepteurs à la neurotensine dans la modulation de l'apoptose exercée par ce neuropeptide sur les lignées B matures et plasmocytaires, nous avons tenté dans un premier temps de déterminer quels récepteurs étaient localisés à la membrane en situation de stress pro-apoptotique. Puis, dans un second temps, la fixation de la neurotensine sur NTSR-1 et NTSR-3 a été bloquée à l'aide d'Ac antagonistes et sur NTSR-2 à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique.

4. Etude de la localisation membranaire des récepteurs à la neurotensine en situation de stress pro-apoptotique

La localisation membranaire de NTSR-1, NTSR-2 de NTSR-3 a été étudiée sur cellules non perméabilisées en situation de privation sérique (J1) au niveau des lignées cellulaires BL41, RPMI et Nalm6 (**Figure 23**).

Après 24 heures de privation sérique, la lignée plasmocytaire RPMI est caractérisée par une expression membranaire de NTSR-1 concernant $36\pm 2,4\%$ des cellules; parallèlement, $46\pm 1,1$ et $34\pm 3,3$ % des cellules expriment NTSR-2 et NTSR-3 à la membrane. La lignée B mature BL41 se caractérise par la présence d'une expression membranaire de NTSR-1 -2 et -3 au niveau de $32\pm 4,5$, $44,8\pm 4,8$ et $41,5\pm 1,5\%$, respectivement.

La lignée pré-B Nalm6 est caractérisée par une expression membranaire réduite de NTSR-2, concernant moins de 10% des cellules.

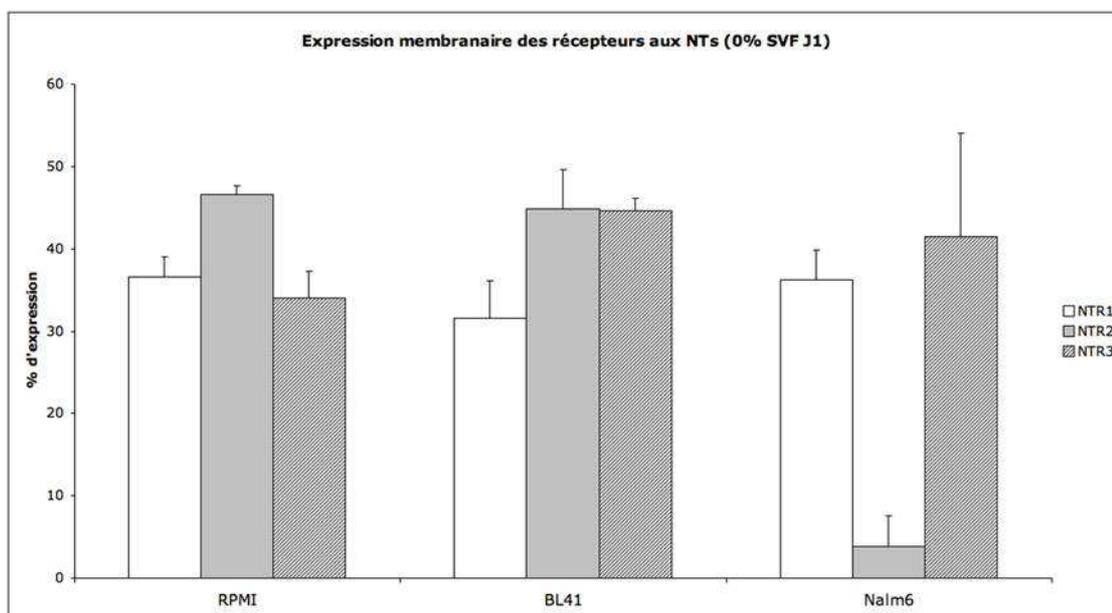


Figure 23: Analyse de l'expression des NTR-1 -2 et -3 sur cellules non perméabilisées en cytométrie en flux après 24h de privation sérique

Les différents marqueurs sont identifiés à l'aide d'anticorps monoclonaux (NTSR-1, à gauche) et polyclonaux (NTSR-2 et -3) révélés par un anticorps secondaire AlexaFluor A488. Les diagrammes sont représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes.

5. Effet de la neutralisation des différents récepteurs de la neurotensine sur l'apoptose induite par 24 heures de privation sérique au niveau de la lignée plasmocytaire RPMI

a. Neutralisation de NTSR-3

L'influence de la neutralisation de NTSR-3 sur l'apoptose induite par 24 heures de privation sérique a été étudiée sur la lignée RPMI. L'adjonction d'Ac antagoniste de NTSR-3 (100 µg/mL) diminue l'apoptose induite par la privation sérique ($p=0,06$), données antérieurement publiées [88]. On observe parallèlement un effet synergique sur la diminution de l'apoptose lors du blocage de NTSR-3 (100 µg/mL) et de l'adjonction de neurotensine exogène (40 µM, $p<0,001$) (**Figure 24**).

Ces résultats ne permettent pas de conclure que l'action anti-apoptotique de la neurotensine est liée à sa fixation exclusive sur le récepteur NTSR-3. En revanche, l'effet synergique observé en présence de neurotensine et de NTSR-3 sur la réduction de l'apoptose

permet d'évoquer que l'Ac antagoniste inhibe une fonction pro-apoptotique du récepteur NTSR-3. Ainsi, ces données suggèrent que l'Ac antagoniste de NTSR-3 bloque la fixation du pro-BDNF sur l'hétérodimère pro-apoptotique p75^{NTR}/NTSR-3 tel que nous l'avons précédemment décrit [88].

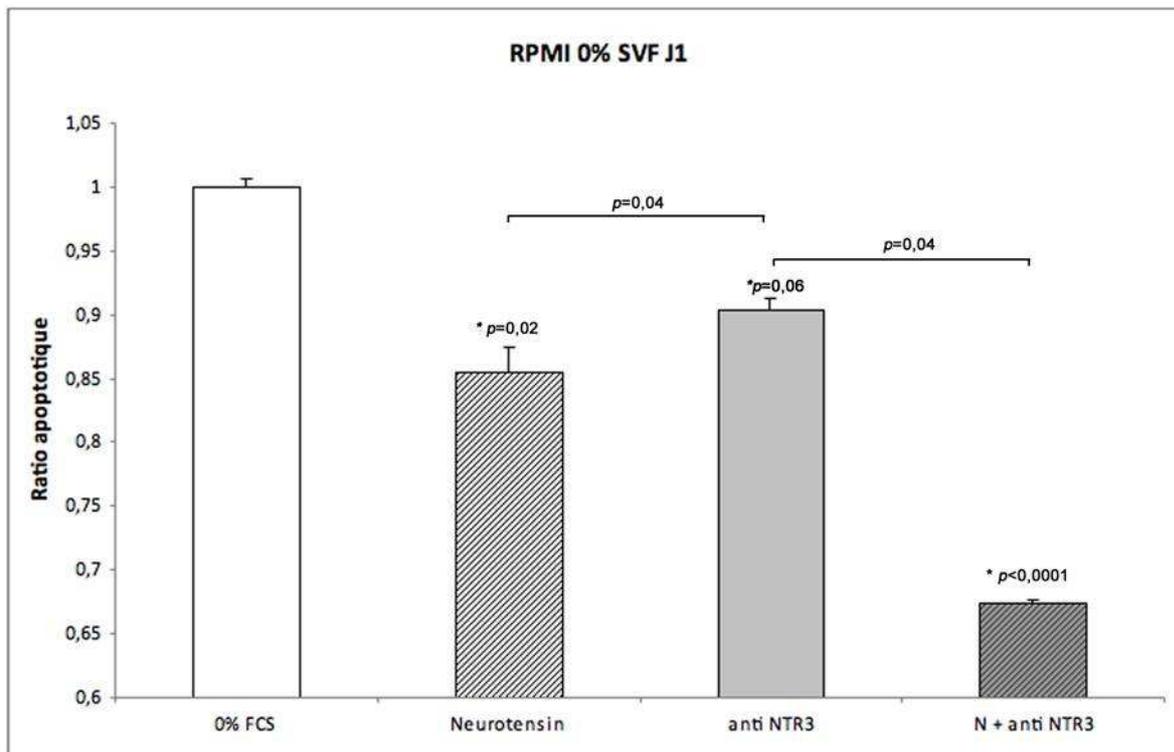


Figure 24: Influence de la neutralisation du récepteur NTSR-3 (anti NTR3) combinée ou non à l'adjonction de neurotensine (40 μ M, N + anti NTR3) sur l'apoptose induite par 24 heures de privation sérique (0% SVF J1) au niveau de la lignée plasmocytaire RPMI.

Les résultats statistiquement représentatifs ($p < 0,05$) concernant les valeurs obtenues par rapport à l'état basal sont indiqués sur le graphique (*). L'ensemble des résultats à été rapporté à la valeur obtenue à l'état basal, arbitrairement définie à 1.

b. Neutralisation de NTSR-1

L'effet sur la modulation de l'apoptose induite par 24 heures de privation sérique du blocage de NTSR-1 par l'adjonction d'anticorps antagoniste (clone BN6, 50 nM) a été étudié avec la lignée RPMI.

Paradoxalement, alors que l'on observe un effet similaire, protecteur, lors de l'adjonction d'anti-NTSR-1 ou de la neurotensine qui diminuent isolément l'apoptose induite par la privation sérique (Figure 25), la combinaison de neurotensine et de l'anti-NTSR-1 est antagoniste sur l'effet protecteur (Figure 25).

L'effet antagoniste observé entre neurotensine et anti-NTSR-1 plaide en faveur de la responsabilité de la fixation de la neurotensine sur ce récepteur dans l'action anti-apoptotique de ce neuropeptide, l'existence d'un effet cellulaire opposé de l'anticorps antagoniste seul est peu compréhensible dans ce contexte.

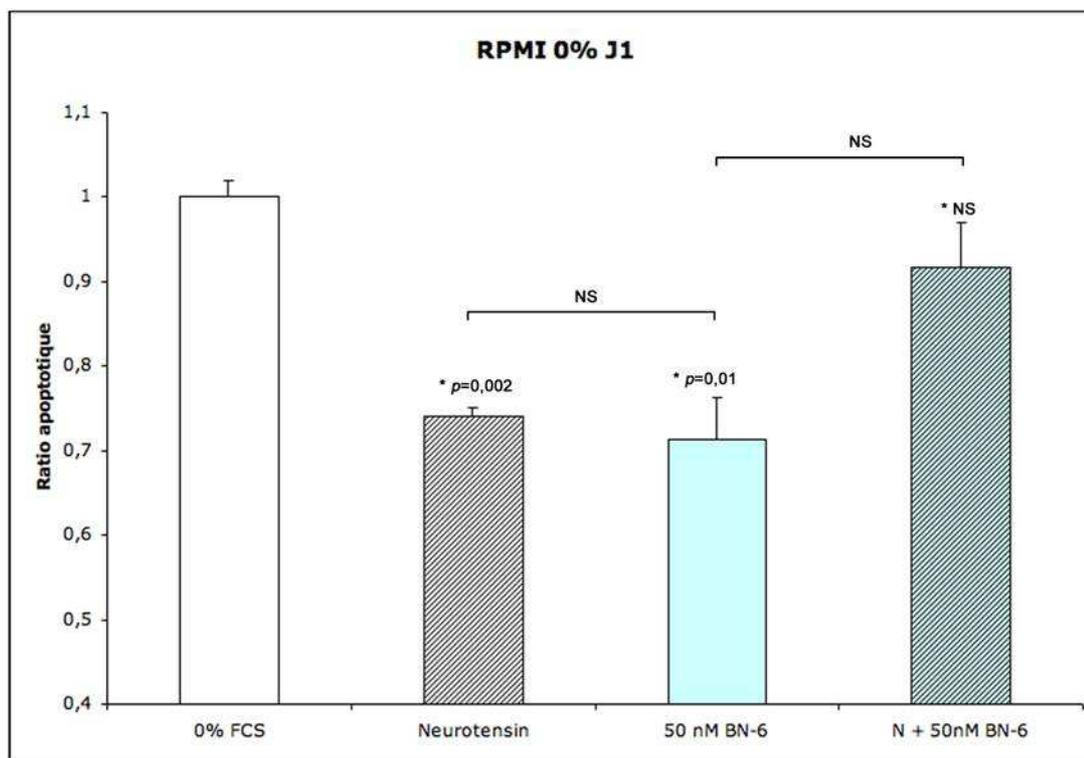


Figure 25: Influence de la neutralisation du récepteur NTSR-1 (50 nM, BN-6) combinée ou non à l'adjonction de neurotensine (40 μ M, N + BN-6) sur l'apoptose induite par 24 heures de privation sérique (0% SVF, J1) au niveau de la lignée plasmocytaire RPMI.

Les résultats concernant les valeurs obtenues par rapport à l'état basal sont indiqués sur le graphique (*). L'ensemble des résultats à été rapporté à la valeur obtenue à l'état basal arbitrairement définie à 1.

c. Neutralisation de NTSR-2

La levocabastine est un inhibiteur pharmacologique de NTSR-2 n'ayant pas, à la lumière de la littérature, d'action sur les autres récepteurs NTSR-1 et -3 aux concentrations utilisées pour les tests fonctionnels [116]. Les effets de cet inhibiteur aux concentrations de 2, 4 et 8 μ M sur la modulation de l'apoptose induite par la privation sérique, en présence ou non de neurotensine exogène (40 μ M) ont été étudiés avec la lignée RPMI.

Aucune action spécifique de l'inhibiteur seul n'a pu être mise en évidence, et ce quelle que soit la concentration utilisée (**Figure 26**). Seule la concentration de 4 μ M semble potentialiser significativement l'effet anti-apoptotique de la neurotensine ($p=0,004$, Figure 26).

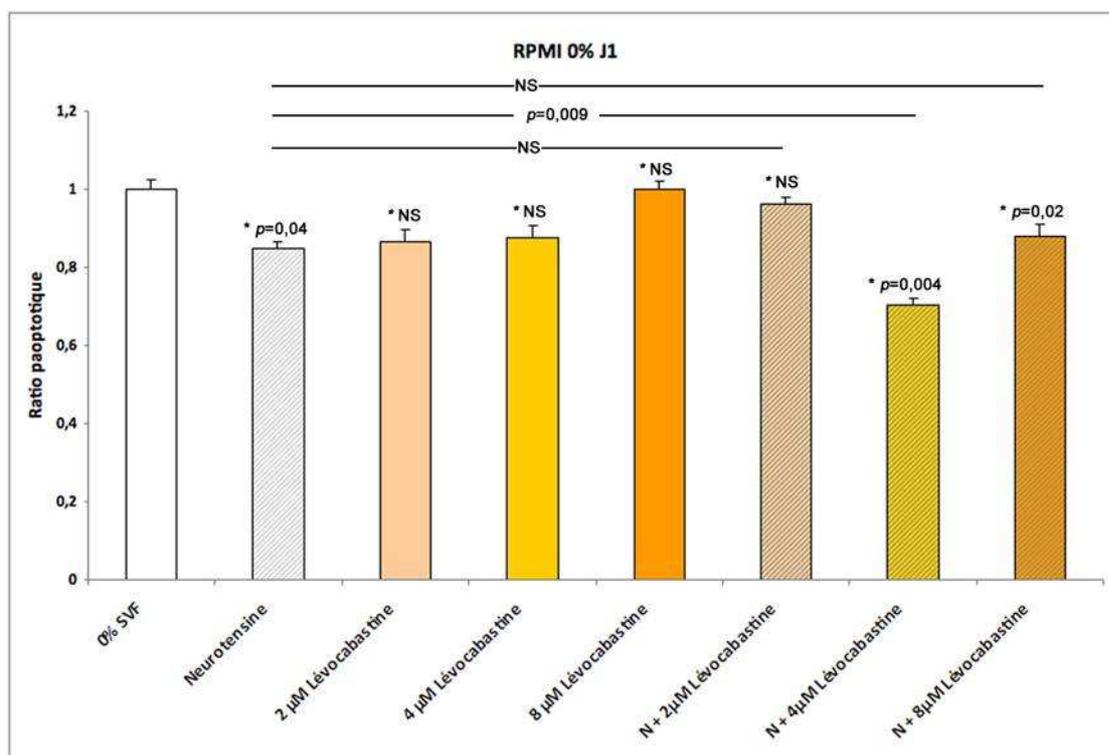


Figure 26: Influence de la neutralisation du récepteur NTSR-2 par des concentrations croissantes de lévocabastine (2, 4 et 8 μM) combinée ou non à l'adjonction de neurotensine (40 μM , N) sur l'apoptose induite par 24 heures de privation sérique (0% SVF, J1) au niveau de la lignée plasmocytaire RPMI.

Les résultats statistiquement représentatifs ($p < 0,05$) concernant les valeurs obtenues par rapport à l'état basal sont indiqués sur le graphique (*). L'ensemble des résultats a été rapporté à la valeur obtenue à l'état basal, arbitrairement définie à 1.

d. Neutralisation conjointe des récepteurs

Nous avons ensuite tenté de bloquer conjointement NTSR-1 et NTSR-2 de même que NTSR-3 et NTSR-2 à l'aide des mêmes Ac et inhibiteurs pharmacologiques que précédemment. Nous observons que l'inhibition conjointe de NTSR-1 et -2 de même que NTSR-2 et -3 permet de diminuer significativement l'apoptose induite par la privation sérique ($p < 0,05$, **Figure 27**). En revanche, l'effet anti-apoptotique de la neurotensine n'est pas modulé par ces inhibitions conjointes (**Figure 27**).

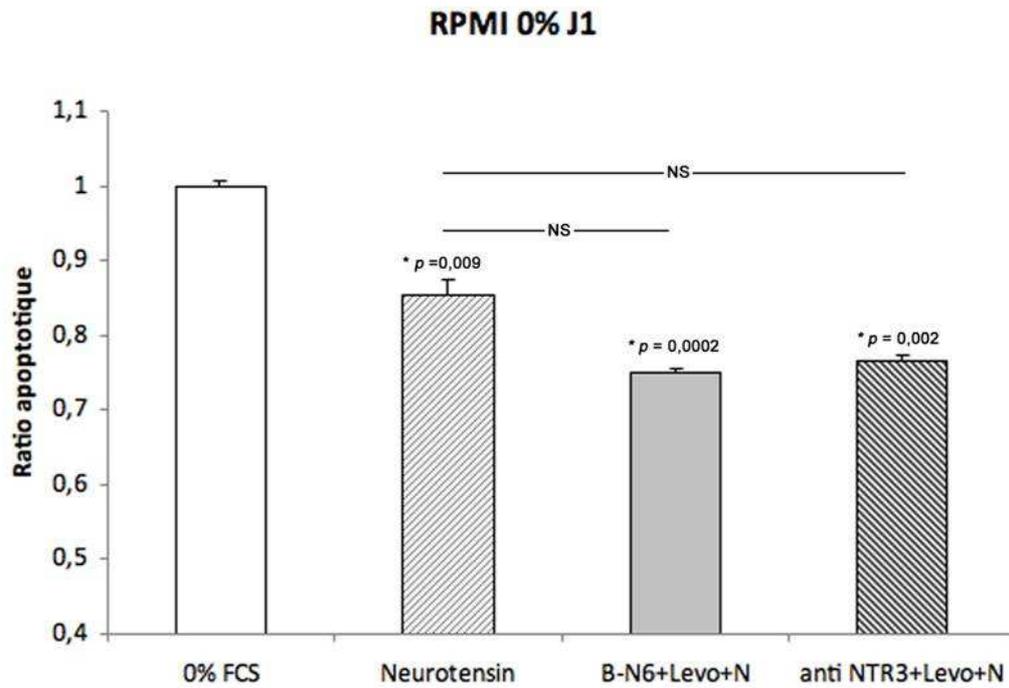


Figure 27: Influence de la neutralisation conjointe des récepteurs NTSR-1 (B-N6), NTSR-2 (levocabastine, levo) et de NTRS-3 (anti-NTR3) combinée ou non à l'adjonction de neurotensine (40 μ M, N) sur l'apoptose induite par 24 heures de privation sérique (0% SVF, J1) au niveau de la lignée plasmocytaire RPMI.

Les résultats statistiquement représentatifs ($p < 0,05$) concernant les valeurs obtenues par rapport à l'état basal sont indiqués sur le graphique (*). L'ensemble des résultats à été rapporté à la valeur obtenue à l'état basal, arbitrairement définie à 1.

III Neurotensine et lymphocytes B humains sains

A. L'expression des différents récepteurs de la neurotensine diffère selon le caractère normal ou tumoral des cellules étudiées

Les données de la littérature concernant la présence de récepteurs à la neurotensine dans les lymphocytes humains normaux sont anciennes, parcellaires et ne concernent que les lymphocytes T qui présenteraient une expression de certains des récepteurs à la neurotensine, non encore identifiés comme étant NTSR-1, -2 ou -3 [179]

Compte tenu des précédents résultats, la présence éventuelle de la neurotensine et de ses différents récepteurs a été recherchée, pour la première fois à notre connaissance, au sein de LB issus de PBMC de témoins volontaires sains.

1. Expression des transcrits

L'analyse par RT-PCR de l'expression des NTSR ainsi que de la neurotensine a été réalisée avec les lymphocytes B circulants de 7 donneurs sains en condition basale (10 % SVF). Cette analyse a permis de mettre en évidence la présence des transcrits des récepteurs NTSR-2 et NTSR-3. Contrairement aux résultats obtenus avec les lignées B matures (**Figure 10 D page 119**), la présence du récepteur de haute affinité NTSR-1 et de la neurotensine n'a pas été détectée, ce qui suggère une implication spécifique dans les processus tumoraux (**Figure 28**).

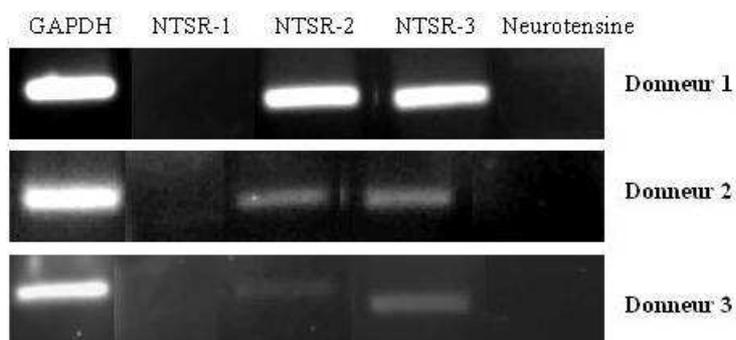


Figure 28: Détection des transcrits codants pour les récepteurs NTSR-1 (200 pb), -2 (240 pb) et -3 (231 pb) et pour la neurotensine (148 pb) au niveau de LB humains circulants issus de 3 donneurs volontaires sains.

Les différents transcrits ont été détectés selon la taille des différents fragments attendus. La GAPDH (145 pb) est utilisée comme contrôle de la réaction.

2. Expression protéique

L'expression du transcrit NTSR-1 n'ayant pas été détectée (**Figure 28**), l'analyse protéique a été étudiée pour les récepteurs NTSR-2 et NTSR-3. L'analyse par western blot a été effectuée avec les LB matures de donneurs sains après stimulation mitogénique par le pokeweed (20 µg/mL). La présence de NTSR-2 et NTSR-3 (**Figure 29**) a été détectée, confirmant ainsi les résultats obtenus par RT-PCR (**Figure 28**).

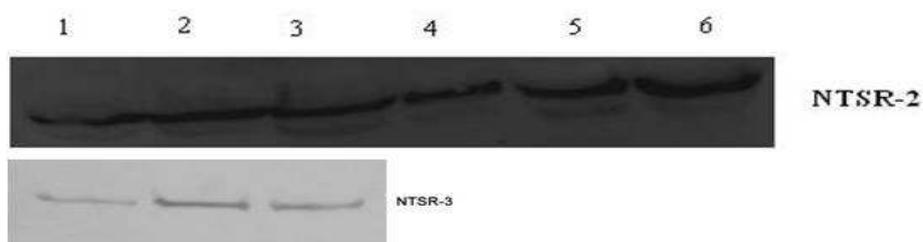


Figure 29: Mise en évidence du récepteur NTSR-2 et de NTSR-3 au niveau de LB humains circulants issus de respectivement, 6 et 3 volontaires sains par la technique de western blot.

NTSR-2 (65 kDa), NTSR-3 (95 kDa) au niveau de 3 à 6 donneurs sains.

De plus, la localisation cellulaire de ces récepteurs a été étudiée par cytométrie en flux (NTSR-3) ou immunofluorescence indirecte à l'aide d'anticorps polyclonaux spécifiques de chacun des récepteurs (**Figure 30**).

L'analyse en immunofluorescence a permis de confirmer la présence du récepteur NTSR-2 au niveau de LB matures et de révéler une polarisation membranaire (Figure 30).

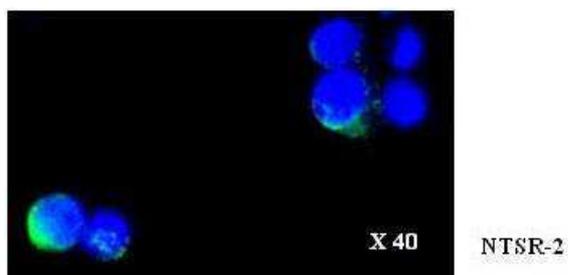


Figure 30: Mise en évidence par immunofluorescence indirecte du récepteur NTSR-2 au niveau de LB humains sains circulants.

La détection a été effectuée à l'aide d'un anticorps polyclonal spécifique couplé à un anticorps secondaire A488. Un contre-marquage au DAPI est effectué pour la localisation nucléaire.

Nous avons également étudié l'expression lymphocytaire B de NTSR-3 par cytométrie en flux chez 16 volontaires sains (**cf partie II**) confirmant la présence intracytoplasmique de la sortiline au sein de $85\pm 13\%$ des lymphocytes B circulants. En revanche, l'expression membranaire de ce récepteur est négligeable, inférieure à 10% des cellules ($6,9\pm 3,6\%$).

Ces résultats suggèrent une expression constitutive des récepteurs NTSR-2 et NTSR-3 dans les LB humains, et une expression restreinte de la neurotensine et de son récepteur de haute affinité NTSR-1, aux processus tumoraux.

Les résultats obtenus ont démontré que l'expression de la neurotensine et ses récepteurs variaient en fonction du profil tumoral ou non tumoral dans les LB humains. Afin de valider cette hypothèse, les mêmes études ont été effectuées sur modèle murin.

B. L'expression de la neurotensine et de ses récepteurs dans les lymphocytes B murins serait également modulée par le caractère tumoral

Une analyse par RT-PCR a été effectuée à partir d'amorces spécifiques des récepteurs et de la neurotensine de souris (Figure 9 **page 89** Figure 9) sur des LB tumoraux et non tumoraux à différents stades de maturation B.

Les récepteurs NTSR-1 et NTSR-3 ont été détectés dans les lignées murines (**Figure 31 A**) quel que soit le stade de maturation B. Ces résultats concordent avec les précédents résultats obtenus pour les lignées B humaines (**Figure 10 page 119**). L'expression du transcrite de la neurotensine n'a été détectée que pour les lignées B matures (CH12) et plasmocytaires (S194 et NS1) (**Figure 31 A**). Toutefois, contrairement aux résultats observés pour les lignées B humaines, le transcrite NTSR-2 n'a pas été détecté quel que soit le stade de maturation lymphocytaire B. L'absence de NTSR-2 dans les lymphocytes murins contraste avec leur présence, détectée par RT-PCR dans le cerveau murin, utilisé comme contrôle (**Figure 31**).

L'analyse de l'expression des différents transcrits chez les souris «Wild Type» a mis en évidence la présence du récepteur NTSR-3 à tous les stades de maturation B (**Figure 31 B**). Compte tenu des résultats obtenus pour les lignées, il semblerait que ce récepteur soit constitutivement exprimé dans les LB murins. Aucune détection de NTSR-2 n'a été observée dans les différents LB murins.

La neurotensine et son récepteur de haute affinité n'ont pas été détectés, comme observé pour les LB matures humains non tumoraux (**Figure 28 page 141**). Ces résultats appuient l'hypothèse d'une implication du couple neurotensine/NTSR-1 dans les processus tumoraux.

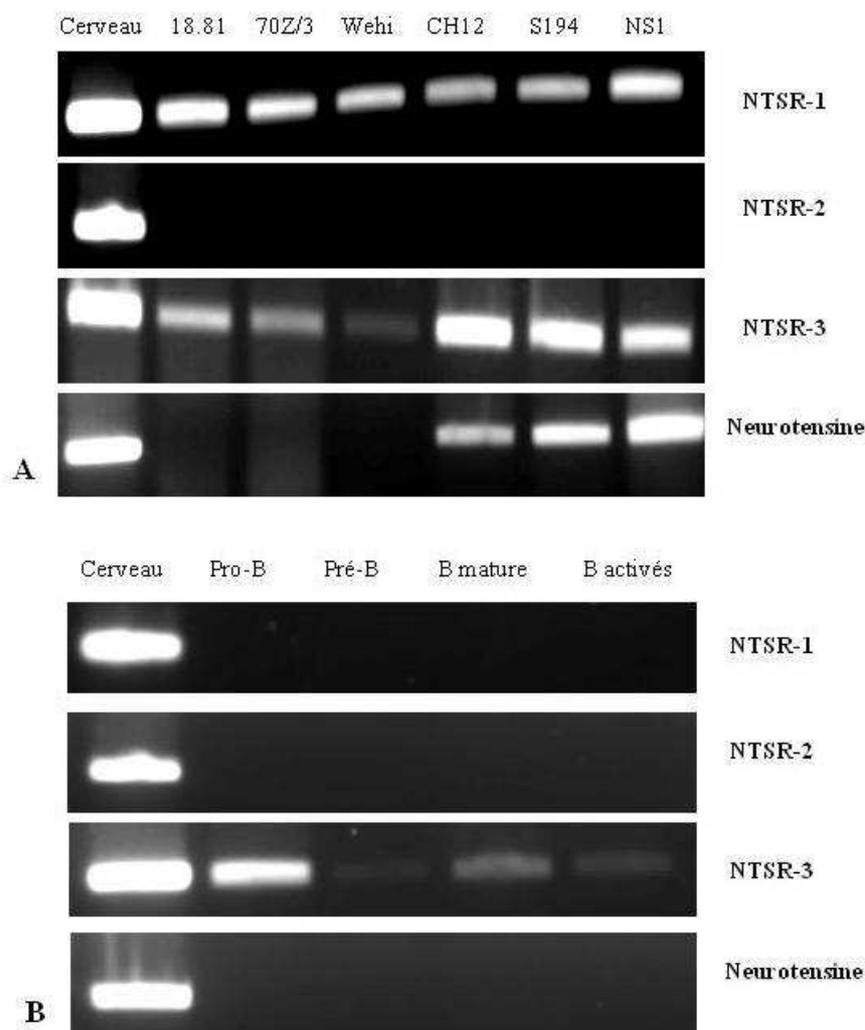


Figure 31: Détection des transcrits codants pour les récepteurs NTSR et pour la neurotensine au niveau de lignées B et de cellules B murines à différents stades de maturation.

Les différents transcrits ont été détectés selon la taille des différents fragments attendus. En A, l'ensemble des transcrits détectés au niveau des différentes lignées B, représentant les différents stades de maturation B. En B, les transcrits détectés des cellules B issues de cellules saines, aux différents stades de maturation. NTSR-1 (120 pb), NTSR-2 (201 pb), NTSR-3 (220 pb), la neurotensine (269 pb), GAPDH (145 pb) comme contrôle de la réaction.

Partie II

I Neurotrophines et Maladies auto-immunes.

A. Neurotrophines et sclérodémie systémique

Les résultats concernant les neurotrophines sériques au cours de la sclérodémie systémique font l'objet d'un manuscrit actuellement sous presse dans PlosOne (**Annexe 6**).

Article 2: Serum neurotrophin profile in systemic sclerosis

Auteurs : Marie-Claude Lise¹, Agnès Sparsa^{1,3}, Isabelle Marie⁵, Fabrice Lalloué¹, Kim Ly², C Martel¹, Holy Bezanahary², Guillaume Gondran², Véronique Loustaud-Ratti², Jean-Marie Bonnetblanc³, Elisabeth Vidal^{1,2}, Marie-Odile Jauberteau^{1,4}, Anne-Laure Fauchais^{1,2}

Les NTs sont capables d'activer les lymphocytes et les fibroblastes. Ils peuvent moduler l'angiogenèse et la fonction vasculaire au niveau sympathique. Ainsi, ces neuropeptides peuvent être impliqués dans les trois processus pathogènes de la sclérodémie systémique (SSc).

L'objectif de cette étude était d'évaluer les taux sanguins de NGF, BDNF et NT-3 dans la SSc et de les corrélés aux données cliniques et biologiques.

La méthodologie suivante a été établie: des échantillons de sérum ont été obtenus à partir de 55 patients et de 32 sujets témoins afin de mesurer le taux de NTs (technique d'ELISA) et de déterminer les relations avec les profils des patients atteints de SSc.

Nous avons observé que les taux sériques de NGF étaient plus élevés chez les patients sclérodermiques ($288,26 \pm 170,34$ pg/mL) que chez les sujets témoins ($170,34 \pm 50,8$ pg/mL, $p < 0,001$) et que ces taux étaient corrélés aux niveaux d'expression des gammaglobulines. Les mêmes conclusions ont été observées concernant la présence des deux anticorps anti-cardiolipine et anti-Scl-70 ($p < 0,05$). En revanche, les taux de BDNF étaient plus faibles chez les patients sclérodermiques que chez les témoins ($1121,9 \pm 158,1$ vs $137,9 \pm 190,9$ pg/mL, $p < 0,0001$), en particulier dans les cas d'hypertension artérielle pulmonaire et de sclérodémie diffuse par rapport à des formes limitées ($p < 0,05$). De plus, les taux de NT-3 ont été similaires entre les patients et les témoins ($2657,2 \pm 2296$ vs $2959,3 \pm 2555$ pg / mL, NS). Nous avons également observés une corrélation négative entre les taux de BDNF et l'augmentation des taux de NGF uniquement dans le groupe SSc.

Cette étude a permis de mettre en évidence une faible expression des taux sériques de BDNF lors de la SSc, en particulier dans les formes diffuses et pour les patients atteints de HTAP ou exprimant les anticorps anti Scl-70, donnée non documentée pour cette pathologie. La corrélation négative observée entre les taux de NGF et de BDNF lors de la SSc suggère que ces NTs pourraient être impliqués dans le dysfonctionnement vasculaire au niveau sympathique.

B. Neurotrophines et lupus érythémateux disséminé

1. Profil clinique des patients atteints de lupus érythémateux disséminé

a. Données cliniques lors de l'inclusion

Vingt-six patients (sexe masculin n=2), d'âge moyen $44 \pm 12,7$ ans, atteints de LED ont été inclus prospectivement. Il est à noter qu'un patient de sexe masculin présentait un LED révélateur d'un syndrome hyper-IgM.

Les différentes atteintes cliniques présentes lors de l'inclusion étaient les suivantes :

- Atteinte cutanée (n=22, 92%)
- Atteinte articulaire (n=21, 88%)
- Atteinte rénale (n=6, 25%)
- Atteinte neurologique (n=2, 8%)
- Vasculite lupique (n=9, 38%).

Le LED s'associait dans 7 cas à un syndrome des anti-phospholipides, purement obstétrical dans un seul cas.

b. Activité systémique

Tous présentaient un LED actif lors de l'inclusion, caractérisé par un score d'activité SLEDAI moyen de $6,76 \pm 4,46$. Pour l'analyse statistique, les patients LED ont été divisés en deux groupes, poussée modérée (SLEDAI < 10) et sévère (SLEDAI > 9, n=6).

c. Maladies auto-immunes associées

Sept patientes (29%) présentaient un SGS secondaire, deux une hépatite auto-immune (8%) et une anémie hémolytique auto-immune (4%) contemporaine de la poussée lupique était associée.

d. Traitements

Dix-neuf (80%) patients étaient sous immunosuppresseurs lors de l'inclusion :

- Traitement par Plaquenil[®] (n=19, 80%)
- Corticothérapie à la dose moyenne de 18±15 mg/j (n=14, 58%)
- Autre immunosuppresseur (n=4, 17%) : Imurel[®] (azathioprine, n=2), Mabthera[®] (rituximab, n=1), Myfortic[®] (mycophenolate mofetil, n=1).

La poussée a donné lieu à une majoration thérapeutique ou à l'introduction d'un nouvel immunosuppresseur dans 17 cas dans les 48 heures suivant le prélèvement; pour les 9 autres patients, le traitement avait déjà été majoré dans les 48 heures précédant le dosage. Les traitements introduits après la poussée étaient les suivants :

- Traitement par Plaquenil[®] (n=5, 21%)
- Corticothérapie à la dose moyenne de 30±15 mg/j (n=4, 58%)
- Autre immunosuppresseur (n=6, 25%) : Imurel[®] (azathioprine, n=1), Mabthera[®] (rituximab, n=2), Endoxan[®] (cyclophosphamide, n=1), colchicine (n=1).

e. Score de qualité de vie et échelle de dépression.

Vingt deux patients ont pu bénéficier d'une évaluation de leur qualité de vie lors de l'inclusion par l'échelle SF36. Cette évaluation a permis de calculer un score global de santé physique (Physical Component Summary ou PCS, moyenne 36,5±6,9) et un score global de santé mentale (Mental Component Summary ou MCS, moyenne 38,6±10,1).

2. Profil biologique des patients atteints de LED

Les caractéristiques biologiques des patients lors de leur inclusion dans l'étude étaient les suivantes. Ainsi, 24 (93%) présentaient une positivité des anticorps anti-nucléaires de spécificité anti-DNA natifs (n=14, 68% ; moyenne 101,2 ± 67,7 U). On notait la présence d'anticorps anti-SSA (n=3, 12%), anti-SSB (n=3, 13%), et anti-Sm (n=1, 4%). Le complément était activé dans 8 cas (33%). Onze patients (46%) présentaient une hypergammaglobulinémie et le taux moyen de gammaglobulines était de 11,2±3,5 g/L.

3. Concentration sériques de NTs, profil Th1, Th2 et hyperactivation B

a. Concentrations sériques de NTs chez les LED et les témoins

Nous avons constaté une élévation des concentrations de NGF sanguin chez les patients ($426,127 \pm 70,85$ pg/mL) comparées à celles des témoins ($373,91 \pm 52,28$ pg/mL, $p=0,003$) (**Figure 32**).

Les concentrations de BDNF sont également augmentées chez les patients, en comparaison des témoins ($598,8 \pm 129,81$ vs $326,1 \pm 60,5$ pg/mL, $p<0,0001$) (**Figure 32**).

Les concentrations de NT-3 sont identiques dans les 2 groupes ($2911,7 \pm 1248,8$ pg/mL vs $2553,7 \pm 879,7$ pg/mL, NS) (**Figure 32**).

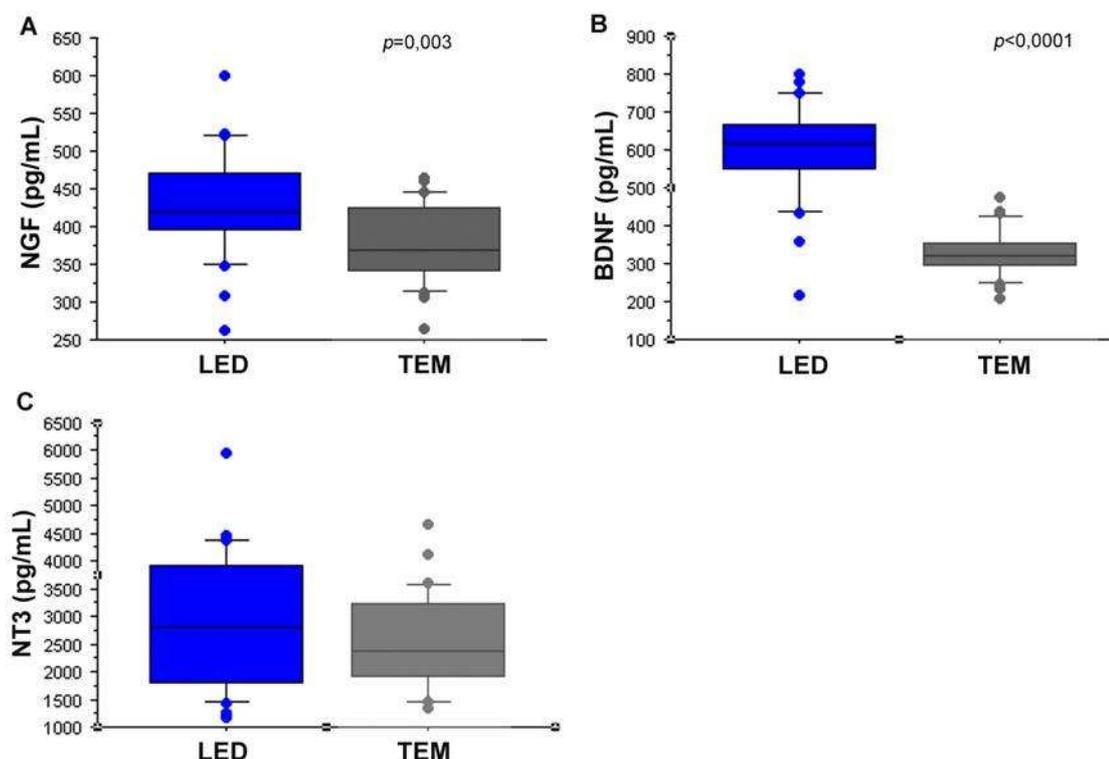


Figure 32: Concentrations sériques de NGF (A), de BDNF (B) et de NT-3 (C) chez les patients atteints de LED (LED, graphes bleus) et les témoins sains (TEM, graphes gris).

Les résultats statistiquement significatifs sont indiqués sur le graphique.

Comme nous l'avons précédemment observé pour les SGSp, et à l'inverse des résultats obtenus dans la ScS, les concentrations sériques de NTs ne sont pas corrélées entre

elles et les variations des taux de NGF s'effectuent indépendamment de celles de BDNF et de NT-3.

b. Concentrations sériques de BAFF, IL10, d'INF γ chez les patients et témoins.

Les concentrations sériques de BAFF sont augmentées chez les patients atteints de LED par rapport aux témoins ($1980,67 \pm 193,85$ vs $1019,9 \pm 193,8$, $p=0,01$). Parallèlement, on observe une augmentation des concentrations sériques d'INF γ chez les lupiques ($131,05 \pm 227,57$ vs $15,3 \pm 35,9$, $p=0,04$). Les concentrations sériques d'IL10 sont également plus élevées chez les lupiques ($29,4 \pm 81,1$ vs $0,19 \pm 33$ pg/mL, $p=0,06$).

Il ne nous a pas été possible d'établir un profil Th17 chez les LED et les témoins, les densités optiques des sérums purs étant en dessous du seuil de détection du kit commercial utilisé.

Les concentrations de NGF, BDNF et NT-3 chez les patients lupiques varient indépendamment du profil Th1 (INF γ), Th2 (IL-10) et des concentrations sériques de BAFF.

c. Concentrations sériques de NTs et activité lupique

Il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les concentrations sériques de NGF chez les patients LED en poussée sévère ($4262,1 \pm 746,3$ pg/mL) comparées à celles des sujets ayant avec une poussée modérée ($4262,1 \pm 626,8$ pg/mL, NS). Les concentrations sériques de BDNF sont également identiques entre les 2 groupes ($612,58 \pm 73,6$ vs $594,6 \pm 143,76$ pg/mL, NS).

En revanche, les concentrations de NT-3 apparaissent uniquement élevées chez les patients atteints de LED sévère ($4171,6 \pm 1013,17$ pg/mL, $p=0,002$, **Figure 33**).

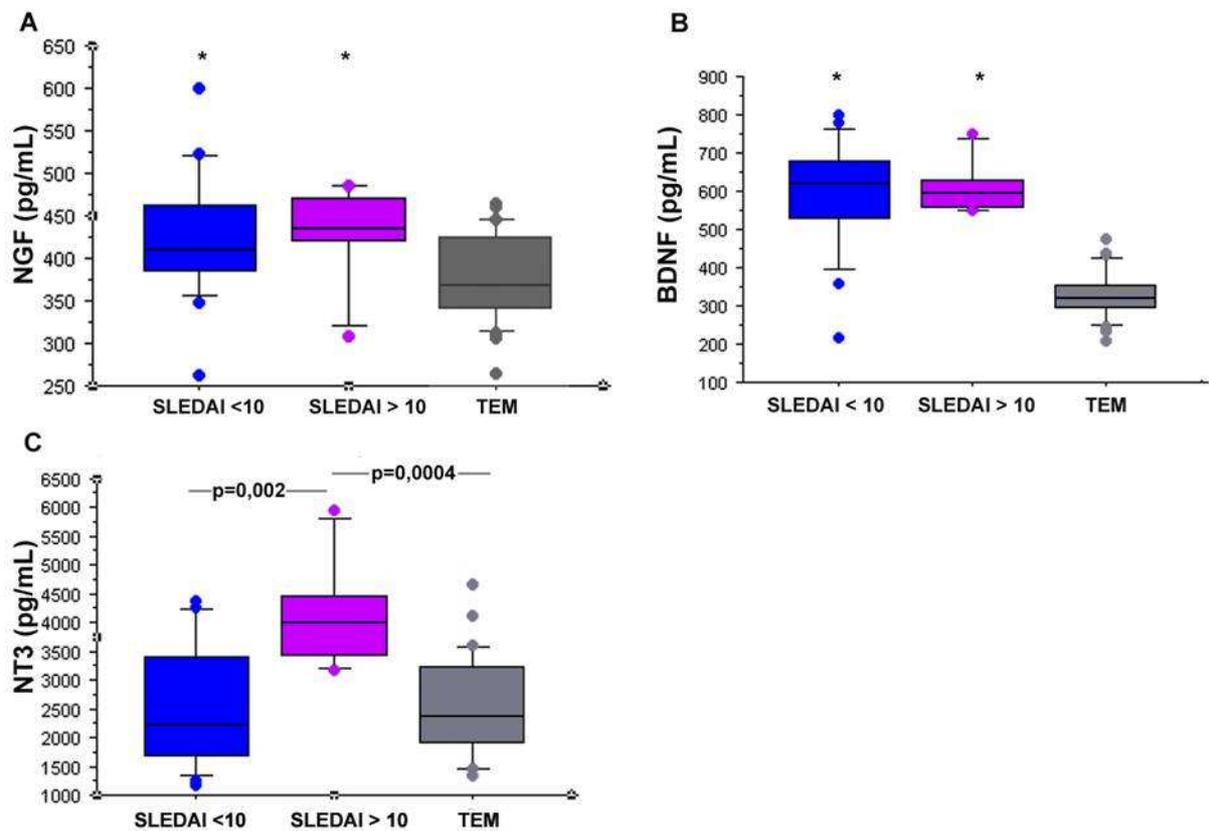


Figure 33: Concentrations sériques de NGF (A), de BDNF (B) et de NT-3 (C) chez les patients atteints de LED présentant une poussée sévère (SLEDAI > 10, graphes roses), modérée (SLEDAI < 10, graphes bleus) et les témoins sains (TEM, graphes gris)

Les résultats statistiquement significatifs par rapport aux témoins sont indiqués sur le graphique (*).

d. Evolution des concentrations sériques de NTs après traitement de la poussée.

Les concentrations de BDNF s'abaissent après la poussée, mais restent significativement augmentées par rapport aux témoins volontaires sains ($p < 0,05$, **Figure 34**).

A l'inverse les concentrations de NGF restent stables avant ($426,127 \pm 70,85$ pg/mL) et après la poussée ($462,6 \pm 470,7$ pg/mL, NS), celles-ci restant élevées par rapport aux témoins ($p = 0,001$).

Les concentrations de NT-3 ne diffèrent pas avant et après traitement de la poussée chez les lupiques.

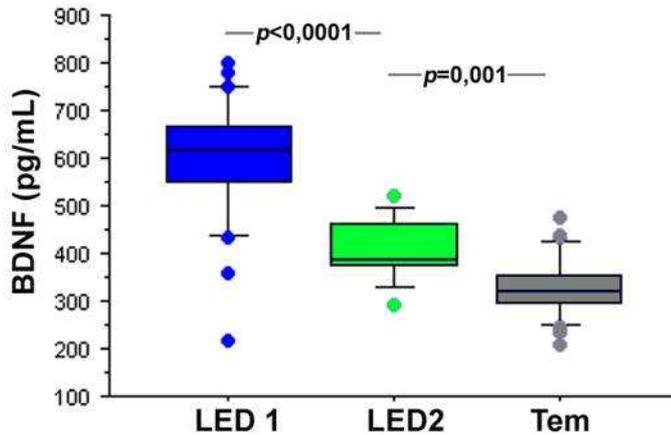


Figure 34: Concentrations sériques de BDNF chez les patients atteints de LED avant (LED1, graphes bleus) et après (LED2, graphes verts) traitement de la poussée par comparaison aux témoins (TEM, graphes gris).

Les résultats statistiquement significatifs sont indiqués sur le graphique.

e. Concentrations sériques de NTS et profil clinique

•NGF, BDNF et profil clinique

Il n'existe aucune différence entre les concentrations sériques de NGF, de BDNF et les différentes atteintes systémiques présentées lors de la poussée.

Il n'existe pas non plus de variation significative des concentrations sériques de NGF, de BDNF avec les scores de l'échelle de qualité de vie SF36.

•NT-3 et profil clinique

Les concentrations de NT-3 sont plus élevées en cas d'atteinte articulaire ($3185,6 \pm 1213,3$ vs $1761,7 \pm 581,22$, $p=0,02$), rejoignant ainsi les résultats obtenus dans la ScS.

f. Concentrations sériques de NTS et profil biologique

•NGF et profil biologique

Il existe une corrélation négative entre l'augmentation des concentrations de NGF et le nombre de Treg ($r=-0,48$, $p=0,001$, **Figure 35**)

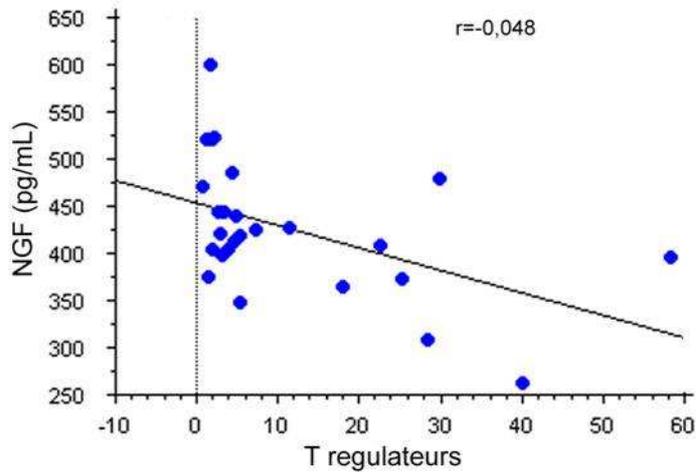


Figure 35: Corrélation entre les concentrations sériques de NGF et les T régulateurs circulants (évaluation cytométrique CD25++, FoxP3+)

R définit le coefficient de détermination donné par l'analyse de la table de variance. Chaque point représente un patient.

•BDNF et profil biologique

On met en évidence une diminution des concentrations sériques de BDNF en cas de présence d'anti-β2GP1 ($438,7 \pm 185,4$ vs $627,9 \pm 96,86$ pg/mL, $p=0,004$), d'anti-cardiolipides ($r=0,2$, $p=0,04$, **Figure 36**) ou d'anti-coagulants circulants ($529,1 \pm 142,9$ vs $635,7 \pm 109,2$ pg/mL, $p=0,04$).

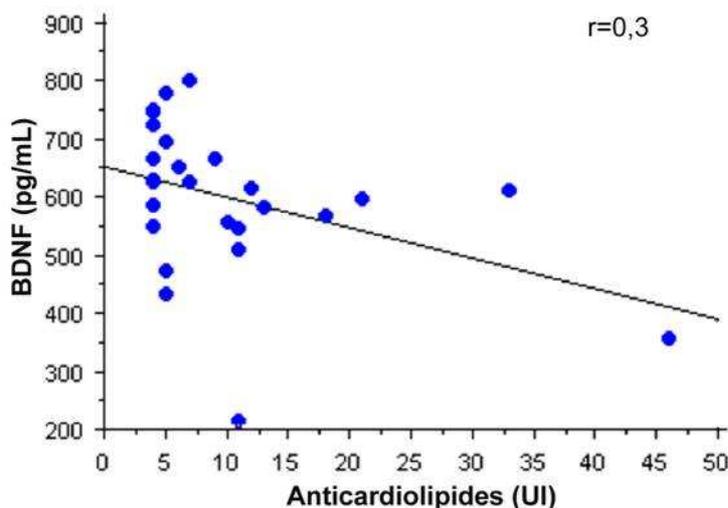


Figure 36. Corrélation entre les concentrations sériques de BDNF et l'existence d'anticorps anti-cardiolipides

R définit le coefficient de détermination donné par l'analyse de la table de variance. Chaque point représente un patient.

Ainsi, ces résultats confirment que l'existence d'un stress oxydatif vasculaire reflété par la présence d'anti-phospholipides peut abaisser les concentrations circulantes de BDNF, données que nous avons déjà observées au cours de la SCS.

•NT-3 et profil biologique

Le lien entre NT-3 et activité lupique, observé au niveau du score de SLEDAI, est renforcé par l'existence d'une augmentation des concentrations de cette NT avec l'existence d'une activation du complément ($3749,1 \pm 1433,25$ vs $2457,9 \pm 950,67$, $p=0,01$), une corrélation inverse étant parallèlement notée entre l'élévation des concentrations sériques de NT-3 et la diminution du CH50 ($p=0,003$, $r=0,57$, **Figure 37**).

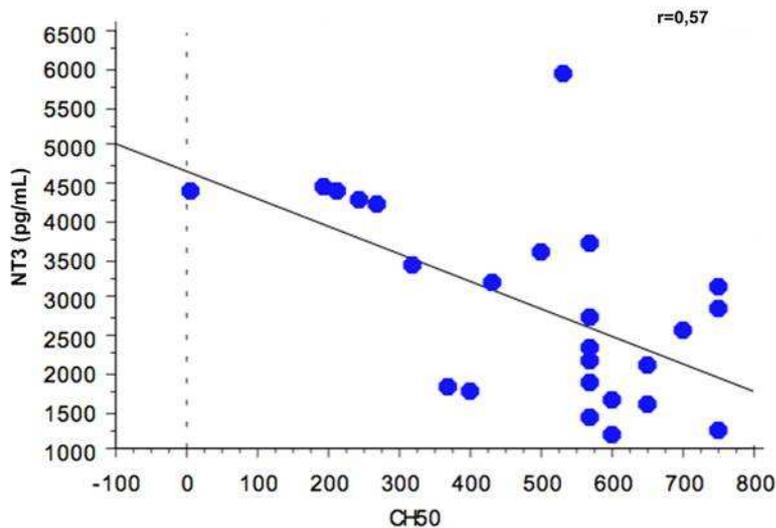


Figure 37. Corrélation entre les concentrations sériques de NT-3 et les concentrations de CH50

R définit le coefficient de détermination donnée par l'analyse de la table de variance. Chaque point représente un patient.

4. Résultats de la cytométrie de flux

Les Lymphocytes T régulateurs :

Selon la même méthodologie employée pour le projet NeuroSGS, les nTreg ont été sélectionnés parmi les LT CD4+ exprimant à un haut niveau CD25 et FoxP3. La comparaison

du pourcentage de nTreg entre les patients et les volontaires sains n'a pas permis de montrer de différence significative en analyse univariée.

5. Comparaison entre LED et témoins volontaires sains

a. Expression des récepteurs aux neurotrophines

Nous n'avons pas observé de différence statistiquement significative entre l'expression lymphocytaire B et T des récepteurs aux NTs entre les LED et les témoins (**Tableau IV**).

Tableau IV: Expression des NTs et de leurs récepteurs au niveau lymphocytaire T et B

			LED	Témoins	P	
CD19	% Membranaire	TrkA	67,7 ± 35,7	70,2 ± 40,3	NS	
		TrkB	78,5 ± 28,6	77,9 ± 32,1	NS	
		TrkC	63,7 ± 40,6	54,7 ± 38,1	NS	
		p75	54,9 ± 39,1	59,6 ± 33,8	NS	
	% IC	NGF	29,3 ± 31,3	14,7 ± 27,2	0,06	
		BDNF	71,3 ± 30,9	67,4 ± 34,7	NS	
		NT-3	72,3 ± 29,7	63,3 ± 29,4	NS	
	IMF IC	NGF	4,8 ± 4,1	4,3 ± 3,8	NS	
		BDNF	9,2 ± 10,7	7,1 ± 5,1	NS	
		NT-3	6,5 ± 3,8	5,5 ± 4,3	NS	
	CD3	% Membranaire	TrkA	49,1 ± 40,6	44,3 ± 35,1	NS
			TrkB	58,8 ± 40,7	52,8 ± 40,3	NS
TrkC			44,7 ± 39,5	31,1 ± 34,9	NS	
p75			30,5 ± 39,7	21,2 ± 25,2	NS	
% IC		NGF	17,2 ± 21,2	9,5 ± 20,9	NS	
		BDNF	55,1 ± 33,5	52,9 ± 32,9	NS	
		NT-3	57,5 ± 33,6	52,2 ± 23,9	NS	
IMF IC		NGF	3,5 ± 1,4	4,9 ± 5,7	NS	
		BDNF	8,2 ± 7,2	10,9 ± 15,6	NS	
		NT-3	6,8 ± 6,0	5,8 ± 4,1	NS	

6. Expression des neurotrophines

L'expression du NGF est augmentée chez les patients lupiques au niveau lymphocytaire B, les expressions des autres NTs étant similaire entre les deux groupes (**Tableau IV**).

7. Expression lymphocytaires des NTs et de leurs récepteurs et activité.

Les patients présentant une poussée sévère (SLEDAI > 10) présentent une expression lymphocytaire T de TrkB plus importante ($87,5 \pm 21,8$) par rapport aux témoins ($52,8 \pm 40,3$, $p=0,05$) mais également aux LED avec une poussée plus modérée ($49,7 \pm 41,8$, $p=0,04$).

Ces patients avec une poussée sévère se caractérisent également par une tendance à l'augmentation de la production de NGF au niveau lymphocytaire B ($37,7 \pm 31,9$ vs $26,7 \pm 31,5$, $p=0,08$). Les mêmes résultats sont observés pour la production lymphocytaire T de BDNF ($13,9 \pm 12,8$ vs $6,99 \pm 5,14$, $p=0,08$).

8. Expression lymphocytaires des NTs et de leurs récepteurs et profil clinico-biologique.

a. Expression lymphocytaire et profil clinique

** Atteintes systémiques*

L'expression lymphocytaire B de TrkB ($83,24 \pm 23,4$ vs $49,5 \pm 41,6$, $p=0,03$) et de p75^{NTR} ($63,1 \pm 37,1$ vs $12,3 \pm 14,2$, $p=0,01$) ainsi que l'expression lymphocytaire T de TrkC ($90,8 \pm 30,4$ vs $38,4 \pm 37,9$, $p=0,03$) augmentent en cas d'atteinte cutanée évolutive lors de la poussée. L'expression lymphocytaire B de TrkC croit également avec l'existence d'un phénomène de Raynaud ($84,1 \pm 25,3$ vs $43,6 \pm 43,6$, $p=0,008$). A l'inverse, l'expression membranaire de TrkC diminue avec l'existence d'une atteinte articulaire ($56,4 \pm 41,7$ vs $94,8 \pm 10,5$, $p=0,05$).

La synthèse lymphocytaire B de BDNF est augmentée en cas d'atteinte cutané-articulaire ($15,7 \pm 5,3$ vs $6,1 \pm 1,5$, $p=0,03$).

** Traitement*

L'expression lymphocytaire B de TrkA augmente sous hydroxychloroquine ($74,9 \pm 29,9$ vs $39,1 \pm 45,9$, $p=0,04$) alors que l'expression lymphocytaire T de NT-3 diminue ($35,7 \pm 39,3$ vs $73,2 \pm 25,4$, $p=0,04$).

b. Expression lymphocytaire et profil biologique

** Expression lymphocytaire et données de la NFS*

On retrouve une corrélation positive entre l'expression lymphocytaire B de TrkC et la leucocytose ($r=0,49$, $p=0,02$), et plus particulièrement des polynucléaires neutrophiles ($r=0,45$, $p=0,02$). Une corrélation similaire est mise en évidence concernant l'expression lymphocytaire T de TrkC ($r=0,51$, $p=0,04$)

** Expression lymphocytaire et paramètres d'activation lupique*

On observe une tendance à l'augmentation de l'expression lymphocytaire T de TrkB en cas d'activation du complément ($77,8 \pm 35,69$ vs $48,1 \pm 41,5$, $p=0,08$).

Il existe une augmentation de la production lymphocytaire B de NGF chez les patients présentant une cryoglobuline (IMF $8,77 \pm 4,4$ vs $4,1 \pm 2,7$, $p=0,06$) ou une activation du complément ($7,1 \pm 2,16$ vs $3,5 \pm 1,8$, $p=0,05$). Une corrélation similaire concernant le nombre de cellules lymphocytaires B produisant du NGF et le ratio d'anti-DNA natif ($r=0,36$, $p=0,05$) ou la diminution du CH50 ($r=-0,51$, $p=0,008$) est également notée.

Il existe aussi une augmentation de la production lymphocytaire T de NT-3 chez les patients présentant une cryoglobuline ($96,4 \pm 0,86$ vs $51,6 \pm 32,9$, $p=0,03$).

** Expression lymphocytaire et anti-phospholipides*

Il existe une augmentation de la production lymphocytaire B de NGF chez les patients présentant des anticorps anti-phospholipides (% $47,7 \pm 32,9$ vs $19,51 \pm 26,4$, $p=0,02$).

On retrouve également une augmentation de la production lymphocytaire T de BDNF chez les patients présentant des anticorps anti- β 2GP1 ($93,8 \pm 5,3$ vs $48,1 \pm 31,5$, $p=0,008$).

* Expression lymphocytaire et hyperactivation B

L'expression lymphocytaire B de p75^{NTR} ($r=0,52$, $p=0,009$, Fig 42) de même que l'expression lymphocytaire T de TrkA ($r=0,48$, $p=0,009$, Fig 42), de TrkC ($r=0,41$, $p=0,04$) et de p75^{NTR} ($r=0,45$, $p=0,04$) sont corrélées positivement à l'augmentation des concentrations sériques de BAFF (**Figure 38**)

* Expression lymphocytaire et profil Th1/Th2

L'expression lymphocytaire T de NT-3 est corrélée positivement aux concentrations sériques d'IFN ($r=0,43$, $p=0,03$).

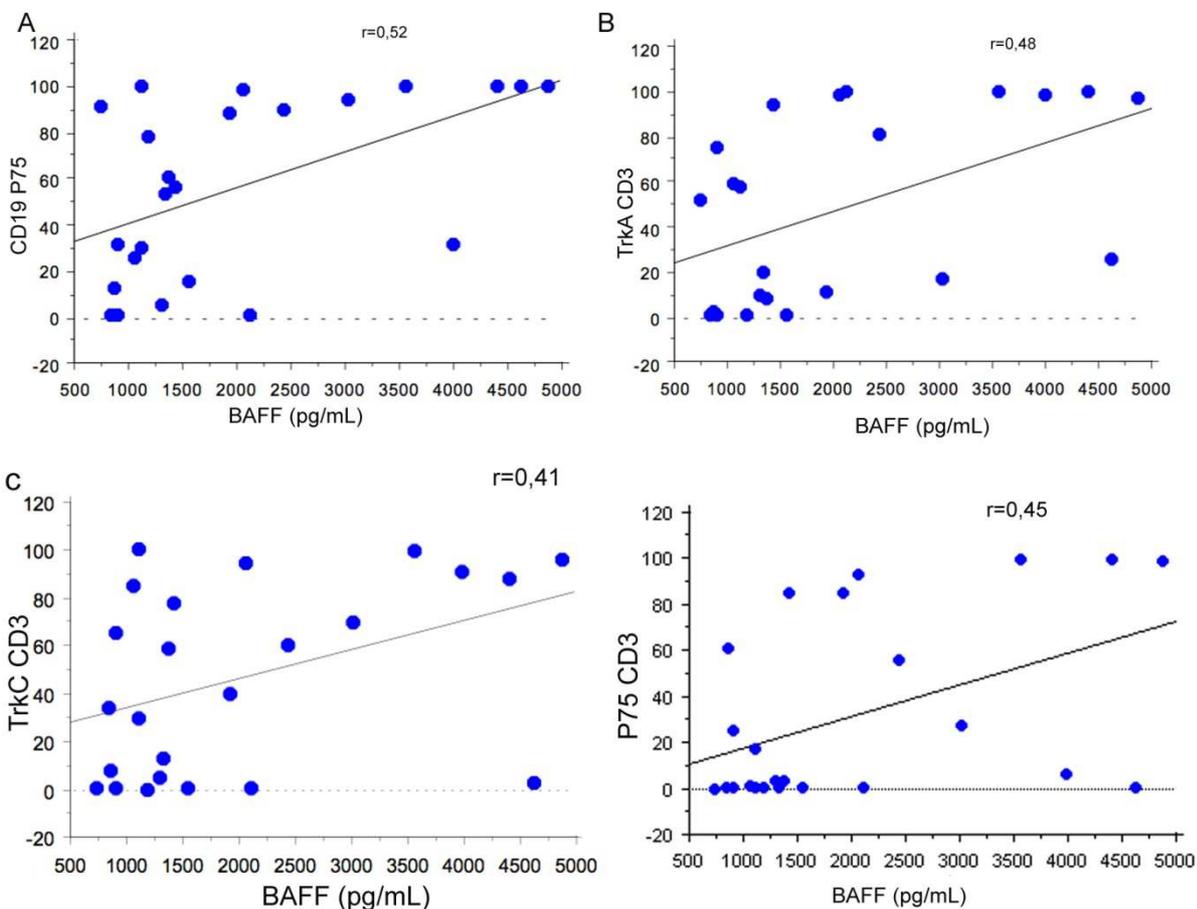


Figure 38: Corrélation entre les concentrations sériques de BAFF et l'expression lymphocytaire B de p75^{NTR} (A) et T de TrkA (B), de TrkC (C) et p75^{NTR} (D)

R définit le coefficient de détermination donnée par l'analyse de la table de variance. Chaque point représente un patient.

Il n'existe en revanche, aucune corrélation entre l'expression lymphocytaire des NTs et de leurs récepteurs et l'hypergammaglobulinémie.

9. Corrélations concernant l'expression des NTs et de leurs récepteurs.

Il existe plusieurs corrélations positives entre les récepteurs Trk aussi bien sur les LB que sur les LT chez les volontaires sains, mais celles ci sont moins nombreuses que pour les patients LED et ne concernent pas l'expression lymphocytaire des NTs. (Figure 39).

Temoins	% TRK A CD19	% TRK B CD19	% TRK C CD19	% P75 CD19	X NGF CD19	X BDNF CD19	X NT3 CD19	% NGF CD19	% BDNF CD19	% NT3 CD19	% TRK A CD3	% TRK B CD3	% TRK C CD3	% P75 CD3	X NGF CD3	X BDNF CD3	X NT3 CD3	% NGF CD3	% BDNF CD3	% NT3 CD3	
% TRK A CD19		r=0,69, p<0,001	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	r=0,5, p=0,01	NS	NS	r=0,61, p=0,001	NS	NS	NS	r=-0,43, p=0,03	NS	NS	
% TRK B CD19			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	r=0,69, p<0,001	NS	r=0,47, p=0,02	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
% TRK C CD19				r=0,47, p=0,01	NS	NS	NS	NS	NS	NS	r=0,47, p=0,02	NS	r=0,78, p<0,001	r=0,47, p=0,02	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
% P75 CD19					NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	r=0,49, p=0,01	r=0,51, p=0,007	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
X NGF CD19						NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
X BDNF CD19							NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
X NT3 CD19								NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
% NGF CD19									NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
% BDNF CD19										NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
% NT3 CD19											NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
% TRK A CD3											r=0,4, p=0,04	r=0,61, p=0,001	r=0,5, p=0,01	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
% TRK B CD3													NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
% TRK C CD3														NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
% P75 CD3															NS	NS	NS	NS	NS	NS	
X NGF CD3																NS	NS	NS	NS	NS	
X BDNF CD3																	NS	NS	NS	NS	
X NT3 CD3																		NS	NS	NS	
% NGF CD3																			NS	r=0,51, p=0,009	
% BDNF CD3																					NS
% NT3 CD3																					
LED	% TRK A CD19	% TRK B CD19	% TRK C CD19	% P75 CD19	X NGF CD19	X BDNF CD19	X NT3 CD19	% NGF CD19	% BDNF CD19	% NT3 CD19	% TRK A CD3	% TRK B CD3	% TRK C CD3	% P75 CD3	X NGF CD3	X BDNF CD3	X NT3 CD3	% NGF CD3	% BDNF CD3	% NT3 CD3	
% TRK A CD19		r=0,47, p<0,001	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	r=0,50, p=0,01	NS	NS	r=0,61, p=0,001	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
% TRK B CD19			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	r=0,69, p<0,001	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
% TRK C CD19				r=0,47, p=0,02	NS	NS	NS	NS	NS	NS	r=0,47, p=0,02	NS	r=0,78, p<0,001	r=0,48, p=0,01	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
% P75 CD19					NS	NS	NS	NS	NS	r=0,47, p=0,02	NS	NS	r=0,49, p=0,01	r=0,52, p<0,001	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
X NGF CD19						NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	r=0,52, p=0,05	NS	r=0,46, p=0,01	NS	NS	NS	NS	
X BDNF CD19							NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
X NT3 CD19								NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
% NGF CD19									NS	NS	NS	NS	NS	NS	r=0,47, p=0,03	r=0,6, p<0,001	NS	NS	NS	NS	
% BDNF CD19										NS	NS	NS	NS	r=0,57, p<0,001	NS	r=0,64, p<0,001	r=0,62, p<0,001	NS	NS	r=0,53, p<0,001	
% NT3 CD19											NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
% TRK A CD3												r=0,41, p=0,04	r=0,63, p<0,001	r=0,51, p=0,01	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
% TRK B CD3													NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
% TRK C CD3														r=0,57, p<0,001	NS	NS	r=0,51, p=0,03	NS	NS	NS	
% P75 CD3															NS	NS	NS	NS	NS	NS	
X NGF CD3																NS	NS	NS	NS	NS	
X BDNF CD3																	NS	NS	NS	NS	
X NT3 CD3																		NS	NS	NS	
% NGF CD3																			NS	NS	
% BDNF CD3																				NS	
% NT3 CD3																					NS

Figure 39 : Récapitulatif des corrélations entre patients et témoins

(les corrélations positives sont indiquées en bleu et les négatives en rouge)

C. Neurotrophines et syndrome de Sjögren primitif

1. Profil clinique des patients atteints de SGSp

a. Données cliniques lors de l'inclusion

Vingt-quatre patients (sexe masculin n=4), d'âge moyen $56,8 \pm 14,7$ ans, atteints de SGSp ont été inclus prospectivement. Quatre-vingt quinze pour cent (n=23) présentaient un syndrome sec buccal subjectif et 19 (79%) un syndrome sec oculaire subjectif. Trois (12%) souffraient de parotidomégalies à répétition.

Dix-huit (75%) présentaient des atteintes systémiques du SGSp :

- Phénomène de Raynaud (n=13)
- Vascularite cutanée (n=1)
- Atteinte articulaire (n=11)
- Atteinte rénale (n=2)
- Atteinte musculaire (n=6)
- Atteinte hématologique (n=4)
- Atteinte pulmonaire (n=4)
- Atteinte neurologique (n=2)

b. Activité systémique et séquelles antérieures

Nous avons défini deux sous-groupes de patients pour l'analyse statistique : ceux avec une atteinte exclusivement glandulaire (pAG) (n=6) et ceux avec au moins une atteinte systémique (pAS).

Lors de l'inclusion, les patients SGSp présentaient un score d'activité (SJODAI) moyen de $2,7 \pm 3,1$ (0-14) et d'évaluation des séquelles (SJSDDI, Sjögren's Syndrome Disease Damage Index, échelle comprise entre 0 et 6) de $2,3 \pm 1,7$ (**Annexes 3-4**).

c. Maladies auto-immunes associées

Un patient était atteint de fibromyalgie (4%), 5 (20%) de thyroïdites d'Hachimoto et 3 (12%) d'hépatopathies auto-immune.

d. Traitements

Le syndrome sec orculo-buccal bénéficiait des traitements suivants:

- Utilisation de larmes artificielles (n=22, 92%)
- Utilisation de substitut salivaire (n=8, 33%)
- Utilisation de sécrétagogues (n=11, 46%).

Onze (45%) patients étaient sous immunosuppresseurs lors de l'inclusion :

- Traitement par Plaquénil (n=4, 17%)
- Corticothérapie > 10 mg (n=6, 25%)
- Autre immunosuppresseur (n=6, 25%) : Imurel (n=2), Mabthera (n=1), Méthotrexate (n=1), Salazopyrine (n=1), Arava (n=1), immunoglobulines intraveineuses (n=1).
- Antalgique de palier I ou II (n=10, 42%).

e. Score de qualité de vie et échelle de dépression.

Seize patients ont pu bénéficier d'une évaluation de leur qualité de vie lors de l'inclusion par l'échelle SF36. Cette évaluation a permis de calculer un score global de santé physique (Physical Component Summary ou PCS, moyenne $38,5 \pm 9,5$) et un score global de santé mentale (Mental Component Summary ou MCS, moyenne $40,5 \pm 9,7$).

L'échelle de dépression MADRS (Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale) a pu être appliquée chez 21 patients retrouvant un score moyen de $12,7 \pm 10,1$. Ainsi 18 ne présentaient aucun trait dépressif (MADRS < 21) et 3 pouvaient être considérés comme à risque de dépression sur la base de cette unique échelle.

2. Profil biologique des patients atteints de SGSp

Les caractéristiques biologiques des patients lors de leur inclusion dans l'étude étaient les suivantes. Vingt (84%) présentaient une positivité des anticorps anti-nucléaires de spécificité anti-SSA (n=13, 54%) et anti-SSB (n=7, 29%). Une activité anti-DNA natif était mise en évidence chez 3 patients en l'absence de critère clinique de lupus. Un patient présentait des anti-cardiolipides et une cryoglobuline de type 2. Huit patients (33%) présentaient une hypergammaglobulinémie et le taux moyen de gammaglobulines était de $11,7 \pm 5,6$ g/L.

3. Concentration sériques de NTs

a. Analyse des concentrations sériques de NTs chez les SGSp et les témoins

Nous avons constaté une élévation des concentrations de NGF sanguin chez les patients ($2460,8 \pm 827,3$ pg/mL) comparée aux témoins ($2460,1 \pm 757,5$ pg/mL, $p=0,002$), alors qu'à l'inverse les concentrations de NT3 tendent à être diminuées ($325,3 \pm 281,5$ pg/mL vs $594,7 \pm 202,4$ pg/mL, NS).

Les concentrations de BDNF sont identiques dans les 2 groupes ($185,1 \pm 31,6$ pg/mL vs $186,4 \pm 46,8$ pg/mL, NS) (**Figure 40**). Les hommes ont des taux sériques de NT-3 significativement moins élevés que les femmes ($75,0 \pm 39,6$ pg/mL vs $377,9 \pm 282,3$ pg/mL, $p=0,048$).

	NGF		BDNF		NT3	
	Sang (pg/mL)	Salive (pg/mL)	Sang (pg/mL)	Salive (pg/mL)	Sang (pg/mL)	Salive (pg/mL)
Patients	$3189,8 \pm 827,3$	$185,0 \pm 100,5$	$185,1 \pm 31,6$	0	$325,3 \pm 282,5$	$40,1 \pm 67,4$
Volontaires sains	$2460,9 \pm 757,5$		$186,4 \pm 46,9$		$594,7 \pm 834,3$	

Figure 40 : Taux sériques et salivaires de NGF, BDNF et NT3

Les concentrations sériques de NTs ne sont pas corrélées entre elles et les variations des taux de NGF s'effectuent indépendamment de celles de BDNF et de NT3.

b. Concentrations sériques de NGF et profil clinico-biologique

Les concentrations sériques de NGF ne sont pas corrélées à la qualité de vie ou aux traits dépressifs exprimés.

Comme nous l'avons vu auparavant, les taux sanguins de NGF sont augmentés chez les patients et tout particulièrement chez les pAS qui sont la sous-population avec les taux les plus élevés ($3218,5 \pm 882,0$ pg/mL vs $2464,4 \pm 803,3$ pg/mL, $p=0,0393$). Il n'y a pas de différences significatives entre les deux sous-groupes de patients concernant les taux sanguins de NGF, BDNF et NT3.

Les concentrations sériques de NGF sont sensiblement plus élevées chez les patients avec hépatopathies auto-immunes ($3982,8 \pm 1543,7$ vs $3072,9 \pm 679,6$ pg/mL, $p=0,07$)

Il existe une corrélation négative entre NGF sanguin et taux d'hémoglobine ($p=0,0491$ $r^2=0,180$) alors que cette corrélation est positive avec la numération plaquettaire ($p=0,0117$ $r^2=0,278$) (Figure 41).

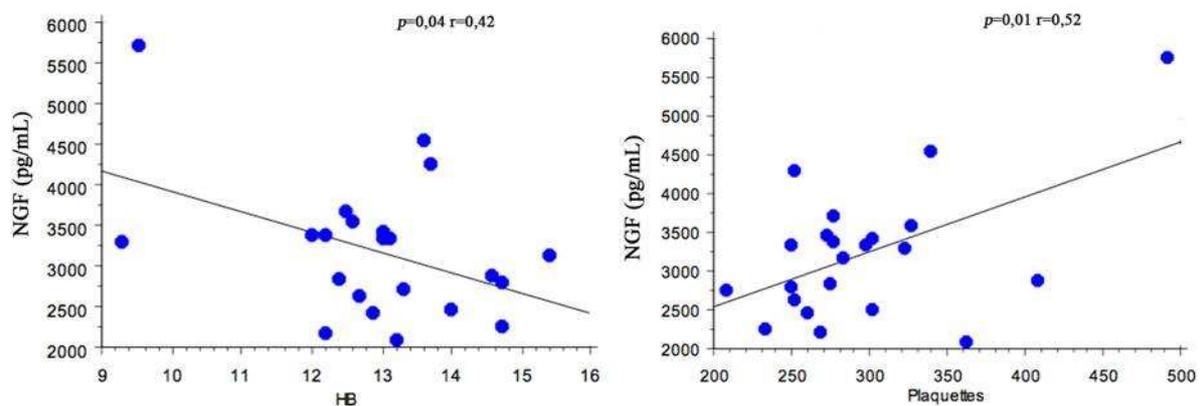


Figure 41. Corrélation entre les concentrations sériques de NGF et hémoglobine (à gauche) et numération plaquettaire (à droite).

R définit le coefficient de détermination donnée par l'analyse de la table de variance. Chaque point représente un patient.

Nos résultats montrent également une association entre taux sériques diminués de NGF et présence d'anticorps anti-nucléaires ($3002,6 \pm 571,6$ pg/mL vs $5140,7 \pm 840,4$ pg/mL, $p<0,0001$), les 2 patients séronégatifs se caractérisant par l'existence d'une parotidomégalie lors de l'inclusion.

Aucune corrélation entre les différents paramètres cytométriques et les concentrations sériques de NGF n'a pu être mise en évidence.

Nous avons pu montrer une association entre prise d'un traitement antalgique et taux sériques plus faibles de NGF ($2782,6 \pm 576,6$ pg/mL vs $3542,3 \pm 908,9$ pg/mL, $p=0,035$).

De plus la présence d'une atteinte articulaire antérieure à l'inclusion a également tendance à être corrélée à des concentrations sanguines diminuées de NGF ($2991,7 \pm 618,7$ pg/mL vs $3744,6 \pm 1184,1$ pg/mL, $p=0,0629$).

c. Concentrations sériques de BDNF et profil clinico-biologique

Concernant le BDNF, il existe une corrélation positive entre les taux sériques de BDNF et le SF36 ($p=0,0350$ $r^2=0,280$) alors que nous retrouvons une tendance à une corrélation négative avec le MADRS ($p=0,0626$ $r^2=0,171$).

Par ailleurs, nous avons noté une tendance à une corrélation positive entre taux sériques de BDNF et score de SJSDAI ($p=0,0949$ $r^2=0,127$).

Sur le plan BDNF et atteinte systémique, nous avons pu mettre en évidence une association entre un antécédent de vascularite cutanée et des taux sériques plus élevés de BDNF ($226,6 \pm 24,4$ pg/mL vs $181,2 \pm 29,4$ pg/mL, $p=0,0493$). Le même type d'association existe avec les manifestations arthritiques ($214,3 \pm 21,6$ pg/mL vs $177,0 \pm 29,4$ pg/mL, $p=0,0158$). A l'inverse pour l'atteinte rénale, il y a une tendance à des taux plus faibles ($143,8 \pm 39,5$ pg/mL vs $187,0 \pm 28,0$ pg/mL, $p=0,0559$).

Aucune relation statistique n'a été mise en évidence entre les concentrations sanguines de BDNF et les paramètres biologiques et thérapeutiques étudiés.

Enfin, il semble exister une corrélation positive entre concentration sérique de BDNF et moyenne de fluorescence de la sortiline dans les LB ($p=0,06$) (**Figure 42**).

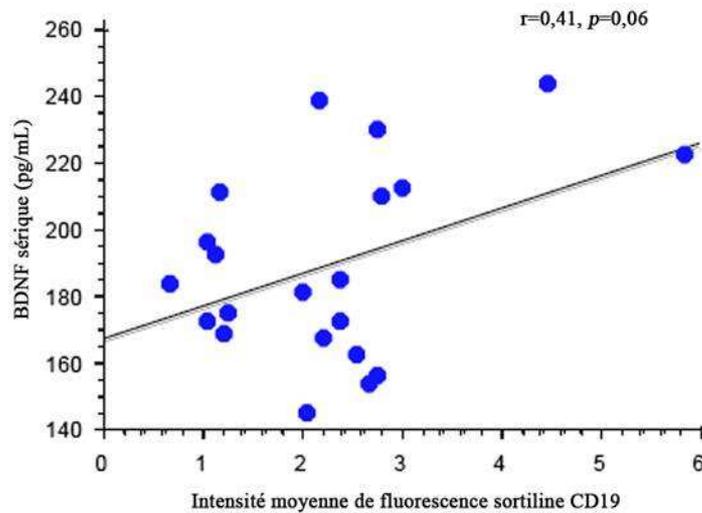


Figure 42. Corrélation taux sériques de BDNF et intensité moyenne de fluorescence intracytoplasmique lymphocytaire B

d. Concentrations sériques de NT-3 et profil clinico-biologique

A l'inverse du BDNF, il existe une corrélation négative statistiquement significative entre taux sériques de NT-3 et score du SF36 ($p=0,0169$ $r^2=0,344$).

Les concentrations sériques de NT-3 apparaissent indépendantes du profil clinique des SGSp.

Sur le plan biologique, nos résultats montrent une corrélation négative entre NT-3 sanguin et numération leucocytaire ($p=0,0482$ $r^2=0,173$) (**Figure 43**). Aucune corrélation n'a pu être retrouvée entre les concentrations sériques de NT-3 et les paramètres étudiés de cytométrie en flux.

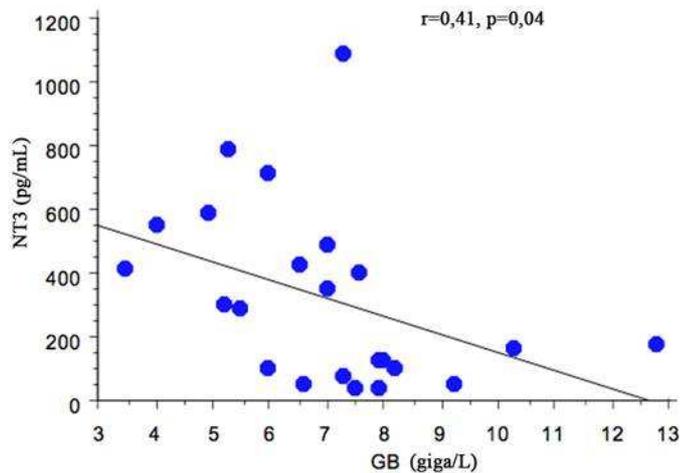


Figure 43. Corrélation négative entre augmentation des concentrations de NT-3 et numération leucocytaire.

Il existe une corrélation statistiquement significative entre la prise d'un traitement sécrétagogue et le taux sanguin de NT-3, celui-ci augmentant ($479,1 \pm 303,0$ pg/mL vs $184,0 \pm 171,6$ pg/mL, $p=0,0084$). A l'inverse la corticothérapie semble associée à des taux plus faibles de NT-3 ($149,0 \pm 131,5$ pg/mL vs $387,3 \pm 296,2$ pg/mL, $p=0,0735$).

e. Concentrations salivaires de NTs

La concentration salivaire moyenne en NGF des patients est de $185,0 \pm 100,5$ pg/mL. Celle de NT-3 est de $40,1 \pm 67,4$ pg/mL. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de BDNF au niveau salivaire, l'ensemble des échantillons testés étant au-dessous du seuil de détection.

Les concentrations de NGF sont identiques chez les patients avec un débit salivaire abaissé ou sans xérostomie objective (190 ± 67 pg/mL vs 195 ± 137 pg/mL, NS). A l'inverse, les concentrations salivaires de NT-3 sont augmentées en cas de syndrome sec patent (149 ± 93 vs 28 ± 17 pg/mL, $p=0,04$)

Aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre taux sériques de NGF et de NT-3 et leurs taux salivaires (**Figure 44**).

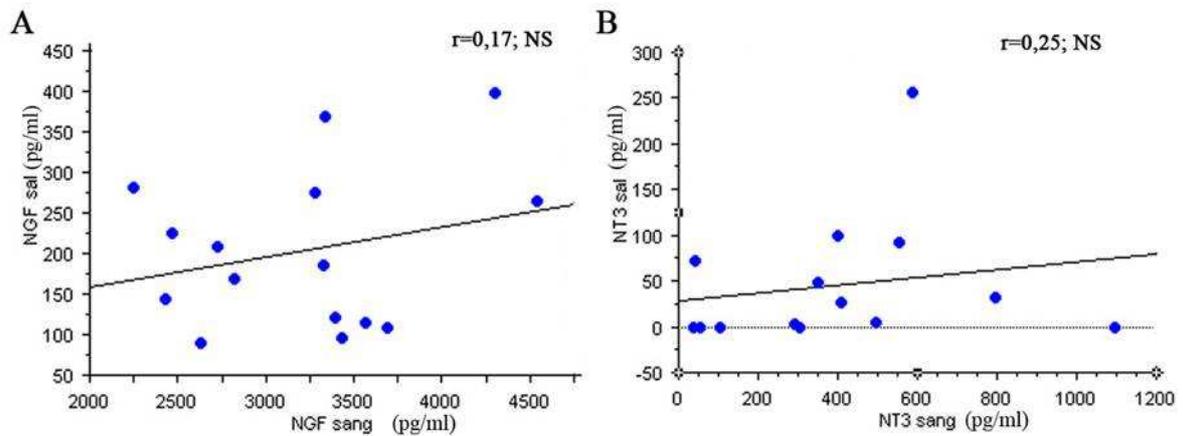


Figure 44. Courbes de régression linéaire et coefficients de corrélation (analyse de variance) entre les taux salivaires et sanguins de NGF (A) et de NT-3 (B)

4. Résultats de la cytométrie de flux

a. Les Lymphocytes T régulateurs

Les nTreg ont été sélectionnés parmi les LT CD4+ exprimant à un haut niveau CD25 et FoxP3 (**Figure 45**). La comparaison du pourcentage de nTreg entre les patients et les volontaires sains n'a pas permis de montrer de différence significative en analyse univariée. De même, nous n'avons pas pu retrouver de différence entre les pAG et les pAS.

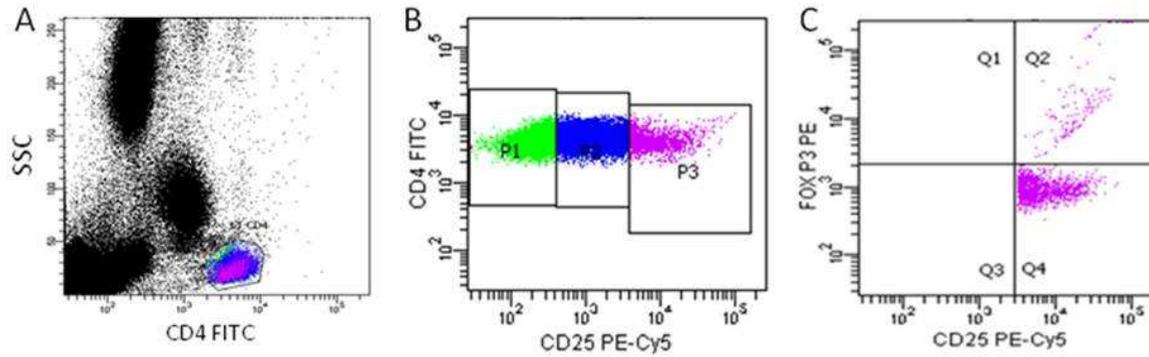


Figure 45: Stratégie de gating des LT régulateurs.

A : les lymphocytes T sont tout d'abord ciblés sur leur taille et leur expression de CD4. B : les LT CD4+ avec la plus forte expression de CD25 sont ensuite sélectionnés. C : les nTreg correspondent aux CD25 high exprimant FoxP3

b. Résultats d'ensemble

Les résultats de la CMF sont exposés dans la **Figure 46**.

			Lymphocytes B		Lymphocytes T	
			Pourcentage	XMEAN/XMEAN Isotypique	Pourcentage	XMEAN/XMEAN Isotypique
TrkA	Mem branaire	Patients	97,5 (s=7,9 IC=3,3)	2,99 (s=1,35 IC=0,56)	99,1 (s=1,2 IC=0,5)	3,24 (s=1,24 IC=0,51)
		Volontaires sains	98,1 (s=6,0 IC=2,9)	3,16 (s=1,23 IC=0,60)	99,4 (s=0,8 IC=0,4)	3,73 (s=1,28 IC=0,63)
	Intracytoplasmique	Patients	92,3 (s=11,4 IC=4,8)	1,70 (s=0,64 IC=0,27)	94,0 (s=8,0 IC=3,2)	1,80 (s=0,81 IC=0,34)
		Volontaires sains	98,4 (s=11,6 IC=5,7)	2,27 (s=1,28 IC=0,63)	99,0 (s=1,1 IC=0,5)	2,70 (s=1,34 IC=0,66)
TrkB	Mem branaire	Patients	99,5 (s=0,8 IC=0,3)	3,92 (s=2,54 IC=1,06)	99,4 (s=0,6 IC=0,3)	3,48 (s=1,62 IC=0,66)
		Volontaires sains	99,6 (s=0,4 IC=0,2)	4,59 (s=1,67 IC=0,82)	99,2 (s=1,3 IC=0,7)	4,36 (s=2,03 IC=1,00)
	Intracytoplasmique	Patients	95,7 (s=5,7 IC=2,4)	1,81 (s=0,62 IC=0,26)	94,0 (s=17,1 IC=3,2)	1,99 (s=0,62 IC=0,25)
		Volontaires sains	98,6 (s=3,9 IC=1,9)	2,89 (s=1,67 IC=0,82)	99,1 (s=1,8 IC=0,9)	3,69 (s=2,26 IC=1,11)
TrkC	Mem branaire	Patients	99,1 (s=1,4 IC=0,6)	3,25 (s=1,39 IC=0,58)	99,4 (s=0,8 IC=0,3)	3,31 (s=1,36 IC=0,55)
		Volontaires sains	99,8 (s=0,3 IC=0,1)	4,36 (s=2,95 IC=1,44)	99,0 (s=1,7 IC=0,9)	3,61 (s=1,58 IC=0,77)
	Intracytoplasmique	Patients	91,5 (s=18,9 IC=7,9)	1,62 (s=0,50 IC=0,21)	96,1 (s=8,8 IC=3,6)	1,99 (s=0,61 IC=0,25)
		Volontaires sains	98,5 (s=2,5 IC=1,3)	2,50 (s=1,55 IC=0,78)	99,4 (s=0,5 IC=0,3)	2,92 (s=1,25 IC=0,61)
p75NTR	Mem branaire	Patients	99,1 (s=1,6 IC=0,7)	3,04 (s=1,34 IC=0,56)	98,8 (s=1,8 IC=0,8)	2,91 (s=1,44 IC=0,59)
		Volontaires sains	98,4 (s=2,4 IC=1,2)	3,23 (s=1,44 IC=0,71)	98,2 (s=3,2 IC=1,7)	3,03 (s=1,60 IC=0,84)
	Intracytoplasmique	Patients	90,4 (s=15,3 IC=6,4)	1,52 (s=0,50 IC=0,21)	93,7 (s=8,7 IC=3,5)	1,61 (s=0,49 IC=0,20)
		Volontaires sains	84,8 (s=26,9 IC=13,2)	1,50 (s=0,66 IC=0,32)	91,5 (s=25,3 IC=12,8)	2,14 (s=1,10 IC=0,56)
Sortiline	Mem branaire	Patients	15,4 (s=21,5 IC=9,0)	1,40 (s=0,81 IC=0,34)	12,8 (s=19,8 IC=8,1)	1,64 (s=1,72 IC=0,70)
		Volontaires sains	6,9 (s=6,1 IC=3,6)	1,33 (s=0,64 IC=0,38)	3,9 (s=3,4 IC=2,0)	1,00 (s=0,41 IC=0,24)
	Intracytoplasmique	Patients	80,7 (s=30,1 IC=12,9)	2,27 (s=1,21 IC=0,52)	81,5 (s=30,9 IC=12,6)	2,58 (s=1,44 IC=0,59)
		Volontaires sains	85,5 (s=26,6 IC=13,0)	2,76 (s=2,00 IC=1,18)	88,1 (s=24,1 IC=14,2)	3,53 (s=3,04 IC=1,80)
NGF	Intracytoplasmique	Patients	10,2 (s=10,3 IC=4,3)	1,06 (s=0,31 IC=0,13)	35,2 (s=22,9 IC=9,3)	0,94 (s=0,15 IC=0,06)
		Volontaires sains	19,9 (s=10,0 IC=15,2)	1,22 (s=0,61 IC=0,32)	41,4 (s=28,2 IC=14,3)	0,95 (s=0,32 IC=0,17)
BDNF	Intracytoplasmique	Patients	97,9 (s=2,0 IC=0,8)	1,91 (s=0,69 IC=0,29)	98,2 (s=1,0 IC=0,4)	2,06 (s=0,49 IC=0,20)
		Volontaires sains	97,2 (s=4,8 IC=2,4)	2,30 (s=1,63 IC=0,83)	92,8 (s=22,3 IC=11,3)	3,65 (s=4,57 IC=2,31)
NT3	Intracytoplasmique	Patients	88,4 (s=17,5 IC=7,3)	1,71 (s=0,45 IC=0,19)	90,6 (s=18,5 IC=7,9)	2,13 (s=0,81 IC=0,35)
		Volontaires sains	83,0 (s=33,0 IC=16,7)	6,52 (s=16,72 IC=8,46)	81,4 (s=31,5 IC=15,9)	2,19 (s=1,35 IC=0,71)

Figure 46 : Récapitulatif des résultats obtenus en CMF

c. Expression des récepteurs TrkA, TrkB, TrkC et p75^{NTR}

Nous avons retrouvé une expression massive des différents récepteurs TrkA, B et C et p75^{NTR} aussi bien au niveau membranaire qu'en intracytoplasmique sur les LB et les LT à la fois chez les SGSp et les témoins.

Les résultats sont beaucoup plus tranchés pour la sortiline. Il existe de façon nette un faible pourcentage oscillant entre 2% et 20,4% de LB et de LT l'exprimant en membranaire y compris chez les volontaires sains (**Figure 47**).

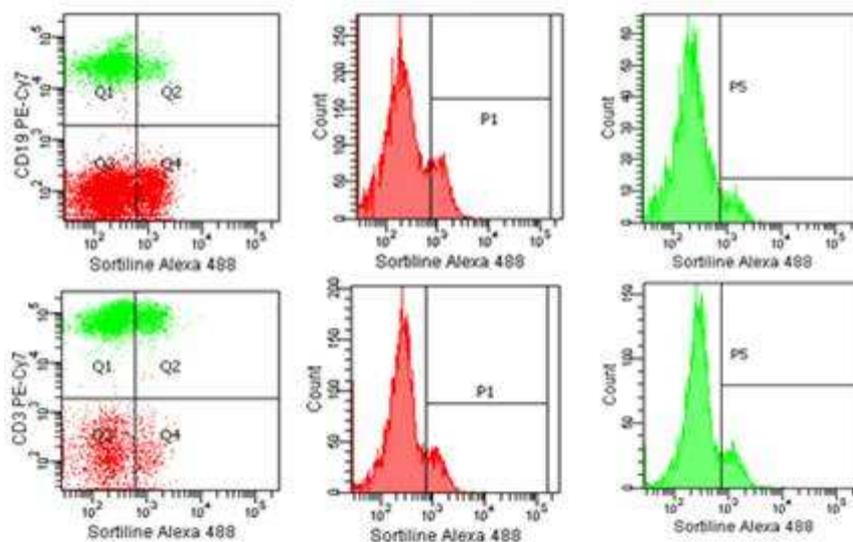


Figure 47: Résultats types obtenus pour la sortiline membranaire sur les lymphocytes (en rouge), les LB et les LT (en vert)

Deux patients expriment très fortement la sortiline en membranaire, avec plus de 50% de lymphocytes positifs, cette expression se limitant aux LB pour l'un d'entre eux. Ces patients font partie du groupe des pAS avec un SJSDAI à 4 et à 7.

En intracytoplasmique, les résultats sont beaucoup plus homogènes avec une expression lymphocytaire quasi ubiquitaire.

d. Expression des neurotrophines

Concernant les NTs, le NGF est difficilement décelable au sein des LB aussi bien chez les volontaires sains que chez les patients. Il est exprimé par un pourcentage plus important de LT mais avec une intensité moyenne de fluorescence faible.

Le BDNF est, lui, fortement exprimé en intracytoplasmique dans les LB et les LT. Les résultats concernant la NT-3 sont un peu plus nuancés mais avec une expression observée dans la majorité des lymphocytes (**Figure 48**).

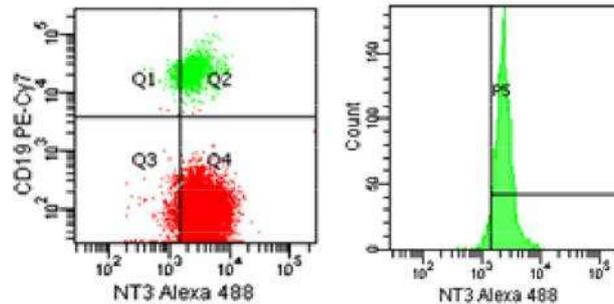


Figure 48. Résultats types obtenus en intracytoplasmique dans les LB pour les différentes NTs

Exemple de l'expression de la NT-3 au niveau lymphocytaire B.

e. Etude des corrélations concernant les récepteurs des NTs et les NTs

- Au sein du groupe des volontaires sains

Il existe plusieurs corrélations positives entre les récepteurs Trk aussi bien sur les LB que sur les LT. En revanche, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence concernant la sortiline et les récepteurs Trk ou p75^{NTR} (**Figure 49**) Cependant, nous avons retrouvé des expressions membranaires et intracytoplasmiques pour la sortiline corrélées positivement sur les LB et les LT tant sur le plan des pourcentages que des moyennes de fluorescence (**Figure 50**).

TEMOIN ^{NS}	SORT	x TRK A CD19	x TRK B CD19	x TRK C CD19	x P75 CD19	x SORT CD19	XNGF CD19	XBDNF CD19	XNT-3 CD19	%	SORT	x TRK A CD3	x TRK B CD3	x TRK C CD3	x P75 CD3	SORT	XNGF CD3	XBDNF CD3	XNT-3 CD3	SORT	
% SORT CD19		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
x TRK A CD19			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	p=0,03 r=0,53	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
x TRK B CD19				NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	p=0,00 9 r=0,65	p=0,03 r=0,53	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
x TRK C CD19					NS	NS	NS	NS	p=0,00 1 r=0,89	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	p=0,00 6 r=0,82	NS	NS	NS
x P75 CD19						NS	NS	NS	NS	NS	NS	p=0,02 r=0,59	p=0,03 r=0,54	NS	NS	NS	p=0,01 r=-0,70	NS	NS	NS	NS
x SORT CD19							NS	NS	NS	NS	p=0,00 5 r=0,89	NS	NS	NS	NS	p=0,03 r=0,44	NS	NS	NS	NS	NS
XNGF CD19								NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	p=0,02 r=0,78	NS	NS	NS	p=0,04 r=0,36	NS	NS
XBDNF CD19									NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
XNT-3 CD19										NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
X SORT IC CD19											NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	p=0,00 1 r=0,97
% SORT CD3												NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
x TRK A CD3													NS	p=0,01 r=0,37	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
x TRK B CD3														p=0,00 1 r=0,85	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
x TRK C CD3															NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
x P75 CD3																NS	NS	NS	NS	NS	NS
x SORT CD3																	NS	NS	NS	NS	NS
XNGF CD3																		NS	p=0,01 r=0,69	NS	NS
XBDNF CD3																				NS	NS
XNT-3 CD3																					NS
X SORT IC CD3																					

Figure 49 : Récapitulatif des corrélations* significatives concernant les résultats de CMF des volontaires sains (*les corrélations positives sont indiquées en bleu et les négatives en rouge*)

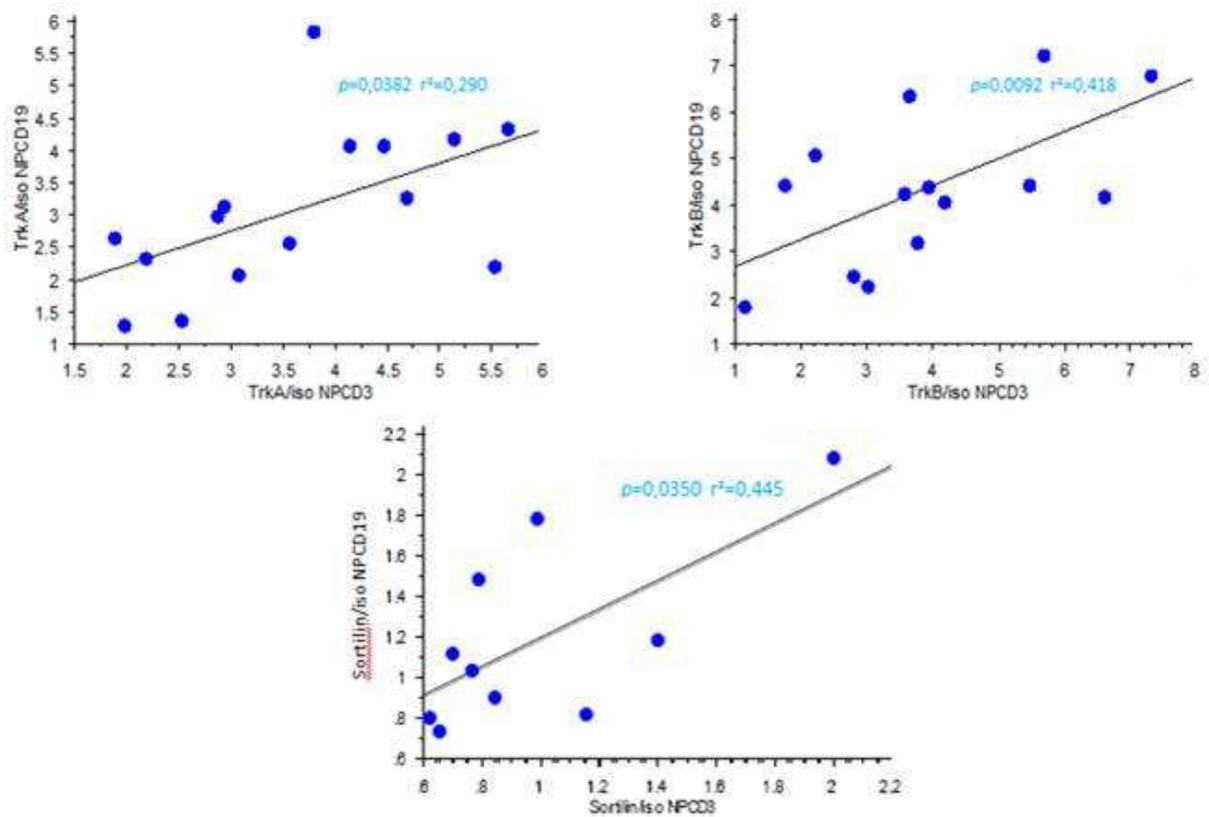


Figure 50. Corrélations positives d'un même récepteur membranaire sur les LB et les LT

•Au sein du groupe des patients

Tout comme chez les volontaires sains, nous retrouvons un grand nombre de corrélations positives entre les différents récepteurs Trk. Il s'y ajoute également une nette association avec le récepteur p75^{NTR}. Ces corrélations sont positives et sont observées aussi bien en membranaire qu'en intracytoplasmique ou au sein des LB que des LT (**Figure 51**).

Contrairement aux volontaires sains, il existe une corrélation négative entre la sortiline et les récepteurs Trk, qu'elle que soit la variable considérée, pourcentage ou l'intensité moyenne de fluorescence. A noter que nous avons également retrouvé une corrélation négative avec le récepteur p75^{NTR} (**Figure 52**). Tout comme pour les témoins, il y a de très nombreuses corrélations positives entre les différentes variables concernant la sortiline dans toutes les localisations.

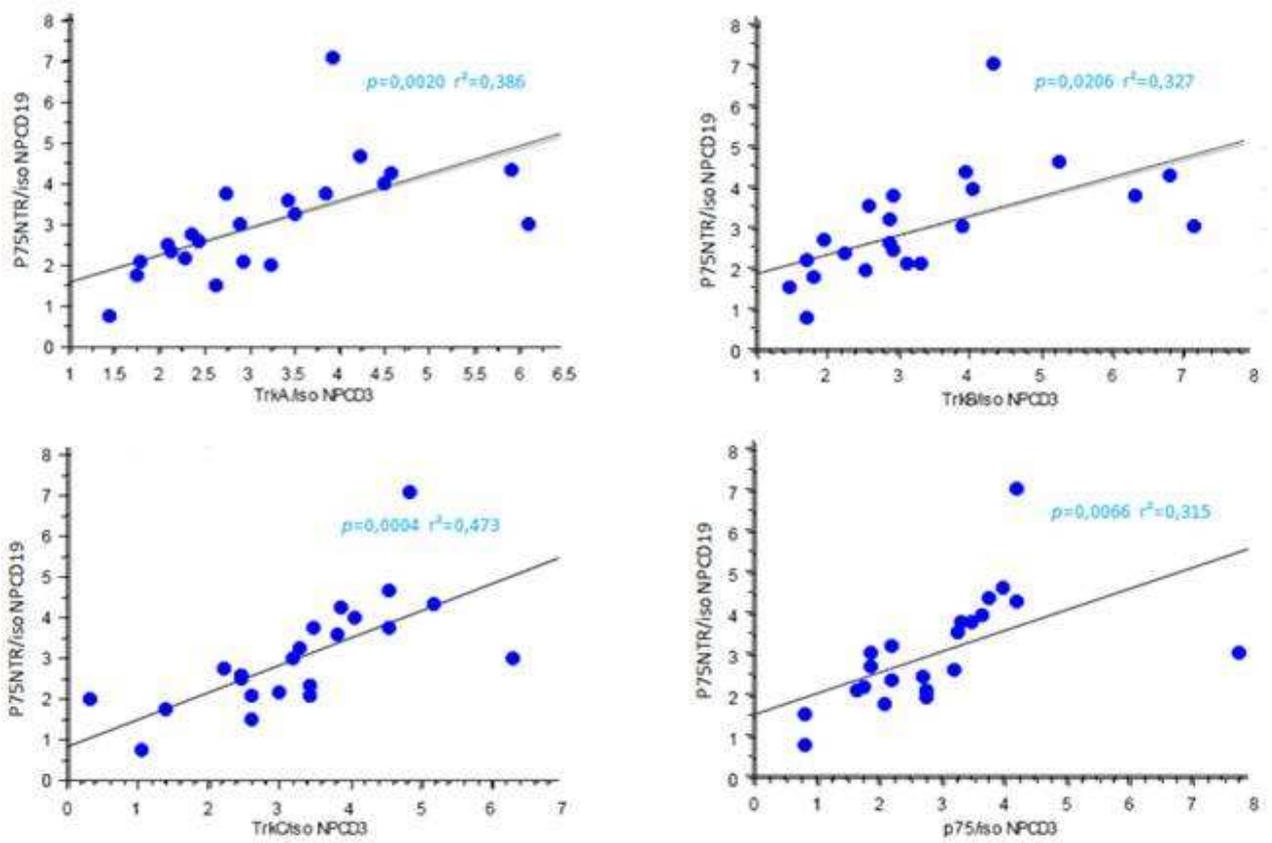


Figure 51. Corrélations positives entre l'intensité moyenne de fluorescence du récepteur P75^{NTR} membranaire lymphocytaire B et celles des autres récepteurs exprimés à la membrane des LT

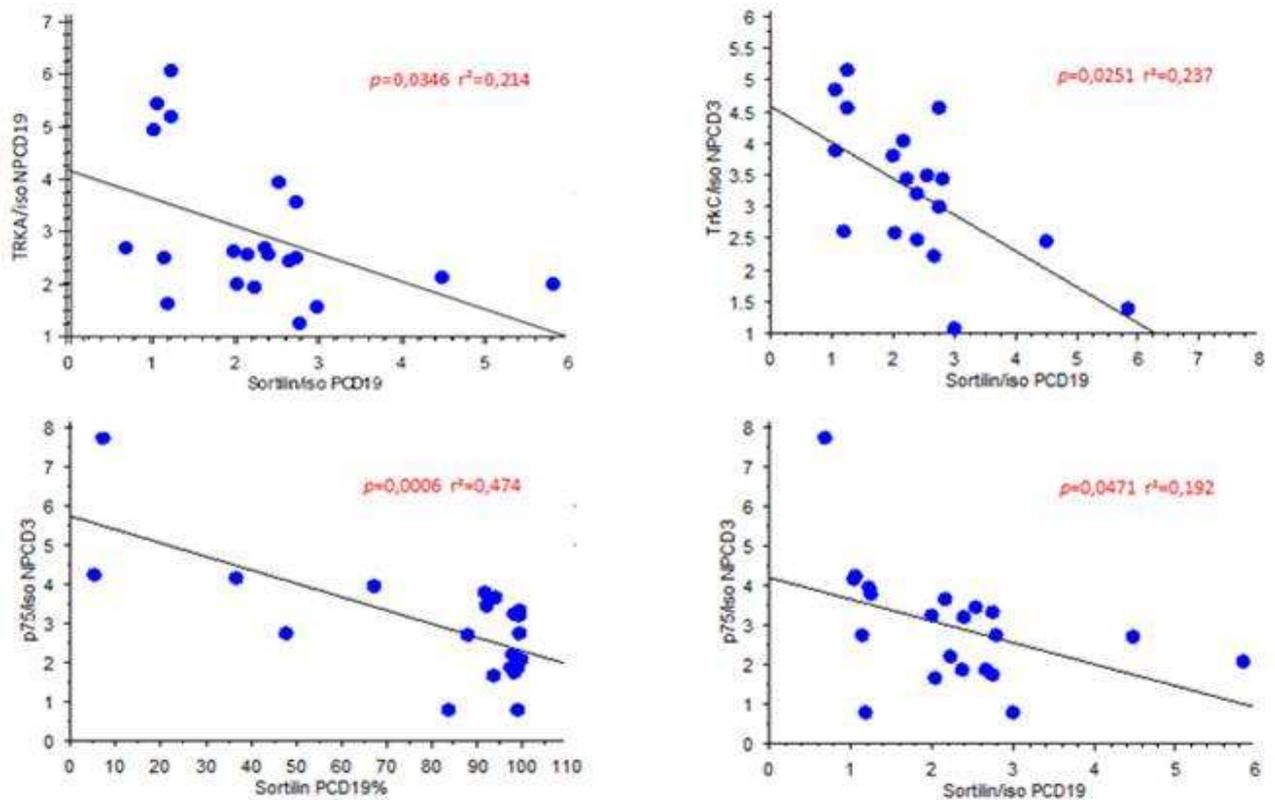


Figure 52. Corrélations négatives entre les différentes variables de la sortiline et les récepteurs TrkA, TrkC et p75^{NTR} membranaires

Concernant les NTs, le NGF dans les LB est corrélé avec le NGF et le NT-3 dans les LT, les mêmes associations sont retrouvées pour le NT-3 lymphocytaire B. La présence de BDNF dans les LB est associée avec celle dans les LT (**Figure 53**)

SJOGREN ^{NS}	SORT	x TRK A CD19	x TRK B CD19	x TRK C CD19	x P75 CD19	x SORT CD19	XNGF CD19	BDNF	XNT3	CD3	%	SORT	x TRK A CD3	x TRK B CD3	x TRK C CD3	x P75 CD3	SORT	XNGF CD3	BDNF	XNT3	CD3	SORT
% SORT CD19		p=0,04 r=-0,45	NS	NS	p≤0,00 1 r=0,84	p≤0,00 1 r=0,82	NS	NS	NS	NS	NS	p≤0,00 1 r=0,85	p=0,00 7 r=0,57	p=0,00 5 r=0,58	NS	p=0,00 6 r=0,68	p≤0,00 1 r=0,80	NS	NS	NS	NS	NS
x TRK A CD19			p=0,02 r=0,47	p≤0,00 1 r=0,79	p≤0,00 1 r=0,84	p=0,03 r=-0,46	NS	NS	NS	NS	NS	NS	p≤0,00 1 r=0,66	p≤0,00 1 r=0,54	p=0,00 4 r=0,58	p=0,02 r=0,46	NS	p=0,04 r=0,43	NS	NS	NS	NS
x TRK B CD19				p=0,00 5 r=0,68	p=0,02 r=0,5	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	p≤0,00 1 r=0,65	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
x TRK C CD19					p≤0,00 1 r=0,80	NS	NS	NS	NS	p=0,03 r=-0,48	NS	p≤0,00 1 r=0,68	p≤0,00 1 r=0,68	p=0,00 3 r=0,601	p=0,02 r=0,48	NS	NS	p=0,00 2 r=0,61	NS	NS	NS	NS
x P75 CD19						p=0,01 r=-0,51	NS	NS	NS	p=0,04 r=-0,43	NS	p=0,00 2 r=0,38	p=0,00 5 r=0,32	p≤0,00 1 r=0,47	p=0,00 6 r=0,56	NS	NS	NS	NS	NS	NS	p=0,03 r=-0,45
x SORT CD19							p=0,06 r=0,38	NS	NS	NS	NS	p≤0,00 1 r=0,87	p=0,00 2 r=0,63	NS	NS	NS	p≤0,00 1 r=0,91	NS	NS	NS	NS	NS
XNGF CD19								NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	p=0,01 r=0,51	NS	p=0,04 r=0,45	NS	NS
XBDNF CD19									NS	p=0,03 r=-0,45	NS	p=0,01 r=0,27	p=0,04 r=0,43	p=0,01 r=0,52	p=0,00 2 r=0,62	NS	NS	NS	p=0,00 1 r=0,73	NS	NS	NS
XNT3 CD19									NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	p=0,03 r=0,46	NS	p=0,00 1 r=0,66	NS	NS
X SORT IC CD19									NS	NS	NS	NS	p=0,03 r=-0,46	p=0,02 r=-0,48	p=0,04 r=-0,44	NS	NS	p=0,01 r=-0,27	NS	NS	NS	NS
% SORT CD3												NS	NS	p=0,02 r=-0,46	p=0,02 r=-0,46	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
x TRK A CD3													p≤0,00 1 r=0,76	p≤0,00 1 r=0,79	p≤0,00 1 r=0,81	NS	NS	p=0,02 r=0,48	NS	NS	p=0,04 r=-0,42	NS
x TRK B CD3															p≤0,00 1 r=0,73	p≤0,00 1 r=0,79	NS	NS	NS	NS	NS	NS
x TRK C CD3															p≤0,00 1 r=0,75	p=0,03 r=-0,44	NS	p=0,02 r=0,46	NS	NS	NS	NS
x P75 CD3																NS	p=0,05 r=-0,38	NS	NS	NS	NS	NS
x SORT CD3																		NS	NS	NS	NS	NS
XNGF CD3																			NS	NS	NS	NS
XBDNF CD3																					NS	NS
XNT3 CD3																						p=0,03 r=0,46
X SORT IC CD3																						

Figure 53: Récapitulatif des corrélations* significatives concernant les résultats de CMF des patients (*les corrélations positives sont indiquées en bleu et les négatives en rouge)

De plus, il existe des corrélations négatives entre la moyenne de fluorescence de la sortiline intralymphocytaire B et celles du BDNF (**Figure 54**).

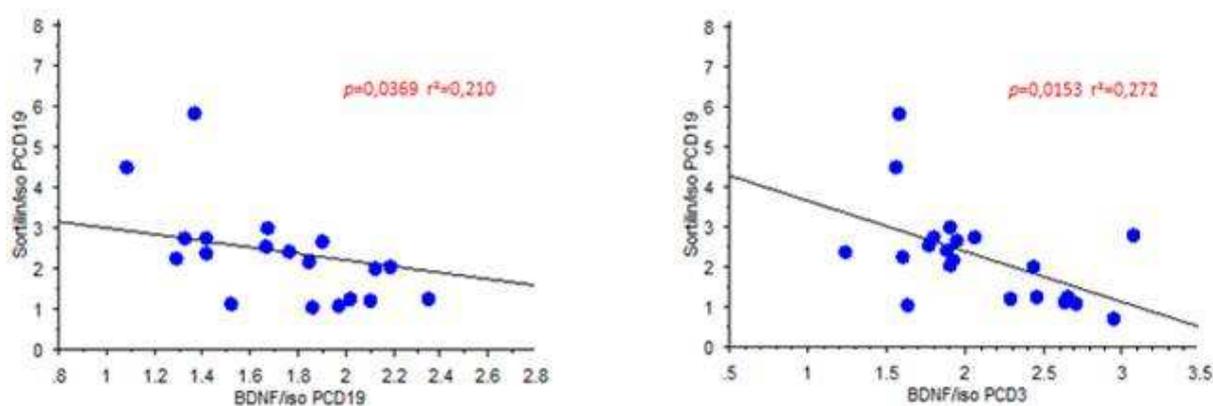


Figure 54. Corrélations négatives entre l'intensité moyenne de fluorescence de la sortiline intracytoplasmique lymphocytaire B et le BDNF

f. Comparaison entre les volontaires sains et les deux sous-groupes de patients

Nous n'avons pas retrouvé de différence significative entre les expressions membranaires des récepteurs Trk et du $p75^{\text{NTR}}$ sur les LB. En revanche, l'expression membranaire lymphocytaire T du TrkC et du $p75^{\text{NTR}}$ est presque significativement plus élevée chez les pAG par rapport aux pAS ($4,476 \pm 1,404$ vs $3,061 \pm 1,247$, $p=0,0559$ et $4,107 \pm 2,614$ vs $2,662 \pm 1,025$, $p=0,0675$). Nous n'avons pas mis en évidence de différences significatives concernant la sortiline membranaire lymphocytaire B ou T.

En intracytoplasmique, il existe une expression plus importante des trois récepteurs Trk chez les volontaires sains par rapport aux pAS aussi bien dans les LB (TrkA: 2380 ± 1327 vs $1,689 \pm 0,523$, $p=0,0520$; TrkB: $2,905 \pm 1,767$ vs $1,793 \pm 0,485$, $p=0,0158$; TrkC: $2,552 \pm 1,644$ vs $1,558 \pm 0,439$, $p=0,0200$) que les LT.

De plus, le pourcentage intralymphocytaire B et T de sortiline est plus important chez les volontaires sains et chez les pAS que chez les pAG (LB: $87,3 \pm 27,3\%$ vs $36,8 \pm 52,8\%$, $p=0,0420$ et $88,0 \pm 18,6\%$ vs $36,8 \pm 52,8\%$, $p=0,0034$; LT: $89,3 \pm 25,0\%$ vs $28,0 \pm 40,6\%$, $p=0,0044$ et $92,8 \pm 10,9\%$ vs $28,0 \pm 40,6\%$, $p<0,0001$). Enfin, l'expression de NT-3 dans les deux types de lymphocytes est augmentée chez les pAS par rapport aux pAG (LB: $1,799 \pm 0,428$ vs $1,291 \pm 0,308$, $p=0,0375$; LT: $2,358 \pm 0,706$ vs $1,162 \pm 0,421$, $p=0,0045$) (**Tableau V**)

Tableau V: Récapitulatif des différences significatives existant entre les volontaires sains (VS), les pAG et les pAS

	Comparaison pAG/VS	Comparaison pAS/VS	Comparaison pAG/pAS
X TRK A CD19	NS	NS	NS
X TRK B CD19	NS	NS	NS
X TRK C CD19	NS	NS	NS
X P75 CD19	NS	NS	NS
% SORT CD19	NS	NS	NS
X SORT CD19	NS	NS	NS
X TRK A CD3	NS	NS	NS
X TRK B CD3	NS	NS	NS
X TRK C CD3	NS	NS	<i>p=0,0559</i>
X P75 CD3	NS	NS	<i>p=0,0675</i>
% SORT CD3	NS	NS	NS
X SORT CD3	NS	NS	NS
X TRK A IC CD19	NS	<i>p=0,0520</i>	NS
X TRK B IC CD19	NS	<i>p=0,0158</i>	NS
X TRK C IC CD19	NS	<i>p=0,0200</i>	NS
X P75 IC CD19	NS	NS	NS
% SORT IC CD19	<i>p=0,0420</i>	NS	<i>p= 0,0034</i>
X SORT IC CD19	NS	NS	NS
X NGF CD 19	NS	NS	NS
X BDNF CD19	NS	NS	NS
X NT-3 CD19	NS	NS	<i>p=0,0375</i>
% SORT IC CD3	<i>p=0,0044</i>	NS	<i>p < 0,0001</i>
X NGF CD3	NS	NS	NS
X BDNF CD3	NS	NS	NS
X NT-3 CD3	NS	NS	<i>p=0,0045</i>
NGF sanguin	NS	<i>p=0,0393</i>	NS
BDNF sanguin	NS	NS	NS
NT-3 sanguin	NS	NS	NS

NOTE : Les différences en faveur des VS sont en bleu, celles en faveur des pAG sont en rouge et celles en faveur des pAS sont en vert

g. Analyse univariée des résultats de CMF et des atteintes cliniques

La moyenne de fluorescence de la NT-3 dans les LB est augmentée de manière statistiquement significative dans le groupe de patients présentant un phénomène de Raynaud ($1,887 \pm 0,407$ vs $1,490 \pm 0,416$, $p=0,0356$).

La vascularite cutanée est associée avec des pourcentages et des intensités moyennes de fluorescence plus élevés de sortiline à la surface et en intracytoplasmique dans les LB ($51,0 \pm 68,2\%$ vs $11,8 \pm 11,0\%$, $p=0,0101$ et $2,630 \pm 2,609$ vs $1,281 \pm 0,445$, $p=0,0212$) et les LT ($52,7 \pm 66,4\%$ vs $9,0 \pm 6,0\%$, $p=0,0011$ et $4,918 \pm 5,670$ vs $1,332 \pm 0,689$, $p=0,0024$).

Une atteinte articulaire est également associée avec une augmentation de l'intensité moyenne de fluorescence du NT-3 dans les LB ($1,875 \pm 0,410$ vs $1,346 \pm 0,302$, $p=0,0065$) et dans les LT ($2,455 \pm 0,696$ vs $1,480 \pm 0,632$, $p=0,0057$) ainsi qu'avec une élévation de l'intensité moyenne de fluorescence du NGF dans les LT ($0,990 \pm 0,098$ vs $0,830 \pm 0,187$, $p=0,0131$).

La présence d'une atteinte articulaire lors de l'inclusion est associée à une moyenne de fluorescence de TrkA diminuée à la surface des LB ($2,366 \pm 1,033$ vs $3,511 \pm 1,402$, $p=0,0448$) ainsi qu'à une intensité moyenne de fluorescence augmentée du NGF dans les LB ($1,201 \pm 0,398$ vs $0,943 \pm 0,127$, $p=0,0456$). De même les patients présentant une synovite lors de l'inclusion se caractérisent par des intensités moyennes de fluorescence membranaires diminuées de TrkA (LB: $1,901 \pm 0,556$ vs $3,311 \pm 1,357$, $p=0,0368$; LT: $2,233 \pm 0,667$ vs $3,513 \pm 1,228$, $p=0,0378$), TrkC (LB : $2,153 \pm 0,952$ vs $3,570 \pm 1,346$, $p=0,0413$; LT : $2,319 \pm 1,060$ vs $3,581 \pm 1,324$, $p=0,0641$) et p75^{NTR} (LB : $2,003 \pm 0,842$ vs $3,341 \pm 1,326$, $p=0,0474$) sur les LB et les LT. A l'inverse, le pourcentage membranaire et l'intensité moyenne de fluorescence intracytoplasmique de la sortiline dans les LB sont significativement augmentés ($34,5 \pm 41,5\%$ vs $9,8 \pm 5,4\%$, $p=0,0199$ et $3,699 \pm 1,431$ vs $1,824 \pm 0,713$, $p=0,0007$).

Concernant la présence d'une atteinte musculaire, nous avons pu montrer également une augmentation de l'expression membranaire B ($45,0 \pm 41,0\%$ vs $8,8 \pm 4,7\%$, $p=0,0007$) et T ($31,4 \pm 45,8\%$ vs $8,9 \pm 6,0\%$, $p=0,0354$) de la sortiline.

Une diminution de l'intensité moyenne de fluorescence de TrkC à la surface des LT ($1,773 \pm 1,872$ vs $3,537 \pm 1,156$, $p=0,0323$) et une augmentation de celle de la sortiline en intracytoplasmique dans les LT a pu être retrouvée ($4,299 \pm 1,532$ vs $2,320 \pm 1,275$, $p=0,0228$) chez les patients présentant une hépatopathie auto-immune associée au SGSp.

Nous n'avons pu mettre aucune corrélation en évidence concernant les atteintes hématologique, neurologique et pulmonaire.

h. Analyse univariée des résultats de CMF et des traitements pris par les patients

L'intensité moyenne de fluorescence de NT-3 dans les LB a tendance à être augmentée chez les patients prenant du Plaquénil ($2,121 \pm 0,154$ vs $1,641 \pm 0,447$, $p=0,0852$).

Les patients sous corticothérapie présentent un pourcentage augmenté de LB exprimant la sortiline à leur surface ($36,4 \pm 40,4\%$ vs $9,2 \pm 4,6\%$, $p=0,0092$) ainsi qu'une élévation de l'intensité moyenne de fluorescence de la sortiline intracytoplasmique B ($3,359 \pm 1,822$ vs $1,931 \pm 0,737$, $p=0,0167$).

La prise d'un autre traitement immunosuppresseur est également associée avec une intensité moyenne de fluorescence membranaire B augmentée de la sortiline ($2,198 \pm 1,309$ vs $1,170 \pm 0,429$, $p=0,0092$) et avec une intensité moyenne de fluorescence intracytoplasmique B élevée du NGF ($1,356 \pm 0,538$ vs $0,973 \pm 0,123$, $p=0,0100$).

i. Analyse univariée des résultats de CMF et de la biologie

Une intensité moyenne de fluorescence augmentée de NGF lymphocytaire T est associée avec la présence d'anticorps anti-nucléaires ($0,964 \pm 0,108$ vs $0,787 \pm 0,299$, $p=0,0502$) alors qu'il est retrouvé une association inverse pour le BDNF ($1,976 \pm 0,461$ vs $2,623 \pm 0,328$, $p<0,05$).

Discussion

Un mécanisme autocrine de survie impliquant le BDNF et sa molécule de transport la sortiline a été mis en évidence récemment par l'EA 3842 au sein de lignées B matures et plasmocytaires humaines [88]. Cette protéine de transport a également été décrite comme récepteur de la neurotensine (NTSR-3).

Le but initial de ce travail a été, dans un premier temps, de caractériser l'expression de la neurotensine et de ses récepteurs au sein de lignées B humaines à différents stades de maturation et, secondairement, d'en identifier les conséquences fonctionnelles, sur la survie de différentes populations lymphocytaires B.

L'originalité de cette étude a été la mise en évidence, pour la première fois, de la présence de la neurotensine et de ses 3 récepteurs fonctionnels au niveau des lymphocytes B ainsi que son rôle de facteur trophique pour les lignées B. Ce rôle avait déjà été mis en évidence dans d'autres types cellulaires, notamment de lignées établies de différentes tumeurs malignes solides [107, 114, 316]. En ce qui concerne les lymphocytes, seules 2 lignées lymphocytaires T humaines (Molt-4 and Jurkat) ont été préalablement étudiées pour leur capacité de liaison de la neurotensine sans que les récepteurs impliqués dans cette liaison n'aient été identifiés [179]. La caractérisation fonctionnelle des récepteurs de la neurotensine a été obtenue dans une lignée IL-2 indépendante de LT cytotoxiques tumoraux isolés de lymphomes cutanés T [180].

De plus, nos résultats montrent que la neurotensine n'est exprimée que dans les LB matures et plasmocytaires, suggérant qu'elle pourrait être impliquée dans les processus de maturation lymphocytaire B.

Nos résultats démontrent également que la neurotensine et son récepteur de haute affinité NTSR-1 ne sont exprimés que dans les cellules lymphocytaires issues de lignées tumorales, comme cela a été démontré pour d'autres cellules de cancers solides [114].

Enfin, les données obtenues au niveau lymphocytaire B de sujets sains et dans de souris suggèrent que la neurotensine pourrait avoir des fonctions physiologiques dans les lymphocytes B normaux, encore non élucidées actuellement.

I Neurotensine et homéostasie lymphocytaire B

A. Expression de la neurotensine et de ses récepteurs à l'état basal

Il a été mis en évidence, dans cette étude, que les lignées lymphocytaires B exprimaient les récepteurs NTSR-1, NTSR-2 et NTSR-3 en conditions normales quel que soit leur stade de maturation. De plus, la neurotensine n'a été détectée que dans les lignées de stades les plus avancés (B mature et plasmocytaire).

Les données bibliographiques concernant la neurotensine et le système immunitaire avaient essentiellement démontré sa fonction au niveau des mastocytes dans les processus allergiques, notamment d'allergies alimentaires, ce neuropeptide modulant la prolifération et la dégranulation des cellules mastocytaires activées [98, 317-319]. L'augmentation de la dégranulation mastocytaire par la neurotensine peut être bloquée par le SR-48692, suggérant que les effets biologiques de la neurotensine dans la réaction allergique sont médiés principalement par NTSR-1 [320, 321]. La stimulation de la réponse mastocytaire par la neurotensine est auto-régulée par la production de carboxypeptidase par les cellules mastocytaires, qui dégradent ainsi rapidement le peptide ayant contribué à leur activation [319].

Les travaux concernant l'influence de la neurotensine sur la réponse inflammatoire concernent principalement l'immunité innée dans des modèles d'infections muqueuses, digestives et pulmonaires principalement. Ainsi, il a été démontré que la neurotensine augmentait la sécrétion d'IL-1 par les macrophages activés alvéolaires [288]. Parallèlement, la neurotensine stimule les capacités d'adhésion des polynucléaires neurotrophines à l'épithélium bronchique [322]. Elle favorise également *in vitro* la diapédèse des neutrophiles et augmente les capacités phagocytaires de ces cellules [287]. L'importance de la neurotensine dans la réponse anti-infectieuse a été renforcée par des travaux récents portant sur des modèles murins Neurotensine^{-/-}. En effet, la survie de ces souris ko est augmentée par rapport aux souris « wild type » lors de modèles expérimentaux de péritonite. Cet effet délétère de la neurotensine sur la survie est régulé par les cellules mastocytaires qui

participent à la dégradation rapide de ce neuropeptide au niveau du site lésionnel [317]. Une étude clinique concernant le caractère pronostique de l'élévation des concentrations sériques de neurotensine au cours du sepsis sévère chez l'homme est actuellement développée par cette équipe de recherche [317].

Concernant les populations lymphocytaires, les analyses moléculaires et pharmacologiques avaient démontré la présence des récepteurs de la neurotensine au sein des PBMC humains et de lignées T Molt-4 et Jurkat [179, 323]. Il avait également été établi que ces récepteurs étaient fonctionnels, puisque la neurotensine avait la capacité de stimuler la prolifération lymphocytaire et l'activation des LT [179, 180]. En revanche, aucune donnée à notre connaissance, ne faisait état de la présence de la neurotensine et de ses récepteurs au sein de population lymphocytaires B.

L'analyse moléculaire a permis de mettre en évidence la présence des transcrits de la neurotensine uniquement dans les lignées B matures et les lignées plasmocytaires, suggérant une fonction de régulation du développement lymphocytaire B. Cette fonction avait été suggérée dans les processus de maturation thymique. En effet, la neurotensine a été mise en évidence pour la première fois dans le thymus de poulet [324] puis d'autres données sont venues étayer cette découverte [325]. Une relation entre neurotensine et cellules épithéliales thymiques exprimant le CMH I a été établie, suggérant que la majorité de la neurotensine produite au niveau du thymus provenaient de ces cellules [325]. La neurotensine, étant un peptide de courte chaîne protéique [96] et de séquence C terminal riche en résidu leucine, isoleucine et tyrosine, sa fixation sur la poche peptidique du CMH était possible [325].

Compte tenu des données de la littérature et des résultats obtenus, l'hypothèse d'une régulation des processus de maturation B par la neurotensine semble être envisageable.

B. Absence d'activation des voies impliquant la neurotensine à l'état basal

L'analyse de l'activité transcriptionnelle des différents récepteurs a révélé que l'ensemble des lignées B étudiées expriment au moins le récepteur NTSR-1 et le récepteur NTSR-3 à l'état basal, le transcrit NTSR-2 n'étant détectable que dans seulement 2 lignées. De plus, l'analyse de l'expression membranaire de ces récepteurs a démontré l'absence du récepteur NTSR-1 et une faible présence du récepteur NTSR-3 ce qui suggère une séquestration intra-cytoplasmique de ces récepteurs. Le récepteur NTSR-2 n'a été détecté quant à lui qu'au niveau des stades B matures et plasmocytaires, avec contrairement aux 2 autres récepteurs une expression membranaire significative en conditions de culture basale. L'ensemble de ces résultats suggèrent que la neurotensine et ses récepteurs interviendraient très peu dans le fonctionnement de ces lignées à l'état basal. L'adjonction de neurotensine exogène en condition basale de culture a permis de confirmer cette hypothèse. En effet, aucun effet sur la prolifération n'a été observé comme cela a précédemment été observé dans différents modèles cellulaires cancéreux [144, 326].

En effet, les différents effets de la neurotensine sont transmis principalement par son interaction au niveau membranaire avec les hétérodimères NTSR-1/NTSR-3 ou NTSR-2/NTSR-3. Toutefois, compte tenu de la coexistence au niveau cérébral des récepteurs NTSR-1 et NTSR-2 [127, 327], il a été mis en évidence récemment, la formation d'un hétérodimère NTSR-1/NTSR-2 fonctionnel [328]. La présence de ces différents récepteurs a déjà été démontrée au niveau astrocytaire, neuronal ou dans la lignée humaine colique HT29 [124, 329]. Toutefois, aucune donnée n'a été observée sur la coexistence de ces 3 récepteurs au niveau lymphocytaire B.

C. Les récepteurs de la neurotensine sont activés suite à un stress cellulaire

Le stress induit par privation sérique augmente l'activité transcriptionnelle de NTSR-2, ce récepteur étant détecté pour l'ensemble des lignées étudiées. En revanche, les conditions de culture n'influent pas sur l'activité transcriptionnelle des 2 autres récepteurs et de la neurotensine.

De même, le WB, a permis d'identifier 2 isoformes du récepteur NTSR-1 qui pourraient être dues à des profils de maturation et glycosylation différentes. En effet, deux isoformes de NTSR-1 proches de 52kDa (forme immature) et mature (54 kDa) ont été décrites au cours du développement cérébral chez le rat [330]. Ces modifications post-transcriptionnelles de NTSR-1 devront être démontrées dans les lignées lymphocytaires B soumises à une privation sérique. La caractérisation de la glycosylation de NTSR-1 et ses conséquences fonctionnelles pourront être effectuées par analyse protéique après traitement enzymatique (peptide-N glycosidase F) et par l'utilisation d'inhibiteurs tels que la tunicamycine [331] pour les études fonctionnelles et la localisation cellulaire des isoformes.

Les résultats obtenus par analyse cytométrique ont permis de mettre en évidence une expression membranaire des récepteurs NTSR-1 et NTSR-3 pour l'ensemble des lignées B. L'expression membranaire de NTSR-2 a été détectée dans l'ensemble des lignées avec une expression moindre pour la lignée de stade pré-B. Le stress sérique favoriserait donc la relocalisation membranaire des récepteurs avec une expression majoritaire des récepteurs NTSR-1 et NTSR-3. Ces résultats suggèrent que cette expression membranaire des récepteurs pourrait être associée à l'activation potentielle d'une signalisation anti-apoptotique par leur ligand, la neurotensine telle qu'elle a été décrite pour les cellules β pancréatiques normales lors de stress pro-apoptotique par déprivation sérique [116, 315]. Cet effet protecteur de la neurotensine a également démontré dans des modèles tumoraux de lignées d'adénocarcinomes coliques, pancréatiques et pulmonaires [128, 332]. Pour la première fois, à notre connaissance, nos résultats démontrent le rôle anti-apoptotique de la neurotensine au niveau de lignées tumorales B matures ou plasmocytaires en situation de privation sérique ou d'activation de la voie de FAS. De façon concordante, il est remarquable que seules les

lignées B matures et plasmocytaires expriment le transcrite de la neurotensine. On peut donc supposer que la neurotensine endogène exerce une fonction autocrine dans la survie de ces cellules B, en condition apoptotique. Ces données sont étayées par l'immunofluorescence indirecte qui montre une polarisation cellulaire de la neurotensine, compatible avec un processus de sécrétion, en condition de stress cellulaire. Cependant, nos résultats ne nous ont pas encore permis d'étayer cette hypothèse. Il conviendrait, tout d'abord, de vérifier l'existence d'une sécrétion active de neurotensine par les lignées plasmocytaires dans le milieu extra-cellulaire par dosage ELISA. Secondairement, la neutralisation de la production de neurotensine à l'aide de siRNA ou de shRNA permettrait de démontrer le rôle anti-apoptotique éventuel de la neurotensine endogène produite par ces lignées.

L'effet protecteur de la neurotensine a également été évalué au cours de l'apoptose induite par l'activation du récepteur Fas. Ces résultats ont permis de confirmer la neurotensine diminuait également l'apoptose induite par la voie de récepteurs à domaine de mort. Cet effet anti-apoptotique a été observé uniquement en condition de stress cellulaire dans la lignée B mature (BL2) après un jour de privation sérique et dans la lignée plasmocytaire (U266) uniquement au 3^e jour de privation. Ces résultats impliquent que l'expression membranaire des récepteurs, induite au cours de la privation sérique, est le préalable requis pour que l'effet anti-apoptotique de la neurotensine puisse être détectable.

Les données concernant les voies de signalisations mise en jeu dans l'effet anti-apoptotique de la neurotensine sont peu nombreuses et concernent différents modèles de cancers solides. L'action anti-apoptotique de la neurotensine est bloquée par des inhibiteurs de la protéine kinase C (PKC), voie de signalisation également impliquée dans la résistance à l'apoptose des lymphomes B [333, 334]. Cet effet protecteur peut également s'expliquer par l'action activatrice de la neurotensine sur l'expression du gène Bcl-2 décrite au niveau de lignées de cancers bronchiques [178]. Enfin, les effets anti-apoptotiques de la neurotensine *via* son interaction à NTSR-1 sont bloqués par les inhibiteurs de Erk [175]. Il n'existe, en revanche, aucune donnée dans la littérature concernant l'influence de la neurotensine sur l'apoptose induite par FAS dans les cancers solides.

Les différents récepteurs de la neurotensine sont potentiellement impliqués dans ces mécanismes de survie. Outre les récepteurs NTSR-1 et -3, exprimés dans les lignées B les plus matures, nous avons observé une expression membranaire de NTSR-2 dans la plupart des lignées B étudiées à l'exception de la lignée pré-B pour laquelle l'expression membranaire

demeurait faible. Parallèlement, nous n'avons pas observé d'effet protecteur de la neurotensine exogène dans ces lignées immatures, en condition apoptotique. Cette absence de réponse à la neurotensine exogène pourrait être liée à la diminution de l'expression membranaire de NTSR-2 dont le rôle protecteur anti-apoptotique, induit par la neurotensine, a été démontré dans des cellules β pancréatiques en conditions apoptotiques [116]. Ainsi ces données permettent d'évoquer que l'effet anti-apoptotique de la neurotensine dans les lignées B pourrait également être sous la dépendance de NTSR-2.

La neurotensine a été définie comme neuropeptide dont la fonction majeure est d'activer les voies de survie [335]. L'analyse de l'effet trophique de ce neuropeptide sur les différentes lignées B a démontré que ce facteur activait la prolifération et exerçait une action anti-apoptotiques au niveau des stades les plus matures. Au sein des deux populations lymphocytaires, cette fonction n'avait été démontrée jusqu'alors qu'au sein des LT [179-181].

D. Les récepteurs impliqués n'ont pu être identifiés

Les approches pharmacologiques par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques ou d'anticorps antagonistes des différents récepteurs n'ont pas permis de conclure à la spécificité d'un ou plusieurs récepteurs dans la transduction du signal. En effet, en présence d'un inhibiteur spécifique du récepteur NTSR-1 [295], un effet anti-apoptotique est observé. De plus, l'action conjointe de cet inhibiteur et de la neurotensine annihile les effets protecteurs de la neurotensine.

Dans le cas de l'utilisation de la lévocabastine, inhibiteur pharmacologique de NTSR-2 [296, 336], aucun effet n'est observé. En revanche, l'utilisation conjointe de l'inhibiteur et de la neurotensine révèle une diminution de l'apoptose. Les effets de la lévocabastine sont très controversés dans la littérature, avec une action antagoniste dans certains cas [121, 337] et agoniste dans d'autres cas [329]. Ces données pourraient expliquer l'effet observé dans cette étude.

L'utilisation d'un anticorps antagoniste du récepteur NTSR-3 permet de confirmer l'implication de ce récepteur dans la modulation de l'apoptose induite par la déprivation. Compte tenu de ces résultats et des précédentes données du laboratoire [88] cf **annexe 6**, nous

pouvons conclure que l'utilisation de cet inhibiteur entraîne une inhibition de l'interaction p75^{NTR}/ NTSR-3. De plus, on peut supposer que l'action conjointe de l'inhibiteur et de la neurotensine permet à la fois d'inhiber l'action des proneurotrophines pro-BDNF en faveur des neurotrophines mature BDNF [14, 88] et d'activer les signaux de prolifération induits par la neurotensine. Afin de valider cette hypothèse, il conviendrait d'utiliser des inhibiteurs des ligands, pro-BDNF d'une part et BDNF d'autre part. De plus, il serait également judicieux d'interagir sur les différents complexes des récepteurs p75^{NTR} et Trk, par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques tels que le K252a pour les récepteurs Trk [338, 339] en faveur donc de la transmission d'un signal pro ou anti-apoptotique selon l'équilibre [89, 94, 140].

On peut également supposer, compte tenu de la présence de ces différents neuropeptides au sein des LB, qu'il existe plusieurs mécanismes de survie et de prolifération faisant intervenir d'une part les neurotrophines et leurs récepteurs et d'autre part, la neurotensine et ses récepteurs.

De plus, il a été démontré que la neurotensine favorisait l'internalisation de son récepteur NTSR-1 après activation et que ce dernier était dégradé tandis que NTSR-2 était recyclé [107, 340]. La sortiline contribue également à la régulation de la neurotensine [341].

La présence des 3 récepteurs au niveau lymphocytaire B et la formation des différents hétérodimères nécessaires à la transduction du signal suggère la formation d'un ou de plusieurs de ces complexes au niveau lymphocytaire.

Afin de répondre à cette interrogation, il conviendrait d'effectuer des analyses biochimiques d'immunoprécipitation ou d'immunocytochimie ainsi que des approches moléculaires avec le développement de modèles shRNA (Small hairpin RNA) afin d'inactiver spécifiquement l'expression de ces différents récepteurs.

La neurotensine exerce ses fonctions à l'aide de ses 3 récepteurs qui vont véhiculer différents signaux. Ainsi, NTSR-1 va interagir dans la modulation de l'expression du phosphate inositol, des acteurs de la voie des MAPK, et de l'expression des molécules AMPc et GMPc [167, 342, 343]. NTSR-2 intervient également dans la modulation du Ca²⁺ intracellulaire et l'activation des éléments de la voie des MAPK [92, 296, 329]. NTSR-3 va également permettre l'activation d'ERK et de la voie AKT [344]. Afin de déterminer les voies de signalisation impliquées dans les processus de survie lymphocytaire B, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des différentes voies d'activation (PI3K, PLC, PKC, MAPK) tels que la wortmanine pour la PI3K serait envisageable.

Enfin, il a été démontré les récepteurs Trk pouvaient être activés par transactivation avec les RCPG [345-347]. Ceci a été décrit notamment avec le récepteur à l'EGF [348]. De plus, les récepteurs Trk peuvent être activés en absence de leurs ligands [349-351]. Il conviendrait d'étudier une possible activation des récepteurs Trk par transactivation avec les récepteurs NTSR afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu au niveau LB.

E. La neurotensine est impliquée dans les processus de tumorigénèse B

L'analyse des récepteurs et du neuropeptide en conditions non pathologiques a permis d'établir la relation entre la présence du récepteur NTSR-1 et les processus tumoraux. En effet, seuls les récepteurs NTSR-2 et NTSR-3 ont été détectés chez l'individu sain. Toutefois, il a été démontré que le récepteur NTSR-3 pouvait contribuer à la progression des processus tumoraux [326]. De plus, contrairement aux lignées B matures humaines d'origine tumorale, la neurotensine n'a pas été détectée dans les LB matures sains. Ces données sont en faveur du rôle prépondérant de l'interaction de la neurotensine et de son récepteur NTSR1 au cours des processus tumoraux qui pourrait être associée à la survie des cellules lymphocytaires tumorales, par l'inhibition de signaux apoptotiques.

Le rôle important du couple NTSR1/ligand a été avancé dans de nombreuses pathologies cancéreuses, pancréas, prostate, sein, colon, poumon [117, 175, 176, 178, 352-355].

Le rôle de la neurotensine et de son récepteur de haute affinité a donc été établi dans de nombreuses pathologies cancéreuses. Les résultats que nous avons obtenus avec les lignées lymphocytaires B humaines viennent confirmer l'implication de la neurotensine et de NTSR1 dans les hémopathies lymphoïdes. De plus, par ses effets trophiques et anti-apoptotiques, ce neuropeptide et son récepteur NTSR-1 pourraient constituer des marqueurs de mauvais pronostics comme cela vient d'être démontré dans le cancer bronchique [114] et dans le mésothéliome, pour lesquels l'expression de la neurotensine est associée à la gravité de la maladie [160].

F. Neurotensine et récepteur NTSR-3 (sortiline) : fonction régulatrice de la survie cellulaire?

L'analyse des différents transcrits a révélé la présence des récepteurs NTSR-2 et NTSR-3 au sein de LB sains. Contrairement aux résultats observés pour les lignées, nous pouvons conclure que ces 2 récepteurs sont exprimés de façon constitutive au sein des LB.

En revanche, chez la souris, seule la sortiline a été détectée dans les lignées lymphocytaires tumorales comme dans les lymphocytes B normaux. La sortiline jouerait donc un rôle clé dans les processus de maturation et de développement B par sa double fonction. En effet, le rôle de la sortiline en tant que transporteur des neurotrophines matures a été récemment mis en évidence dans les lymphocytes B humains [88]. Sa fonction de co-récepteur pour $p75^{\text{NTR}}$ a également été démontrée, la neurotensine agissant sur l'hétérodimère $p75^{\text{NTR}}$ /NTSR-3 par compétition d'affinité inhibant ainsi les effets pro-apoptotique des pro-neurotrophines [130]. La sortiline pourrait donc intervenir en condition physiologique dans le maintien de la balance mort/survie cellulaire par son interaction avec la neurotensine et avec les neurotrophines.

II Neurotrophines et MAI

A. Neurotrophines et LED

Dans cette étude, il a été mis en évidence une augmentation des taux sériques de NGF chez les lupiques par rapport aux témoins. Ces résultats sont en accord avec les résultats précédemment obtenus dans la littérature où une augmentation des concentrations sériques de NGF chez les patients LED par rapport aux témoins volontaires sains avait été démontrée [247, 249]. Ces deux premières études ne s'étaient pas attaché à définir une corrélation entre l'expression sérique de cette NT et l'activité clinique [247, 249]. Plus récemment, il a été observé des taux de NGF presque dix fois plus élevés chez des enfants atteints de LED que chez les témoins, et une corrélation significative entre l'élévation des concentrations de NGF et le score d'activité clinico-biologique (SLEDAI) a été établi chez l'enfant [258]. Cependant, contrairement aux données de la littérature [258], nous n'avons pas pu mettre en évidence une corrélation entre l'élévation des concentrations sériques de NGF et le score de SLEDAI. Plusieurs hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer cette différence ; la première est que la population d'enfant étudiée par l'équipe d'Aloe se caractérise par des LED extrêmement sévères et la moitié d'entre eux ont un SLEDAI > 30 avec des atteintes viscérales multiples graves neurologiques et rénales. Par ailleurs, notre population de patients adultes est plus hétérogène, avec peu de patients non traités entièrement et des poussées moins sévères, cutané-articulaires beaucoup plus nombreuses que dans cette étude.

Aucune corrélation n'a pu être établit entre les différentes atteintes systémiques et les taux de NGF. De même, aucune relation n'a été établit entre la qualité de vie du malade et les taux de NGF.

En revanche, lors de l'étude du profil biologique de la maladie, il a été mis en évidence une corrélation négative entre l'augmentation des taux sériques de NGF et le nombre de LTreg circulants. Les études concernant le lupus et les LTreg chez l'adulte révèlent une diminution de l'expression de ces cellules chez le patient [356-358]. De plus, d'autres données concernant le lupus chez l'enfant reportent une corrélation inverse dans l'expression de ces LT et la gravité de la maladie, faisant ainsi apparaître un défaut d'activité de ces

cellules [359]. Ces résultats suggèrent un effet négatif de cette NT dans le recrutement de ces LT et ainsi dans les mécanismes mis en place pour limiter la réponse inflammatoire [360].

L'implication du NGF dans la physiopathologie lupique est renforcée par les résultats de la cytométrie en flux et plus particulièrement par l'augmentation de la production lymphocytaire B de NGF chez les patients présentant une activation du complément, marqueur biologique associé à la gravité potentielle des poussées lupiques[361]. Ce lien existant entre production lymphocytaire de NGF et marqueur biologique d'activité est renforcé par les corrélations existant entre le nombre de cellules lymphocytaires B produisant du NGF et le ratio d'anti-DNA natif. Il existe également une augmentation de la production lymphocytaire B de NGF chez les patients présentant des anticorps anti-phospholipides, corrélation que nous avons déjà établi dans la sclérodermie (*Lise et al, Plos One accepted*). L'augmentation de production lymphocytaire B de NGF pourrait correspondre à une action autocrine sur la survie des lymphocytes B auto-réactifs [204]. De plus, on peut émettre l'hypothèse de mécanismes paracrines sur les autres acteurs de la réponse immune.

Les concentrations de NGF restent élevées avant et après la poussée lupique, suggérant que cette NT est impliquée dans la physiopathologie du LED indépendamment des thérapeutiques mises en route pour le contrôle de la poussée. Des résultats similaires avaient été mis en évidence par notre groupe dans le Sjögren ou l'augmentation des concentrations sériques de NGG apparaît indépendante des traitements immunomodulateurs utilisés [267]. Parallèlement, les anti-TNF n'influencent pas non plus l'élévation des concentrations sériques de cette NT au cours de l'évolution de la PR [250]. Cette relative stabilité de l'augmentation des concentrations de NGF au cours du LED ne reflète pas l'altération de la qualité de vie au cours de la pathologie, les fluctuations du NGF variant indépendamment de la SF36.

Concernant le BDNF, nous avons observé une augmentation des taux sériques chez les patients par rapport aux témoins et ce indépendamment de l'existence d'une atteinte neurologique. Cette relation n'avait été décrite jusqu'alors que dans le cas de lupus cérébral [262] où cette NT pourrait être défini comme marqueur biologique des atteintes psychiatriques liées à cette pathologie [263].

En revanche, aucune relation n'a été établit entre les concentrations sériques de BDNF et l'activité de la maladie, les atteintes systémiques, et l'évaluation de la qualité de vie du patient. Cependant, une diminution des taux les concentrations de BDNF est observée après le traitement de la poussée (diminution néanmoins supérieure aux taux sériques observés pour le

groupe témoin) suggérant l'existence d'un lien entre activité et concentrations sériques de cette NTs. Le faible effectif et la disparité des atteintes cliniques de notre cohorte pourraient avoir sous-estimé le rôle de cette NT dans l'activité lupique.

En revanche, une relation a été mise en évidence entre la diminution des taux sériques de BDNF et la présence d'anti- β 2GPI, d'anti-cardiolipides ou d'anti-coagulants circulants.

Ainsi, ces résultats confirment que l'existence d'un stress oxydatif vasculaire, reflété par la présence d'anticorps anti-phospholipides peut abaisser les concentrations circulantes de BDNF [362, 363], données que nous avons déjà observées au cours de la SS.

L'analyse de l'expression lymphocytaire de cette NT n'a révélé aucune différence entre les patients et les témoins. Toutefois, il a été démontré que la synthèse de BDNF au niveau lymphocytaire B était augmentée en cas d'atteinte cutané-articulaire. De même qu'au niveau lymphocytaire T où la production est augmentée chez les patients présentant un score de SLEDAI élevé, suggérant, la encore l'implication de cette NT dans l'activité lupique.

Aucune différence significative n'a été observée pour les taux sériques de NT-3 entre les patients et les témoins. En revanche, une augmentation des taux de NT-3 est observée uniquement chez les patients atteints de LED sévères. Ces résultats suggèrent un rôle de cette NT dans la gravité de cette pathologie, donnée qui jusqu'alors n'a pas été établie. Ainsi, pour la première fois, nous suggérons l'existence d'une implication physiopathologique de la NT-3 dans les MAI, implication que laissait pressentir le rôle anti-apoptotique de cette NT-3 vis à vis des cellules B et des plasmocytes au cours des pathologies allergiques [202].

L'évaluation du profil clinique de la maladie a révélé une association entre l'élévation des taux de NT-3 et les atteintes articulaires, donnée déjà relevée dans la sclérodermie (*Lise et al Plos accepted*). L'activation du complément est associée à une augmentation des taux sériques de NT-3. De plus, l'expression lymphocytaire T de NT-3 est corrélée positivement aux concentrations sériques d'INF- γ . Tous ces résultats viennent étayer l'importance de cette NT dans l'activité de la maladie.

L'expression lymphocytaire de cette NT n'a révélé aucune différence entre le groupe des patients et le groupe des témoins. En revanche, il a été observé une diminution de l'expression de cette NT au niveau des LT suite au traitement sous hydroxychloroquine.

L'analyse des différents facteurs susceptibles d'être impliqués lors de cette pathologie [364] a révélé une augmentation des concentrations sériques de BAFF, de l'IL-10

et de l'IFN- γ chez les lupiques par rapport aux témoins. Toutefois, aucune relation n'a pu être établit entre les variations des taux des NTs et le profil immunologique (Th1, Th2) ou l'expression de BAFF chez les lupiques. Ainsi, l'augmentation des concentrations sériques du NGF et du BDNF au cours du LED semble indépendante des profils Th1 et Th2. L'absence de corrélation entre NGF et BAFF découlent vraisemblablement de leurs processus d'activation B respectivement CD40 indépendante et dépendante [365, 366].

Une relation entre la gravité de la maladie et l'expression de TrkB au niveau lymphocytaire T a été mise en évidence de même que différente modulation de l'expression lymphocytaire B et T des récepteurs aux NTs en fonction du profil clinique lupique.

L'ensemble de ces données suggèrent l'existence d'un profil d'expression lymphocytaire des récepteurs aux NTs en fonction du profil clinique. Ces résultats cytométriques ainsi que l'augmentation des concentrations sériques des NTs au cours du LED révèlent l'implication de ces NTs dans le développement de cette pathologie, suggérant de possibles cibles thérapeutiques pour cette pathologie.

B. Neurotrophines et SGSp

Dans cette étude, nous avons, pour la première fois dans la littérature, étudié le profil sérique, salivaire et lymphocytaire de neurotrophines au cours du syndrome de Gougerot-Sjögren primitif en comparaison à une cohorte de témoins volontaires sains appariés par l'âge et le sexe.

Dans un premier temps, nous avons étudié le profil d'expression du NGF, BDNF et de la NT-3 chez les patients atteints de SGSp et chez les volontaires sains. Comme cela est désormais bien établi dans la littérature, nous avons retrouvé une diminution des taux de BDNF chez les patients présentant des traits dépressifs avec un score de MADRS élevé ou une qualité de vie diminuée [367]. A l'inverse, il existe une corrélation négative concernant les concentrations sériques de NT-3 et le MCS du SF36, résultat à nouveau en accord avec les quelques données existant actuellement sur ce sujet montrant une élévation des taux sériques de NT-3 lors des accès dépressifs des psychoses bipolaires [235].

Nous avons tout d'abord constaté des taux sériques de NGF augmentés chez les SGSp et notamment chez les patients porteurs d'une atteinte systémique par rapport aux volontaires sains. Cette élévation sérique du NGF a déjà été mise en évidence dans deux autres maladies autoimmunes le LES et la sclérodémie systémique où elle était d'ailleurs corrélée à la diffusion systémique [247, 286]. Lors d'une première étude dans notre laboratoire, nous avons également retrouvé cette augmentation du NGF chez des patients atteints de SGSp [267]. L'étude que nous avons réalisée chez les patients sclérodermiques retrouvait des taux de NGF significativement plus élevés chez les patients présentant une atteinte articulaire lors du prélèvement (*Lise et al Plos accepted*). Nous montrons également une association entre NGF et atteinte articulaire chez les patients atteints de SGSp. En effet, non seulement les patients ayant une atteinte articulaire ont des taux sériques plus élevés de NGF mais présentent également une moyenne de fluorescence du NGF augmentée dans les LB et surtout les LT. Cette relation NGF / atteinte articulaire a été mise en évidence dans d'autres pathologies auto-immunes, notamment dans les rhumatismes inflammatoires chroniques [368].

De façon très intéressante, cette atteinte articulaire est également associée avec des moyennes de fluorescence membranaire lymphocytaire B et T diminuées de TrkA et p75^{NTR} alors qu'à l'inverse, les pourcentages et les moyennes de fluorescence membranaires aussi bien qu'intracytoplasmiques sont augmentés pour la sortiline. L'augmentation de l'expression de la sortiline membranaire dans l'atteinte articulaire a pour corollaire la diminution de l'expression de p75^{NTR}, donnée assez paradoxale compte tenu de la nécessité qu'à cette protéine de s'associer à un corécepteur. Deux hypothèses sont envisageables, soit la sortiline est associée à un autre co-récepteur comme NTR-1 ou NTR-2, soit le site antigénique de p75^{NTR} reconnu par l'anticorps utilisé dans ce travail est peu accessible lorsque p75^{NTR} est complexé à la sortiline.

Le lien entre NGF et atteinte articulaire est maintenant bien établi avec de nombreux articles retrouvant des taux élevés de cette NT dans le liquide synovial ou le sang de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde [368], de spondylarthrite ankylosante [224]. Dans les travaux actuellement publiés sur le sujet, les auteurs rapportent également une expression augmentée de TrkA et de p75^{NTR} par rapport aux témoins au sein des cellules présentes dans les articulations inflammatoires [255] mais aucune ne s'intéresse à l'expression de la sortiline par les lymphocytes ou les synoviocytes. Nos résultats peuvent sembler en contradiction avec ceux-ci, cependant, nous avons étudié les lymphocytes circulants et non les cellules

monoculées intra-articulaires. Il est très probable qu'il existe au niveau local d'autres expressions que celles retrouvées dans les cellules du sang périphérique comme cela a été montré dans la polyarthrite rhumatoïde et la spondylarthrite ankylosante. En effet, les métalloprotéases présentes en quantités excessives au sein des lésions de synovites peuvent moduler le ratio de pro-NGF / NGF et ainsi l'expression membranaire de leurs récepteurs.

Alors que la relation entre atteinte articulaire et NGF semble maintenant bien établie dans les MAI, nous n'avons pas pu trouver de lien entre atteinte neurologique et NGF alors que celui-ci pouvait être logiquement attendu au vu de l'importance du NGF dans la physiopathologie des lésions du système nerveux. Le faible effectif de patients présentant une atteinte neurologique pourrait expliquer ce résultat discordant. Il est cependant intéressant de noter que les concentrations de NGF sont statistiquement abaissées chez les patients sous antalgiques, ce qui tend également à prouver le rôle de cette NT dans la douleur chronique au cours du SGSp.

Lors de la première étude réalisée dans notre laboratoire sur NTs et SGSp, nous avons aussi mis en évidence des taux de BDNF significativement plus importants chez les patients atteints de SGSp que chez les témoins. En revanche, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences de concentrations sériques de BDNF dans ce travail entre les SGSp et les témoins. Cependant, les concentrations de BDNF sont significativement augmentées chez les SGSp avec une atteinte systémique articulaire ou vascularitique, cette dernière étant une des atteintes systémiques corrélées avec un pronostic plus sévère notamment via son lien fort avec la présence d'une cryoglobulinémie [369].

De façon très intéressante, il existe une nette tendance à une corrélation positive entre la concentration sérique en BDNF et le score d'activité SJSDAI même si *p* n'est pas encore significatif ; les inclusions suivantes permettront sans doute d'atteindre le seuil de significativité. C'est la première fois que cette corrélation est retrouvée alors qu'un lien du même type avait déjà été mis en évidence chez les patients lupiques entre NGF et SLEDAI ou NGF et sévérité et diffusion des atteintes cliniques [258]. L'existence d'une vascularite cutanée est aussi liée avec des pourcentages et des concentrations de sortiline membranaire et intralymphocytaire B et T augmentés. La même association est retrouvée pour le BDNF sérique avec une élévation de l'intensité de la moyenne de fluorescence intra-lymphocytaire B de la sortiline. Il semble donc se dégager un rôle du BDNF dans la sévérité et l'activité du

SGSp peut-être via une atteinte systémique et mettant en jeu non pas son récepteur de haute affinité TrkB ou p75^{NTR} mais la sortiline. Conformément aux résultats antérieurs du laboratoire concernant le rôle anti-apoptotique du BDNF mais également l'augmentation de la présence du BDNF et de la sortiline dans des LB matures sains après stimulation par un mitogène ([88], il paraît donc plausible d'envisager le BDNF dans le SGSp comme un facteur autocrine favorisant en présence d'un stress la survie de LB autoréactifs ou producteurs d'une cryoglobuline avec comme corolaire une diffusion systémique plus importante et donc un score d'activité majoré. De plus, nous avons également mis en évidence auparavant dans notre laboratoire l'existence d'une corrélation positive chez des patients atteints de SGSp entre taux sériques de BDNF et activation des LT, et particulièrement des CD4+, via leur expression d'HLA-D [267].

Comme dans certaines études précédentes, nous ne retrouvons pas d'influence de la prise d'un traitement par corticoïdes ou par immunosuppresseurs sur les taux sériques de NGF ou sur ceux de BDNF [250, 370]. Ceci semble impliquer que, si les cytokines pro-inflammatoires sont capables d'entraîner la sécrétion des NTs par différents types cellulaires dont les lymphocytes en situation inflammatoire comme dans l'asthme, leurs concentrations sériques dans les MAI ne reflètent pas directement la modulation éventuelle de leurs synthèses cellulaires lymphocytaires, la majorité du contingent circulant de NGF et de BDNF étant produit par les glandes salivaires. Cependant, nous avons pu retrouver une élévation significative de la concentration intra-cellulaire du NGF dans les LB chez les patients sous immunosuppresseurs par rapport aux autres pouvant refléter soit une augmentation de la synthèse de cette NT par les LB sous immunosuppresseurs ou à l'inverse l'absence de sécrétion active de cette NT lors de ces traitements.

La NT-3 a tendance à être augmentée chez les patients prenant du Plaquénil aussi bien au niveau des taux sériques que de la moyenne de fluorescence dans les LB alors qu'ils sont diminués chez les patients sous corticothérapie. Nous avons déjà mis en évidence cette augmentation de la NT-3 sérique chez les patients sclérodermiques sous Plaquénil par rapport à ceux sans ce traitement (*Lise et al Plos accepted*). Il n'y a pas de données disponibles dans la littérature retrouvant la sécrétion moindre de NT-3 chez les hommes, nous confirmerons peut-être ces résultats à la fin de ce travail, quatre hommes seulement étant actuellement intégrés.

Concernant la sortiline, l'équipe de Rogers retrouve une expression membranaire de sortiline sur la majorité des LNK, la moitié des LB et quelques rares LT, ces résultats ayant été obtenus chez huit volontaires sains [89]. A noter cependant que le seuil de positivité est fixé à partir d'un contrôle utilisant l'anticorps secondaire seul et non un isotypique de même sous-classe que l'anticorps primaire utilisé, il existe donc un risque de surestimation des résultats. Nos résultats montrent une expression de sortiline membranaire lymphocytaire B et T incontestable aussi bien chez les patients, avec même une expression corrélée entre LB et LT, que chez les volontaires sains mais largement inférieure à celle décrite par Rogers pour les LB, de l'ordre de quelques pourcents. Il existe également une tendance à des valeurs plus élevées à la surface des LB que des LT et chez les patients par rapport aux témoins, aucune différence significative n'ayant cependant pu être mise en évidence. La présence de très hauts pourcentages membranaires de sortiline chez deux patients présentant une maladie active avec des manifestations systémiques suggère une implication de celle-ci en tant que récepteur et non uniquement comme protéine de transport des neurotrophines et ce d'autant plus que la sortiline est corrélée négativement avec tous les autres récepteurs des NTs. Jusqu'à maintenant, la sortiline est essentiellement connue au niveau des LB pour avoir une action pro-apoptotique [88], il est possible qu'elle ait d'autres fonctions encore inconnues ou qu'elle agisse par l'intermédiaire de ses autres ligands comme la neurotensine ou les proNTs.

En intracytoplasmique, il existe une expression lymphocytaire massive de la sortiline, compatible avec certaines observations antérieures [88], et attendue au vu de son rôle de protéine de transport des NTs et de la sécrétion de celles-ci par les lymphocytes.

Chez les patients, nous avons pu mettre en évidence de nombreuses corrélations positives entre l'expression et l'intensité de fluorescence membranaire des différents récepteurs Trk et du p75^{NTR}. Ceci suggère un rétrocontrôle positif entre les récepteurs de haute affinité d'autant plus qu'il existe une corrélation négative avec l'expression de la sortiline ou alors un mécanisme de réponse groupée à une même stimulation. A noter également que les concentrations lymphocytaires T du BDNF sont corrélées avec l'intensité de l'expression membranaire de TrkA et de TrkC aussi bien au niveau des T que des B. Nous pouvons formuler l'hypothèse que l'activation des LT *via* différents stimuli notamment le stress déclenche la production de BDNF couplée à celles des récepteurs de haute affinité rendant la cellule plus réceptive à une activation autocrine et paracrine contribuant ainsi à pérenniser son activation. Il ne s'agit cependant encore que d'une simple supposition, peu de données étant disponibles pour confirmer nos premiers résultats.

Pour le NGF, nous retrouvons une expression faible dans les LB et plus importante dans les LT avec une tendance à une augmentation des valeurs chez les patients par rapport aux volontaires sains, en accord avec les résultats obtenus dans la polyarthrite et la spondylarthrite ankylosante [286, 368, 371]. Les différences d'expression des NTs et de leurs récepteurs observées au niveau lymphocytaire B chez les LED et les SGSp pourraient également être sous-entendu par les anomalies de répartitions B observées au cours du SGSp avec augmentation des LB matures 2 (LBm2, LB naïfs sélectionnés après leur passage dans la zone riche en LT d'un organe lymphoïde secondaire), et des LBm2', (LBm2 ayant rencontré une cellule dendritique interdigitante) au cours du SGSp[372]. En accord avec les travaux précédents décrivant des associations dans les MAI comme le LES, la sclérodermie ou la PR, entre taux sériques des NTs, expression de celles-ci et de leurs récepteurs au niveau de tissus sièges d'une réponse inflammatoire et activité ou sévérité de la maladie, notre étude apporte de nouveaux éléments en faveur d'une implication nette des NTs dans la physiopathologie de ces maladies.

Contrairement à ce qui a été décrit, nous n'avons pas pu détecter la présence de BDNF dans la salive. Ces résultats sont cependant à nuancer du fait que nous n'avions que des échantillons salivaires de patients. Il est nécessaire de les contrôler chez des volontaires sains afin de confirmer que cette absence n'est pas due à la maladie elle-même d'autant plus que les NTs semblent impliquées dans la réparation de la muqueuse orale [373] et sont exprimées au niveau des glandes salivaires [374]. Ceci est également en partie confirmé par l'absence de corrélation décelable entre les taux sériques et salivaires de NTs, plaidant pour une synthèse locale de celles-ci. Par ailleurs, nous avons demandé aux patients d'évaluer l'intensité de leur syndrome sec et la gêne qu'il leur occasionne afin de dégager d'éventuelles corrélations avec les taux salivaires des différentes NTs, d'autant plus qu'une étude a montré une excrétion salivaire de NGF élevée dans les syndromes de brûlures linguales chroniques *sine materia*, les concentrations excrétées variant avec le degré de stimulation sympathique de ces glandes salivaires [242]. Les résultats des questionnaires remis aux patients n'ont cependant pu être analysés lors de la rédaction de ce manuscrit.

Conclusion

Dans ce travail, nous avons tout d'abord confirmé le rôle majeur du NGF dans la physiopathologie de 3 maladies auto-immunes, le LED, le syndrome de Sjögren primitif ainsi que la sclérodémie systémique. Nous avons parallèlement mis en évidence l'importance du BDNF dans la physiopathologie de ces 3 connectivites. Ainsi, le BDNF apparaît être le reflet de l'hyperactivation B et de l'évolutivité clinique au cours du LED et du Sjögren. Cette NT joue vraisemblablement un rôle dans le stress oxydatif et la vasculopathie de la sclérodémie. Enfin, le rôle de la NT-3 dans les atteintes articulaires mais également systémiques graves des MAI se dégage de ce travail. Pour la première fois, une modulation de l'expression lymphocytaire des NTs, de leurs récepteurs et de la sortiline a été démontrée dans le LED et le Sjögren.

Ce travail a également permis de mettre en évidence pour la première fois la présence de la neurotensine et de ses récepteurs au sein des LB et de démontrer les effets engendrés par l'interaction ligand / récepteur dans l'homéostasie de ces cellules, la neurotensine exerçant un effet anti-apoptotique et prolifératif en situation de stress induit par la privation sérique et l'activation du récepteur Fas. La neurotensine a également été identifiée comme acteur potentiel des processus de maturation B, son expression étant restreinte aux lignées plasmocytaires. De plus, nous avons prouvé que l'interaction entre la neurotensine et son récepteur de haute affinité NTSR-1 était associée à la malignité des lymphocytes B comme cela a été démontré par d'autres équipes pour des tumeurs solides. L'étude pionnière que nous avons réalisée avec les LB humains sains a permis de mettre en évidence la présence des récepteurs NTSR-2 et NTSR-3 suggérant l'existence d'une interaction ligand / récepteur potentielle dans la réponse immune adaptative, l'implication de la neurotensine n'ayant été jusqu'alors démontrée que dans l'immunité innée. Les études préliminaires effectuées sur le modèle murin ont permis de démontrer que NTSR-3 est conservé au cours des espèces, soulignant ainsi le caractère fondamental de cette protéine dans le développement B.

Ainsi, une connaissance approfondie des mécanismes impliquant la neurotensine dans l'homéostasie lymphocytaire B permettra peut être dans les années à venir de mieux comprendre les phénomènes de dérégulations de la réponse immune, notamment *via* la sortiline protéine à la fois de transport des neurotrophines et récepteur de la neurotensine.

Références

1. Angeletti, P.U., R. Levi-Montalcini, and P. Calissano, *The nerve growth factor (NGF): chemical properties and metabolic effects*. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1968. 31: p. 51-75.
2. Levi-Montalcini, R. and S. Cohen, *In Vitro and in Vivo Effects of a Nerve Growth-Stimulating Agent Isolated from Snake Venom*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1956. 42(9): p. 695-699.
3. Barde, Y.A., D. Edgar, and H. Thoenen, *Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain*. Embo J, 1982. 1(5): p. 549-53.
4. Hohn, A., et al., *Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family*. Nature, 1990. 344(6264): p. 339-41.
5. Maisonpierre, P.C., et al., *Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF*. Science, 1990. 247(4949 Pt 1): p. 1446-51.
6. Ip, N.Y., et al., *Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(7): p. 3060-4.
7. Davies, A.M., et al., *Neurotrophin-4/5 is a mammalian-specific survival factor for distinct populations of sensory neurons*. J Neurosci, 1993. 13(11): p. 4961-7.
8. Ryden, M., et al., *Functional analysis of mutant neurotrophins deficient in low-affinity binding reveals a role for p75LNGFR in NT-4 signalling*. Embo J, 1995. 14(9): p. 1979-90.
9. McAllister, A.K., L.C. Katz, and D.C. Lo, *Neurotrophins and synaptic plasticity*. Annu Rev Neurosci, 1999. 22: p. 295-318.
10. Seidah, N.G., et al., *Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases*. Biochem J, 1996. 314 (Pt 3): p. 951-60.
11. Farhadi, H.F., et al., *Neurotrophin-3 sorts to the constitutive secretory pathway of hippocampal neurons and is diverted to the regulated secretory pathway by coexpression with brain-derived neurotrophic factor*. J Neurosci, 2000. 20(11): p. 4059-68.
12. Lee, R., et al., *Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins*. Science, 2001. 294(5548): p. 1945-1948.
13. Lessmann, V., K. Gottmann, and M. Malcangio, *Neurotrophin secretion: current facts and future prospects*. Prog Neurobiol, 2003. 69(5): p. 341-374.
14. Nykjaer, A., et al., *Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death*. Nature, 2004. 427(6977): p. 843-848.
15. Gray, K. and V. Ellis, *Activation of pro-BDNF by the pericellular serine protease plasmin*. FEBS Lett, 2008. 582(6): p. 907-10.
16. Petruska, J.C. and L.M. Mendell, *The many functions of nerve growth factor: multiple actions on nociceptors*. Neurosci Lett, 2004. 361(1-3): p. 168-71.
17. Meakin, S.O. and E.M. Shooter, *The nerve growth factor family of receptors*. Trends Neurosci, 1992. 15(9): p. 323-31.
18. Mahadeo, D., et al., *High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors*. J Biol Chem, 1994. 269(9): p. 6884-91.

19. Hempstead, B.L., et al., *High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor*. *Nature*, 1991. 350(6320): p. 678-83.
20. Barker, P.A. and E.M. Shooter, *Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75^{LNTR} reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells*. *Neuron*, 1994. 13(1): p. 203-15.
21. Sofroniew, M.V., C.L. Howe, and W.C. Mobley, *Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair*. *Annu Rev Neurosci*, 2001. 24: p. 1217-1281.
22. Mendell, L.M., K.M. Albers, and B.M. Davis, *Neurotrophins, nociceptors, and pain*. *Microsc Res Tech*, 1999. 45(4-5): p. 252-61.
23. Heese, K., et al., *NF-kappaB modulates lipopolysaccharide-induced microglial nerve growth factor expression*. *Glia*, 1998. 22(4): p. 401-7.
24. Elkabes, S., E.M. DiCicco-Bloom, and I.B. Black, *Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function*. *J Neurosci*, 1996. 16(8): p. 2508-21.
25. Yoshida, K. and F.H. Gage, *Fibroblast growth factors stimulate nerve growth factor synthesis and secretion by astrocytes*. *Brain Res*, 1991. 538(1): p. 118-26.
26. Friedman, W.J., et al., *Regulation of nerve growth factor mRNA by interleukin-1 in rat hippocampal astrocytes is mediated by NFkappaB*. *J Biol Chem*, 1996. 271(49): p. 31115-20.
27. Sornelli, F., et al., *NGF and NGF-receptor expression of cultured immortalized human corneal endothelial cells*. *Mol Vis*. 16: p. 1439-47.
28. Saruta, J., S. Sato, and K. Tsukinoki, *The role of neurotrophins related to stress in saliva and salivary glands*. *Histol Histopathol*. 25(10): p. 1317-30.
29. Eide, F.F., D.H. Lowenstein, and L.F. Reichardt, *Neurotrophins and their receptors--current concepts and implications for neurologic disease*. *Exp Neurol*, 1993. 121(2): p. 200-14.
30. Huang, E.J. and L.F. Reichardt, *Neurotrophins: roles in neuronal development and function*. *Annu Rev Neurosci*, 2001. 24: p. 677-736.
31. Eide, F.F., et al., *Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling*. *J Neurosci*, 1996. 16(10): p. 3123-9.
32. Patterson, S.L., et al., *Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice*. *Neuron*, 1996. 16(6): p. 1137-45.
33. Schmidt, H.D. and R.S. Duman, *The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior*. *Behav Pharmacol*, 2007. 18(5-6): p. 391-418.
34. Duman, R.S., et al., *Neuronal plasticity and survival in mood disorders*. *Biol Psychiatry*, 2000. 48(8): p. 732-9.
35. Dobrowsky, R.T., G.M. Jenkins, and Y.A. Hannun, *Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolysis. Modulation by co-expression of p75^{NTR} with Trk receptors*. *J Biol Chem*, 1995. 270(38): p. 22135-42.
36. Rossler, O.G. and G. Thiel, *Brain-derived neurotrophic factor-, epidermal growth factor-, or A-Raf-induced growth of HaCaT keratinocytes requires extracellular signal-regulated kinase*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. 286(5): p. C1118-29.
37. Besser, M. and R. Wank, *Cutting edge: clonally restricted production of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA by human immune cells and Th1/Th2-polarized expression of their receptors*. *J Immunol*, 1999. 162(11): p. 6303-6306.

38. Bayas, A., et al., *Modulation of cytokine mRNA expression by brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in human immune cells*. *Neurosci Lett*, 2003. 335(3): p. 155-158.
39. Bronzetti, E., et al., *A possible role of BDNF in prostate cancer detection*. *Oncol Rep*, 2008. 19(4): p. 969-74.
40. Fujimura, H., et al., *Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation*. *Thromb Haemost*, 2002. 87(4): p. 728-34.
41. Zhou, X.F. and R.A. Rush, *Localization of neurotrophin-3-like immunoreactivity in the rat central nervous system*. *Brain Res*, 1994. 643(1-2): p. 162-72.
42. McAllister, A.K., L.C. Katz, and D.C. Lo, *Opposing roles for endogenous BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth*. *Neuron*, 1997. 18(5): p. 767-78.
43. Paul, J., K. Gottmann, and V. Lessmann, *NT-3 regulates BDNF-induced modulation of synaptic transmission in cultured hippocampal neurons*. *Neuroreport*, 2001. 12(12): p. 2635-9.
44. Senut, M.C., et al., *Regional differences in responsiveness of adult CNS axons to grafts of cells expressing human neurotrophin 3*. *Exp Neurol*, 1995. 135(1): p. 36-55.
45. Rodriguez-Tebar, A., G. Dechant, and Y.A. Barde, *Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor*. *Neuron*, 1990. 4(4): p. 487-92.
46. Frade, J.M. and Y.A. Barde, *Nerve growth factor: two receptors, multiple functions*. *Bioessays*, 1998. 20(2): p. 137-45.
47. Liepinsh, E., et al., *NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor*. *Embo J*, 1997. 16(16): p. 4999-5005.
48. He, X.L. and K.C. Garcia, *Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75*. *Science*, 2004. 304(5672): p. 870-5.
49. Trim, N., et al., *Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation*. *Am J Pathol*, 2000. 156(4): p. 1235-43.
50. Gu, C., et al., *Oligodendrocyte apoptosis mediated by caspase activation*. *J Neurosci*, 1999. 19(8): p. 3043-9.
51. Bamji, S.X., et al., *The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death*. *J Cell Biol*, 1998. 140(4): p. 911-23.
52. Casaccia-Bonnett, P., L. Aibel, and M.V. Chao, *Central glial and neuronal populations display differential sensitivity to ceramide-dependent cell death*. *J Neurosci Res*, 1996. 43(3): p. 382-9.
53. Linggi, M.S., et al., *Neurotrophin receptor interacting factor (NRIF) is an essential mediator of apoptotic signaling by the p75 neurotrophin receptor*. *J Biol Chem*, 2005. 280(14): p. 13801-8.
54. Salehi, A.H., S. Xanthoudakis, and P.A. Barker, *NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway*. *J Biol Chem*, 2002. 277(50): p. 48043-50.
55. Wen, C.J., et al., *hNRAGE, a human neurotrophin receptor interacting MAGE homologue, regulates p53 transcriptional activity and inhibits cell proliferation*. *FEBS Lett*, 2004. 564(1-2): p. 171-6.
56. Bilderback, T.R., et al., *Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways*. *J Biol Chem*, 1999. 274(1): p. 257-63.

57. Brann, A.B., et al., *Nerve growth factor-induced p75-mediated death of cultured hippocampal neurons is age-dependent and transduced through ceramide generated by neutral sphingomyelinase*. J Biol Chem, 2002. 277(12): p. 9812-8.
58. Bazenet, C.E., M.A. Mota, and L.L. Rubin, *The small GTP-binding protein Cdc42 is required for nerve growth factor withdrawal-induced neuronal death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(7): p. 3984-9.
59. Harrington, A.W., J.Y. Kim, and S.O. Yoon, *Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis*. J Neurosci, 2002. 22(1): p. 156-66.
60. Casaccia-Bonnel, P., et al., *Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75*. Nature, 1996. 383(6602): p. 716-9.
61. Beattie, M.S., et al., *ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury*. Neuron, 2002. 36(3): p. 375-86.
62. Whitfield, J., et al., *Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release*. Neuron, 2001. 29(3): p. 629-43.
63. Geetha, T., et al., *TRAF6-mediated ubiquitination regulates nuclear translocation of NRIF, the p75 receptor interactor*. EMBO J, 2005. 24(22): p. 3859-68.
64. Gentry, J.J., et al., *A functional interaction between the p75 neurotrophin receptor interacting factors, TRAF6 and NRIF*. J Biol Chem, 2004. 279(16): p. 16646-16656.
65. Park, J.A., et al., *Co-induction of p75NTR and p75NTR-associated death executor in neurons after zinc exposure in cortical culture or transient ischemia in the rat*. J Neurosci, 2000. 20(24): p. 9096-103.
66. Chittka, A. and M.V. Chao, *Identification of a zinc finger protein whose subcellular distribution is regulated by serum and nerve growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(19): p. 10705-10.
67. Arevalo, J.C. and S.H. Wu, *Neurotrophin signaling: many exciting surprises!* Cell Mol Life Sci, 2006. 63(13): p. 1523-1537.
68. Klein, R., et al., *The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor*. Cell, 1991. 65(1): p. 189-97.
69. Martin-Zanca, D., S.H. Hughes, and M. Barbacid, *A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences*. Nature, 1986. 319(6056): p. 743-8.
70. Suzuki, T., et al., *Lack of high-affinity nerve growth factor receptors in aggressive neuroblastomas*. J Natl Cancer Inst, 1993. 85(5): p. 377-84.
71. Nakagawara, A., *Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development*. Cancer Lett, 2001. 169(2): p. 107-114.
72. Lamballe, F., R. Klein, and M. Barbacid, *The trk family of oncogenes and neurotrophin receptors*. Princess Takamatsu Symp, 1991. 22: p. 153-70.
73. Barbacid, M., *The Trk family of neurotrophin receptors*. J Neurobiol, 1994. 25(11): p. 1386-403.
74. Urfer, R., et al., *An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors*. Embo J, 1995. 14(12): p. 2795-805.
75. Perez, P., et al., *NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains*. Mol Cell Neurosci, 1995. 6(2): p. 97-105.
76. Huang, E.J. and L.F. Reichardt, *Trk receptors: roles in neuronal signal transduction*. Annu Rev Biochem, 2003. 72: p. 609-42.

77. Stephens, L., et al., *A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits*. *Cell*, 1994. 77(1): p. 83-93.
78. Obermeier, A., et al., *Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/Trk binding sites for SHC and PLC gamma*. *Embo J*, 1994. 13(7): p. 1585-90.
79. Kaplan, D.R., et al., *The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor*. *Science*, 1991. 252(5005): p. 554-8.
80. Yano, H. and M.V. Chao, *Neurotrophin receptor structure and interactions*. *Pharm Acta Helv*, 2000. 74(2-3): p. 253-60.
81. Teng, K.K., et al., *v-Crk modulation of growth factor-induced PC12 cell differentiation involves the Src homology 2 domain of v-Crk and sustained activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway*. *J Biol Chem*, 1995. 270(35): p. 20677-85.
82. Chao, M.V., R. Rajagopal, and F.S. Lee, *Neurotrophin signalling in health and disease*. *Clin Sci (Lond)*, 2006. 110(2): p. 167-73.
83. Lamballe, F., R. Klein, and M. Barbacid, *trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3*. *Cell*, 1991. 66(5): p. 967-79.
84. Segal, R.A., *Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations*. *Annu Rev Neurosci*, 2003. 26: p. 299-330.
85. Petersen, C.M., et al., *Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography*. *J Biol Chem*, 1997. 272(6): p. 3599-605.
86. Nyborg, A.C., et al., *Sortilin, SorCS1b, and SorLA Vps10p sorting receptors, are novel gamma-secretase substrates*. *Mol Neurodegener*, 2006. 1: p. 3.
87. Hermans-Borgmeyer, I., et al., *Expression of the 100-kDa neurotensin receptor sortilin during mouse embryonal development*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999. 65(2): p. 216-9.
88. Fauchais, A.L., et al., *Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival*. *J Immunol*, 2008. 181(5): p. 3027-38.
89. Rogers, M.L., et al., *ProNGF mediates death of Natural Killer cells through activation of the p75NTR-sortilin complex*. *J Neuroimmunol*, 2010. 226(1-2): p. 93-103.
90. Westergaard, U.B., et al., *Functional organization of the sortilin Vps10p domain*. *J Biol Chem*, 2004. 279(48): p. 50221-50229.
91. Lin, B.Z., P.F. Pilch, and K.V. Kandrор, *Sortilin is a major protein component of Glut4-containing vesicles*. *J Biol Chem*, 1997. 272(39): p. 24145-7.
92. Botto, J.M., et al., *Identification and expression of a variant isoform of the levocabastine-sensitive neurotensin receptor in the mouse central nervous system*. *FEBS Lett*, 1997. 400(2): p. 211-4.
93. Chen, Z.Y., et al., *Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway*. *J Neurosci*, 2005. 25(26): p. 6156-6166.
94. Teng, H.K., et al., *ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin*. *J Neurosci*, 2005. 25(22): p. 5455-5463.
95. Jansen, P., et al., *Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury*. *Nat Neurosci*, 2007. 10(11): p. 1449-1457.
96. Carraway, R. and S.E. Leeman, *The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami*. *J Biol Chem*, 1973. 248(19): p. 6854-6861.

97. Rostene, W.H. and M.J. Alexander, *Neurotensin and neuroendocrine regulation*. *Front Neuroendocrinol*, 1997. 18(2): p. 115-173.
98. Carraway, R., et al., *Neurotensin stimulates exocytotic histamine secretion from rat mast cells and elevates plasma histamine levels*. *J Physiol*, 1982. 323: p. 403-414.
99. Vincent, J.P., *Neurotensin receptors: binding properties, transduction pathways, and structure*. *Cell Mol Neurobiol*, 1995. 15(5): p. 501-512.
100. Ernst, A., S. Hellmich, and A. Bergmann, *Proneurotensin 1-117, a stable neurotensin precursor fragment identified in human circulation*. *Peptides*, 2006. 27(7): p. 1787-93.
101. Uhl, G.R., R.R. Goodman, and S.H. Snyder, *Neurotensin-containing cell bodies, fibers and nerve terminals in the brain stem of the rat: immunohistochemical mapping*. *Brain Res*, 1979. 167(1): p. 77-91.
102. Kitabgi, P., *Neurotensin modulates dopamine neurotransmission at several levels along brain dopaminergic pathways*. *Neurochem Int*, 1989. 14(2): p. 111-9.
103. Reinecke, M., *Neurotensin. Immunohistochemical localization in central and peripheral nervous system and in endocrine cells and its functional role as neurotransmitter and endocrine hormone*. *Prog Histochem Cytochem*, 1985. 16(1): p. 1-172.
104. Gullo, L., et al., *Plasma cholecystokinin and neurotensin after an ordinary meal in humans. A prolonged time study*. *Gastroenterol Clin Biol*, 1998. 22(1): p. 25-8.
105. Vita, N., et al., *Cloning and expression of a complementary DNA encoding a high affinity human neurotensin receptor*. *FEBS Lett*, 1993. 317(1-2): p. 139-42.
106. Tanaka, K., M. Masu, and S. Nakanishi, *Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor*. *Neuron*, 1990. 4(6): p. 847-54.
107. Myers, R.M., et al., *Cancer, chemistry, and the cell: molecules that interact with the neurotensin receptors*. *ACS Chem Biol*, 2009. 4(7): p. 503-525.
108. Schotte, A., J.E. Leysen, and P.M. Laduron, *Evidence for a displaceable non-specific [³H]neurotensin binding site in rat brain*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1986. 333(4): p. 400-5.
109. Schotte, A., W. Rostene, and P.M. Laduron, *Different subcellular localization of neurotensin-receptor and neurotensin-acceptor sites in the rat brain dopaminergic system*. *J Neurochem*, 1988. 50(4): p. 1026-31.
110. Vincent, J.P., J. Mazella, and P. Kitabgi, *Neurotensin and neurotensin receptors*. *Trends Pharmacol Sci*, 1999. 20(7): p. 302-9.
111. Laurent, P., et al., *Chromosomal localization of mouse and human neurotensin receptor genes*. *Mamm Genome*, 1994. 5(5): p. 303-6.
112. Yamada, M., M.A. Watson, and E. Richelson, *Deletion mutation in the putative third intracellular loop of the rat neurotensin receptor abolishes polyphosphoinositide hydrolysis but not cyclic AMP formation in CHO-K1 cells*. *Mol Pharmacol*, 1994. 46(3): p. 470-6.
113. Chabry, J., et al., *Thr-422 and Tyr-424 residues in the carboxyl terminus are critical for the internalization of the rat neurotensin receptor*. *J Biol Chem*, 1995. 270(6): p. 2439-42.
114. Alifano, M., et al., *Neurotensin receptor 1 determines the outcome of non-small cell lung cancer*. *Clin Cancer Res*, 2010. 16(17): p. 4401-10.
115. Mendez, M., et al., *High affinity neurotensin receptor mRNA distribution in rat brain and peripheral tissues. Analysis by quantitative RT-PCR*. *J Mol Neurosci*, 1997. 9(2): p. 93-102.
116. Coppola, T., et al., *Neurotensin protects pancreatic beta cells from apoptosis*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. 40(10): p. 2296-2302.

117. Rodriguez, Y., et al., *Neurotensin and neurotensin receptor 1 expression in human myometrium and uterine leiomyomas*. *Biol Reprod*, 2010. 83(4): p. 641-7.
118. Koon, H.W., et al., *Neurotensin induces IL-6 secretion in mouse preadipocytes and adipose tissues during 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid-induced colitis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(21): p. 8766-8771.
119. Mazella, J., et al., *Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain*. *J Neurosci*, 1996. 16(18): p. 5613-20.
120. Nouel, D., et al., *Differential binding profile and internalization process of neurotensin via neuronal and glial receptors*. *J Neurosci*, 1997. 17(5): p. 1795-803.
121. Vita, N., et al., *Neurotensin is an antagonist of the human neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells*. *Eur J Pharmacol*, 1998. 360(2-3): p. 265-72.
122. Pettibone, D.J. and J.A. Totaro, *High affinity binding of [3H]neurotensin of rat uterus*. *Peptides*, 1987. 8(6): p. 1169-72.
123. Schulz, S., C. Rocken, and M.P. Ebert, *Immunocytochemical identification of low-affinity NTS2 neurotensin receptors in parietal cells of human gastric mucosa*. *J Endocrinol*, 2006. 191(1): p. 121-8.
124. Martin, S., J.P. Vincent, and J. Mazella, *Recycling ability of the mouse and the human neurotensin type 2 receptors depends on a single tyrosine residue*. *J Cell Sci*, 2002. 115(Pt 1): p. 165-173.
125. Maeno, H., et al., *Comparison of mice deficient in the high- or low-affinity neurotensin receptors, Ntsr1 or Ntsr2, reveals a novel function for Ntsr2 in thermal nociception*. *Brain Res*, 2004. 998(1): p. 122-9.
126. Dubuc, I., et al., *Identification of the receptor subtype involved in the analgesic effect of neurotensin*. *J Neurosci*, 1999. 19(1): p. 503-10.
127. Sarret, P., et al., *Immunohistochemical distribution of NTS2 neurotensin receptors in the rat central nervous system*. *J Comp Neurol*, 2003. 461(4): p. 520-538.
128. Mazella, J., *Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking?* *Cell Signal*, 2001. 13(1): p. 1-6.
129. Nielsen, M.S., et al., *The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein*. *Embo J*, 2001. 20(9): p. 2180-2190.
130. Nykjaer, A., et al., *Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death*. *Nature*, 2004. 427(6977): p. 843-8.
131. Hermey, G., et al., *Tumour necrosis factor alpha-converting enzyme mediates ectodomain shedding of Vps10p-domain receptor family members*. *Biochem J*, 2006. 395(2): p. 285-293.
132. Navarro, V., J.P. Vincent, and J. Mazella, *Shedding of the luminal domain of the neurotensin receptor-3/sortilin in the HT29 cell line*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 298(5): p. 760-764.
133. Nouel, D., et al., *Pharmacological, molecular and functional characterization of glial neurotensin receptors*. *Neuroscience*, 1999. 94(4): p. 1189-97.
134. Dicou, E., J.P. Vincent, and J. Mazella, *Neurotensin receptor-3/sortilin mediates neurotensin-induced cytokine/chemokine expression in a murine microglial cell line*. *J Neurosci Res*, 2004. 78(1): p. 92-9.
135. Harrington, A.W., et al., *Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(16): p. 6226-6230.

136. Provenzano, M.J., et al., *p75NTR and sortilin increase after facial nerve injury*. *Laryngoscope*, 2008. 118(1): p. 87-93.
137. Arnett, M.G., J.M. Ryals, and D.E. Wright, *Pro-NGF, sortilin, and p75NTR: potential mediators of injury-induced apoptosis in the mouse dorsal root ganglion*. *Brain Res*, 2007. 1183: p. 32-42.
138. Wei, Y., et al., *Enhanced protein expressions of sortilin and p75NTR in retina of rat following elevated intraocular pressure-induced retinal ischemia*. *Neurosci Lett*, 2007. 429(2-3): p. 169-74.
139. Fan, Y.J., et al., *Differential effects of pro-BDNF on sensory neurons after sciatic nerve transection in neonatal rats*. *Eur J Neurosci*, 2008. 27(9): p. 2380-90.
140. Al-Shawi, R., et al., *Neurotoxic and neurotrophic roles of proNGF and the receptor sortilin in the adult and ageing nervous system*. *Eur J Neurosci*, 2008. 27(8): p. 2103-14.
141. Ariga, M., et al., *Functional role of sortilin in myogenesis and development of insulin-responsive glucose transport system in C2C12 myocytes*. *J Biol Chem*, 2008. 283(15): p. 10208-20.
142. Nielsen, M.S., et al., *Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase*. *J Biol Chem*, 1999. 274(13): p. 8832-8836.
143. Lefrancois, S., et al., *Inactivation of sortilin (a novel lysosomal sorting receptor) by dominant negative competition and RNA interference*. *Biol Proced Online*, 2005. 7: p. 17-25.
144. Martin, S., et al., *Neurotensin and the neurotensin receptor-3 in microglial cells*. *J Neurosci Res*, 2005. 81(3): p. 322-326.
145. Melamed, I., et al., *A novel lymphocyte signaling defect: trk A mutation in the syndrome of congenital insensitivity to pain and anhidrosis (CIPA)*. *J Clin Immunol*, 2004. 24(4): p. 441-8.
146. Indo, Y., *Genetics of congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA) or hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV. Clinical, biological and molecular aspects of mutations in TRKA(NTRK1) gene encoding the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor*. *Clin Auton Res*, 2002. 12 Suppl 1: p. I20-32.
147. Bardez, E., I.I. Devol, and A. Chatelain, *Association of 6- and 8-Hydroxyquinolines with Aerosol-OT in Heptane: Competition with Dimerization of 8-Hydroxyquinoline*. *J Colloid Interface Sci*, 1998. 205(1): p. 178-84.
148. Niewiadomska, G. and M. Baksalerska-Pazera, *Age-dependent changes in axonal transport and cellular distribution of Tau 1 in the rat basal forebrain neurons*. *Neuroreport*, 2003. 14(13): p. 1701-6.
149. Mufson, E.J., J.M. Conner, and J.H. Kordower, *Nerve growth factor in Alzheimer's disease: defective retrograde transport to nucleus basalis*. *Neuroreport*, 1995. 6(7): p. 1063-6.
150. Karege, F., et al., *Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients*. *Psychiatry Res*, 2002. 109(2): p. 143-8.
151. Tseng, M., et al., *BDNF protein levels are decreased in transformed lymphoblasts from lithium-responsive patients with bipolar disorder*. *J Psychiatry Neurosci*, 2008. 33(5): p. 449-453.
152. Neves-Pereira, M., et al., *The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family-based association study*. *Am J Hum Genet*, 2002. 71(3): p. 651-5.

153. Aloe, L., et al., *Studies in animal models and humans suggesting a role of nerve growth factor in schizophrenia-like disorders*. Behav Pharmacol, 2000. 11(3-4): p. 235-42.
154. Barde, Y.A., *Death of injured neurons caused by the precursor of nerve growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(16): p. 5703-4.
155. Diarra, A., et al., *Signaling of the neurotrophin receptor p75 in relation to Alzheimer's disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. 390(3): p. 352-6.
156. Ginsberg, S.D., et al., *Down regulation of trk but not p75NTR gene expression in single cholinergic basal forebrain neurons mark the progression of Alzheimer's disease*. J Neurochem, 2006. 97(2): p. 475-87.
157. Costantini, C., et al., *Characterization of the signaling pathway downstream p75 neurotrophin receptor involved in beta-amyloid peptide-dependent cell death*. J Mol Neurosci, 2005. 25(2): p. 141-56.
158. Al-Shawi, R., et al., *ProNGF, sortilin, and age-related neurodegeneration*. Ann N Y Acad Sci, 2007. 1119: p. 208-15.
159. Caceda, R., B. Kinkead, and C.B. Nemeroff, *Neurotensin: role in psychiatric and neurological diseases*. Peptides, 2006. 27(10): p. 2385-404.
160. Alifano, M., et al., *Neurotensin expression and outcome of malignant pleural mesothelioma*. Biochimie, 2010. 92(2): p. 164-170.
161. Evers, B.M., et al., *Differential effects of gut hormones on pancreatic and intestinal growth during administration of an elemental diet*. Ann Surg, 1990. 211(5): p. 630-6; discussion 636-8.
162. Wood, J.G., et al., *Neurotensin stimulates growth of small intestine in rats*. Am J Physiol, 1988. 255(6 Pt 1): p. G813-7.
163. Zeytinoglu, F.N., et al., *Characterization of neurotensin production by a line of rat medullary thyroid carcinoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. 77(6): p. 3741-5.
164. Gutniak, M., et al., *Report on a patient with watery diarrhoea syndrome caused by a pancreatic tumour containing neurotensin, enkephalin and calcitonin*. Acta Med Scand, 1980. 208(1-2): p. 95-100.
165. Feurle, G.E., et al., *A multihormonal tumor of the pancreas producing neurotensin*. Dig Dis Sci, 1981. 26(12): p. 1125-33.
166. Ishizuka, J., C.M. Townsend, Jr., and J.C. Thompson, *Neurotensin regulates growth of human pancreatic cancer*. Ann Surg, 1993. 217(5): p. 439-45; discussion 446.
167. Poinot-Chazel, C., et al., *Activation of mitogen-activated protein kinase couples neurotensin receptor stimulation to induction of the primary response gene Krox-24*. Biochem J, 1996. 320 (Pt 1): p. 145-51.
168. Scarpa, R.C., R.E. Carraway, and D.E. Cochrane, *Insulin-like growth factor (IGF) induced proliferation of human lung fibroblasts is enhanced by neurotensin*. Peptides, 2005. 26(11): p. 2201-10.
169. Dupouy, S., et al., *The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression*. PLoS One, 2009. 4(1): p. e4223.
170. Giorgi, R.R., et al., *Expression of neurotensin and its receptors in pituitary adenomas*. J Neuroendocrinol, 2008.
171. Elek, J., et al., *Relevant genomics of neurotensin receptor in cancer*. Anticancer Res, 2000. 20(1A): p. 53-8.
172. Choi, S.Y., et al., *Characterization of high affinity neurotensin receptor NTR1 in HL-60 cells and its down regulation during granulocytic differentiation*. Br J Pharmacol, 1999. 126(4): p. 1050-1056.

173. Reubi, J.C., et al., *Neurotensin receptors: a new marker for human ductal pancreatic adenocarcinoma*. *Gut*, 1998. 42(4): p. 546-50.
174. Sehgal, I., et al., *Neurotensin is an autocrine trophic factor stimulated by androgen withdrawal in human prostate cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(11): p. 4673-7.
175. Wang, X., et al., *Suppression of neurotensin receptor type 1 expression and function by histone deacetylase inhibitors in human colorectal cancers*. *Mol Cancer Ther*, 2010. 9(8): p. 2389-98.
176. Swift, S.L., J.E. Burns, and N.J. Maitland, *Altered expression of neurotensin receptors is associated with the differentiation state of prostate cancer*. *Cancer Res*, 2010. 70(1): p. 347-356.
177. Shimizu, S., et al., *Identification of a novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinomas: a role for the neurotensin-neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway*. *Int J Cancer*, 2008. 123(8): p. 1816-23.
178. Somai, S., et al., *Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 295(2): p. 482-488.
179. Evers, B.M., et al., *Characterization of functional neurotensin receptors on human lymphocytes*. *Surgery*, 1994. 116(2): p. 134-9; discussion 139-40.
180. Ramez, M., et al., *Functional characterization of neurotensin receptors in human cutaneous T cell lymphoma malignant lymphocytes*. *J Invest Dermatol*, 2001. 117(3): p. 687-693.
181. Magazin, M., et al., *Sezary syndrome cells unlike normal circulating T lymphocytes fail to migrate following engagement of NT1 receptor*. *J Invest Dermatol*, 2004. 122(1): p. 111-118.
182. Nakagawara, A., et al., *Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas*. *Cancer Res*, 1992. 52(5): p. 1364-8.
183. Nakagawara, A., et al., *Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma*. *N Engl J Med*, 1993. 328(12): p. 847-54.
184. Ho, R., et al., *Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas*. *Cancer Res*, 2002. 62(22): p. 6462-6.
185. Nakagawara, A., et al., *Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas*. *Mol Cell Biol*, 1994. 14(1): p. 759-67.
186. Fagan, A.M., et al., *TrkA, but not TrkC, receptors are essential for survival of sympathetic neurons in vivo*. *J Neurosci*, 1996. 16(19): p. 6208-18.
187. Descamps, S., et al., *Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways*. *J Biol Chem*, 2001. 276(21): p. 17864-70.
188. Reuther, G.W., et al., *Identification and characterization of an activating TrkA deletion mutation in acute myeloid leukemia*. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(23): p. 8655-66.
189. Aloe, L. and R. Levi-Montalcini, *Mast cells increase in tissues of neonatal rats injected with the nerve growth factor*. *Brain Res*, 1977. 133(2): p. 358-66.
190. Nassenstein, C., et al., *Neurotrophin effects on eosinophils in allergic inflammation*. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2005. 5(3): p. 204-11.
191. Marshall, J.S., et al., *Nerve growth factor modifies the expression of inflammatory cytokines by mast cells via a prostanoid-dependent mechanism*. *J Immunol*, 1999. 162(7): p. 4271-4276.
192. Tal, M. and R. Liberman, *Local injection of nerve growth factor (NGF) triggers degranulation of mast cells in rat paw*. *Neurosci Lett*, 1997. 221(2-3): p. 129-32.

193. Mazurek, N., et al., *Nerve growth factor induces mast cell degranulation without changing intracellular calcium levels*. FEBS Lett, 1986. 198(2): p. 315-20.
194. Nassenstein, C., et al., *Differential expression of the neurotrophin receptors p75NTR, TrkA, TrkB and TrkC in human peripheral blood mononuclear cells*. Exp Toxicol Pathol, 2006. 57 Suppl 2: p. 55-63.
195. Gadiant, R.A., K.C. Cron, and U. Otten, *Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha synergistically stimulate nerve growth factor (NGF) release from cultured rat astrocytes*. Neurosci Lett, 1990. 117(3): p. 335-40.
196. Ehrhard, P.B., et al., *Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(23): p. 10984-8.
197. Bonini, S., et al., *Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(20): p. 10955-60.
198. Noga, O., et al., *The influence of inhalative corticosteroids on circulating Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3 in allergic asthmatics*. Clin Exp Allergy, 2001. 31(12): p. 1906-12.
199. Path, G., et al., *Augmentation of allergic early-phase reaction by nerve growth factor*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. 166(6): p. 818-26.
200. Tam, S.Y., et al., *Expression of functional TrkA receptor tyrosine kinase in the HMC-1 human mast cell line and in human mast cells*. Blood, 1997. 90(5): p. 1807-20.
201. Sawada, J., et al., *Nerve growth factor functions as a chemoattractant for mast cells through both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways*. Blood, 2000. 95(6): p. 2052-8.
202. Abram, M., et al., *Nerve growth factor and neurotrophin-3 mediate survival of pulmonary plasma cells during the allergic airway inflammation*. J Immunol, 2009. 182(8): p. 4705-4712.
203. Santambrogio, L., et al., *Nerve growth factor production by lymphocytes*. J Immunol, 1994. 153(10): p. 4488-4495.
204. Torcia, M., et al., *Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes*. Cell, 1996. 85(3): p. 345-356.
205. Barouch, R., et al., *Differential regulation of neurotrophin expression by mitogens and neurotransmitters in mouse lymphocytes*. J Neuroimmunol, 2000. 103(2): p. 112-121.
206. Torcia, M., et al., *Nerve growth factor inhibits apoptosis in memory B lymphocytes via inactivation of p38 MAPK, prevention of Bcl-2 phosphorylation, and cytochrome c release*. J Biol Chem, 2001. 276(42): p. 39027-39036.
207. Heese, K., N. Inoue, and T. Sawada, *NF-kappaB regulates B-cell-derived nerve growth factor expression*. Cell Mol Immunol, 2006. 3(1): p. 63-66.
208. Thorpe, L.W. and J.R. Perez-Polo, *The influence of nerve growth factor on the in vitro proliferative response of rat spleen lymphocytes*. J Neurosci Res, 1987. 18(1): p. 134-9.
209. Otten, U., P. Ehrhard, and R. Peck, *Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(24): p. 10059-63.
210. Brodie, C. and E.W. Gelfand, *Functional nerve growth factor receptors on human B lymphocytes. Interaction with IL-2*. J Immunol, 1992. 148(11): p. 3492-7.
211. Torcia, M., et al., *Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes*. Cell, 1996. 85(3): p. 345-56.

212. Melamed, I., et al., *Nerve growth factor signal transduction in human B lymphocytes is mediated by gp140trk*. Eur J Immunol, 1996. 26(9): p. 1985-1992.
213. Kronfeld, I., et al., *NGF rescues human B lymphocytes from anti-IgM induced apoptosis by activation of PKCzeta*. Eur J Immunol, 2002. 32(1): p. 136-143.
214. Kimata, H., et al., *Stimulation of Ig production and growth of human lymphoblastoid B-cell lines by nerve growth factor*. Immunology, 1991. 72(3): p. 451-2.
215. Aloe, L., et al., *Emotional stress induced by parachute jumping enhances blood nerve growth factor levels and the distribution of nerve growth factor receptors in lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(22): p. 10440-10444.
216. Melamed, I., et al., *Nerve growth factor triggers microfilament assembly and paxillin phosphorylation in human B lymphocytes*. J Exp Med, 1995. 181(3): p. 1071-1079.
217. Franklin, R.A., et al., *Nerve growth factor induces activation of MAP-kinase and p90rsk in human B lymphocytes*. J Immunol, 1995. 154(10): p. 4965-4972.
218. Laurenzi, M.A., et al., *Expression of mRNA encoding neurotrophins and neurotrophin receptors in rat thymus, spleen tissue and immunocompetent cells. Regulation of neurotrophin-4 mRNA expression by mitogens and leukotriene B4*. Eur J Biochem, 1994. 223(3): p. 733-41.
219. Thorpe, L.W., T.R. Jerrells, and J.R. Perez-Polo, *Mechanisms of lymphocyte activation by nerve growth factor*. Ann N Y Acad Sci, 1990. 594: p. 78-84.
220. Lambiase, A., et al., *Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors*. J Allergy Clin Immunol, 1997. 100(3): p. 408-414.
221. Cattaneo, A., *Tanezumab, a recombinant humanized mAb against nerve growth factor for the treatment of acute and chronic pain*. Curr Opin Mol Ther, 2010. 12(1): p. 94-106.
222. Aloe, L., P. Tirassa, and A. Lambiase, *The topical application of nerve growth factor as a pharmacological tool for human corneal and skin ulcers*. Pharmacol Res, 2008. 57(4): p. 253-8.
223. Kerschensteiner, M., et al., *Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation?* J Exp Med, 1999. 189(5): p. 865-870.
224. Schuhmann, B., et al., *A role for brain-derived neurotrophic factor in B cell development*. J Neuroimmunol, 2005. 163(1-2): p. 15-23.
225. Edling, A.E., et al., *Human and murine lymphocyte neurotrophin expression is confined to B cells*. J Neurosci Res, 2004. 77(5): p. 709-717.
226. Schulte-Herbruggen, O., et al., *Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 regulate secretion of brain-derived neurotrophic factor in human monocytes*. J Neuroimmunol, 2005. 160(1-2): p. 204-209.
227. Kimata, H., *Brain-derived neurotrophic factor selectively enhances allergen-specific IgE production*. Neuropeptides, 2005. 39(4): p. 379-383.
228. Pearse, R.N., et al., *A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival*. Blood, 2005. 105(11): p. 4429-4436.
229. Sun, C.Y., et al., *Brain-derived neurotrophic factor induces proliferation, migration, and VEGF secretion in human multiple myeloma cells via activation of MEK-ERK and PI3K/AKT signaling*. Tumour Biol, 2010. 31(2): p. 121-8.

230. Zhang, L., et al., *Lentiviral shRNA silencing of BDNF inhibits in vivo multiple myeloma growth and angiogenesis via down-regulated stroma-derived VEGF expression in the bone marrow milieu*. *Cancer Sci*, 2010. 101(5): p. 1117-24.
231. D'Onofrio, M., et al., *Expression of neurotrophin receptors in normal and malignant B lymphocytes*. *Eur Cytokine Netw*, 2000. 11(2): p. 283-291.
232. Weinstock-Guttman, B., et al., *Immune cell BDNF secretion is associated with white matter volume in multiple sclerosis*. *J Neuroimmunol*, 2007. 188(1-2): p. 167-174.
233. Azoulay, D., N. Urshansky, and A. Karni, *Low and dysregulated BDNF secretion from immune cells of MS patients is related to reduced neuroprotection*. *J Neuroimmunol*, 2008. 195(1-2): p. 186-193.
234. Stadelmann, C., et al., *BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells?* *Brain*, 2002. 125(Pt 1): p. 75-85.
235. Lee, B.H. and Y.K. Kim, *BDNF mRNA expression of peripheral blood mononuclear cells was decreased in depressive patients who had or had not recently attempted suicide*. *J Affect Disord*, 2010. 125(1-3): p. 369-73.
236. Nassenstein, C., et al., *The neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 are survival and activation factors for eosinophils in patients with allergic bronchial asthma*. *J Exp Med*, 2003. 198(3): p. 455-467.
237. Ciriaco, E., et al., *Localization of Trk neurotrophin receptor-like proteins in avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius)*. *J Neuroimmunol*, 1996. 69(1-2): p. 73-83.
238. Lipps, B.V., *Isolation of nerve growth factor (NGF) from human body fluids; saliva, serum and urine: comparison between cobra venom and cobra serum NGF*. *J Nat Toxins*, 2000. 9(4): p. 349-56.
239. Mandel, A.L., H. Ozdener, and V. Utermohlen, *Identification of pro- and mature brain-derived neurotrophic factor in human saliva*. *Arch Oral Biol*, 2009. 54(7): p. 689-695.
240. Shibayama, E. and H. Koizumi, *Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues*. *Am J Pathol*, 1996. 148(6): p. 1807-18.
241. De Vicente, J.C., et al., *Immunohistochemical localization of neurotrophins and neurotrophin receptors in human and mouse salivary glands*. *Ann Anat*, 1998. 180(2): p. 157-63.
242. Borelli, V., et al., *Neuropeptides in saliva of subjects with burning mouth syndrome: a pilot study*. *Oral Dis*, 2010. 16(4): p. 365-74.
243. Leon, A., et al., *Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(9): p. 3739-43.
244. Hattori, A., et al., *Tumor necrosis factor stimulates the synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor in non-neuronal cells*. *J Biol Chem*, 1993. 268(4): p. 2577-82.
245. Friedman, W.J., et al., *Regulation of beta-nerve growth factor expression by inflammatory mediators in hippocampal cultures*. *J Neurosci Res*, 1990. 27(3): p. 374-82.
246. Aloe, L., et al., *Nerve growth factor in the synovial fluid of patients with chronic arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1992. 35(3): p. 351-5.
247. Bracci-Laudiero, L., et al., *Increased levels of NGF in sera of systemic lupus erythematosus patients*. *Neuroreport*, 1993. 4(5): p. 563-5.

248. Scrivo, R., et al., *The immunology of rheumatoid arthritis*. Ann N Y Acad Sci, 2007. 1108: p. 312-22.
249. Dicou, E., et al., *Increased frequency of NGF in sera of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients*. Neuroreport, 1993. 5(3): p. 321-4.
250. del Porto, F., et al., *Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor levels in patients with rheumatoid arthritis treated with TNF-alpha blockers*. Ann N Y Acad Sci, 2006. 1069: p. 438-443.
251. Aloe, L. and M.A. Tuveri, *Nerve growth factor and autoimmune rheumatic diseases*. Clin Exp Rheumatol, 1997. 15(4): p. 433-8.
252. Aloe, L., et al., *Level of nerve growth factor and distribution of mast cells in the synovium of tumour necrosis factor transgenic arthritic mice*. Int J Tissue React, 1993. 15(4): p. 139-43.
253. Dicou, E., *High levels of the proNGF peptides LIP1 and LIP2 in the serum and synovial fluid of rheumatoid arthritis patients: evidence for two new cytokines*. J Neuroimmunol, 2008. 194(1-2): p. 143-146.
254. Halliday, D.A., et al., *Elevated nerve growth factor levels in the synovial fluid of patients with inflammatory joint disease*. Neurochem Res, 1998. 23(6): p. 919-922.
255. Rihl, M., et al., *Involvement of neurotrophins and their receptors in spondyloarthritis synovitis: relation to inflammation and response to treatment*. Ann Rheum Dis, 2005. 64(11): p. 1542-1549.
256. Walsh, D.A., et al., *Angiogenesis and nerve growth factor at the osteochondral junction in rheumatoid arthritis and osteoarthritis*. Rheumatology (Oxford), 2010. 49(10): p. 1852-61.
257. D'Cruz, D.P., M.A. Khamashta, and G.R. Hughes, *Systemic lupus erythematosus*. Lancet, 2007. 369(9561): p. 587-96.
258. Aalto, K., et al., *Nerve growth factor in serum of children with systemic lupus erythematosus is correlated with disease activity*. Cytokine, 2002. 20(3): p. 136-139.
259. Xu, Z. and Y. Chen, *Determination of serum interleukin-13 and nerve growth factor in patients with systemic lupus erythematosus and clinical significance*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2005. 25(3): p. 360-1.
260. Theofilopoulos, A.N. and F.J. Dixon, *Murine models of systemic lupus erythematosus*. Adv Immunol, 1985. 37: p. 269-390.
261. Bracci-Laudiero, L., et al., *Modification of lymphoid and brain nerve growth factor levels in systemic lupus erythematosus mice*. Neurosci Lett, 1996. 204(1-2): p. 13-16.
262. Ikenouchi, A., et al., *Plasma levels of brain derived-neurotrophic factor and catecholamine metabolites are increased during active phase of psychotic symptoms in CNS lupus: a case report*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2006. 30(7): p. 1359-1363.
263. Ikenouchi-Sugita, A., et al., *Serum brain-derived neurotrophic factor levels as a novel biological marker for the activities of psychiatric symptoms in systemic lupus erythematosus*. World J Biol Psychiatry, 2010. 11(2): p. 121-8.
264. Oroszi, G., et al., *The Met66 allele of the functional Val66Met polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene confers protection against neurocognitive dysfunction in systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis, 2006. 65(10): p. 1330-5.
265. Skopouli, F.N. and H.M. Moutsopoulos, *Autoimmune epitheliitis: Sjogren's syndrome*. Clin Exp Rheumatol, 1994. 12 Suppl 11: p. S9-11.

266. Vitali, C., et al., *Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group*. *Ann Rheum Dis*, 2002. 61(6): p. 554-8.
267. Fauchais, A.L., et al., *Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor correlate with T-cell activation in primary Sjogren's syndrome*. *Scand J Rheumatol*, 2009. 38(1): p. 50-7.
268. Gu, Y.S., et al., *The immunobiology of systemic sclerosis*. *Semin Arthritis Rheum*, 2008. 38(2): p. 132-160.
269. Derk, C.T. and S.A. Jimenez, *Systemic sclerosis: current views of its pathogenesis*. *Autoimmun Rev*, 2003. 2(4): p. 181-191.
270. McGaha, T.L. and C.A. Bona, *Role of profibrogenic cytokines secreted by T cells in fibrotic processes in scleroderma*. *Autoimmun Rev*, 2002. 1(3): p. 174-181.
271. Czompoly, T., et al., *Anti-topoisomerase I autoantibodies in systemic sclerosis*. *Autoimmun Rev*, 2009. 8(8): p. 692-6.
272. Guiducci, S., R. Giacomelli, and M.M. Cerinic, *Vascular complications of scleroderma*. *Autoimmun Rev*, 2007. 6(8): p. 520-3.
273. Matucci-Cerinic, M., et al., *Nerve growth factor and neuropeptides circulating levels in systemic sclerosis (scleroderma)*. *Ann Rheum Dis*, 2006. 60(5): p. 487-494.
274. Tuveri, M.A., et al., *Nerve growth factor and mast cell distribution in the skin of patients with systemic sclerosis*. *Clin Exp Rheumatol*, 1993. 11(3): p. 319-22.
275. Julio-Pieper, M., et al., *Nerve growth factor induces vascular endothelial growth factor expression in granulosa cells via a trkA receptor/mitogen-activated protein kinase-extracellularly regulated kinase 2-dependent pathway*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. 94(8): p. 3065-71.
276. Kermani, P. and B. Hempstead, *Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis*. *Trends Cardiovasc Med*, 2007. 17(4): p. 140-143.
277. Mackin, P. and P. Gallagher, *Reduced plasma levels of NGF and BDNF in patients with acute coronary syndromes*. *Int J Cardiol*, 2005. 105(3): p. 352; author reply 353-4.
278. Kawaguchi-Manabe, H., et al., *A novel cardiac hypertrophic factor, neurotrophin-3, is paradoxically downregulated in cardiac hypertrophy*. *Life Sci*, 2007. 81(5): p. 385-92.
279. Koyama, Y., A. Baba, and T. Matsuda, *Endothelins stimulate the expression of neurotrophin-3 in rat brain and rat cultured astrocytes*. *Neuroscience*, 2005. 136(2): p. 425-33.
280. Xu, M., et al., *p75 neurotrophin receptor regulates agonist-induced pulmonary vasoconstriction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. 295(4): p. H1529-38.
281. Micera, A., et al., *Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(11): p. 6162-7.
282. Coassin, M., et al., *Nerve growth factor modulates in vitro the expression and release of TGF-beta1 by amniotic membrane*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2006. 244(4): p. 485-91.
283. Micera, A., et al., *The pro-fibrogenic effect of nerve growth factor on conjunctival fibroblasts is mediated by transforming growth factor-beta*. *Clin Exp Allergy*, 2005. 35(5): p. 650-6.
284. Denton, C.P. and D.J. Abraham, *Transforming growth factor-beta and connective tissue growth factor: key cytokines in scleroderma pathogenesis*. *Curr Opin Rheumatol*, 2001. 13(6): p. 505-11.

285. Wahab, N.A., B.S. Weston, and R.M. Mason, *Connective tissue growth factor CCN2 interacts with and activates the tyrosine kinase receptor TrkA*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. 16(2): p. 340-51.
286. Matucci-Cerinic, M., et al., *Nerve growth factor and neuropeptides circulating levels in systemic sclerosis (scleroderma)*. *Ann Rheum Dis*, 2001. 60(5): p. 487-494.
287. Goldman, R., Z. Bar-Shavit, and D. Romeo, *Neurotensin modulates human neutrophil locomotion and phagocytic capability*. *FEBS Lett*, 1983. 159(1-2): p. 63-7.
288. Lemaire, I., *Neurotensin enhances IL-1 production by activated alveolar macrophages*. *J Immunol*, 1988. 140(9): p. 2983-8.
289. Castagliuolo, I., et al., *Neurotensin is a proinflammatory neuropeptide in colonic inflammation*. *J Clin Invest*, 1999. 103(6): p. 843-9.
290. Brun, P., et al., *Neuropeptide neurotensin stimulates intestinal wound healing following chronic intestinal inflammation*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005. 288(4): p. G621-9.
291. Kim, H.S., et al., *Neurotensin enhances nitric oxide generation via the JAK2-STAT1 pathway in murine macrophage Raw264.7 cells during costimulation with LPS and IFN γ* . *Neuropeptides*, 2006. 40(3): p. 221-229.
292. Legembre, P., et al., *Cutting edge: SDS-stable Fas microaggregates: an early event of Fas activation occurring with agonistic anti-Fas antibody but not with Fas ligand*. *J Immunol*, 2003. 171(11): p. 5659-5662.
293. Ross, A.H., et al., *Characterization of nerve growth factor receptor in neural crest tumors using monoclonal antibodies*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. 81(21): p. 6681-5.
294. Streppel, M., et al., *Focal application of neutralizing antibodies to soluble neurotrophic factors reduces collateral axonal branching after peripheral nerve lesion*. *Eur J Neurosci*, 2002. 15(8): p. 1327-42.
295. Ovigne, J.M., et al., *An antagonistic monoclonal antibody (B-N6) specific for the human neurotensin receptor-1*. *Neuropeptides*, 1998. 32(3): p. 247-256.
296. Gendron, L., et al., *Low-affinity neurotensin receptor (NTS2) signaling: internalization-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2*. *Mol Pharmacol*, 2004. 66(6): p. 1421-1430.
297. Haase, C., et al., *Neurotensin receptors in adeno- and squamous cell carcinoma*. *Anticancer Res*, 2006. 26(5A): p. 3527-3533.
298. Chen, Y., et al., *The cross talk between protein kinase A- and RhoA-mediated signaling in cancer cells*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2005. 230(10): p. 731-41.
299. Sherwood, E.M., et al., *Senescent BALB/c mice exhibit decreased expression of lambda5 surrogate light chains and reduced development within the pre-B cell compartment*. *J Immunol*, 1998. 161(9): p. 4472-5.
300. Hochberg, M.C., *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1997. 40(9): p. 1725.
301. Duman, R.S. and L.M. Monteggia, *A neurotrophic model for stress-related mood disorders*. *Biol Psychiatry*, 2006. 59(12): p. 1116-27.
302. Desmet, C.J. and D.S. Peeper, *The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy?* *Cell Mol Life Sci*, 2006. 63(7-8): p. 755-9.
303. Ziegenhorn, A.A., et al., *Serum neurotrophins--a study on the time course and influencing factors in a large old age sample*. *Neurobiol Aging*, 2007. 28(9): p. 1436-45.

304. Noga, O., et al., *Regulation of NGF and BDNF by dexamethasone and theophylline in human peripheral eosinophils in allergics and non-allergics*. Regul Pept, 2005. 132(1-3): p. 74-79.
305. Amano, H., et al., *Effect of intravenous cyclophosphamide in systemic lupus erythematosus: relation to lymphocyte subsets and activation markers*. Lupus, 2000. 9(1): p. 26-32.
306. Russo-Neustadt, A.A. and M.J. Chen, *Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant activity*. Curr Pharm Des, 2005. 11(12): p. 1495-510.
307. Lang, U.E., M.C. Jockers-Scherubl, and R. Hellweg, *State of the art of the neurotrophin hypothesis in psychiatric disorders: implications and limitations*. J Neural Transm, 2004. 111(3): p. 387-411.
308. Bombardier, C., et al., *Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE*. Arthritis Rheum, 1992. 35(6): p. 630-40.
309. McHorney, C.A., J.E. Ware, Jr., and A.E. Raczek, *The MOS 36-Item Short-Form Health Survey (SF-36): II. Psychometric and clinical tests of validity in measuring physical and mental health constructs*. Med Care, 1993. 31(3): p. 247-63.
310. Ware, J.E., Jr. and C.D. Sherbourne, *The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection*. Med Care, 1992. 30(6): p. 473-83.
311. Lepage, A., M. Mesbah, and P. Marquis, *[Preliminary analysis of the psychometric properties of the French version of an international questionnaire measuring the quality of life: the MOS SF-36 (version 1.1)]*. Rev Epidemiol Sante Publique, 1995. 43(4): p. 371-9.
312. Medsger, T.A., Jr., et al., *Assessment of disease severity and prognosis*. Clin Exp Rheumatol, 2003. 21(3 Suppl 29): p. S42-6.
313. LeRoy, E.C., et al., *Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis*. J Rheumatol, 1988. 15(2): p. 202-5.
314. Clements, P., et al., *Inter and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis*. J Rheumatol, 1995. 22(7): p. 1281-5.
315. Dicou, E., *Neurotensin protects pancreatic beta cells from serum deprivation*. Arch Physiol Biochem, 2008. 114(5): p. 299-300.
316. Evers, B.M., *Neurotensin and growth of normal and neoplastic tissues*. Peptides, 2006. 27(10): p. 2424-2433.
317. Piliponsky, A.M., et al., *Neurotensin increases mortality and mast cells reduce neurotensin levels in a mouse model of sepsis*. Nat Med, 2008. 14(4): p. 392-8.
318. Theoharides, T.C. and D. Kalogeromitros, *The critical role of mast cells in allergy and inflammation*. Ann N Y Acad Sci, 2006. 1088: p. 78-99.
319. Cochrane, D.E., et al., *Rapid degradation of neurotensin by stimulated rat mast cells*. Peptides, 1991. 12(6): p. 1187-94.
320. Miller, L.A., et al., *Blockade of mast cell histamine secretion in response to neurotensin by SR 48692, a nonpeptide antagonist of the neurotensin brain receptor*. Br J Pharmacol, 1995. 114(7): p. 1466-70.
321. Miller, L.A., et al., *Inhibition of neurotensin-stimulated mast cell secretion and carboxypeptidase A activity by the peptide inhibitor of carboxypeptidase A and neurotensin-receptor antagonist SR 48692*. Int Arch Allergy Immunol, 1998. 116(2): p. 147-53.
322. Robbins, R.A., et al., *Neurotensin stimulates neutrophil adherence to bronchial epithelial cells in vitro*. Life Sci, 1995. 56(16): p. 1353-9.

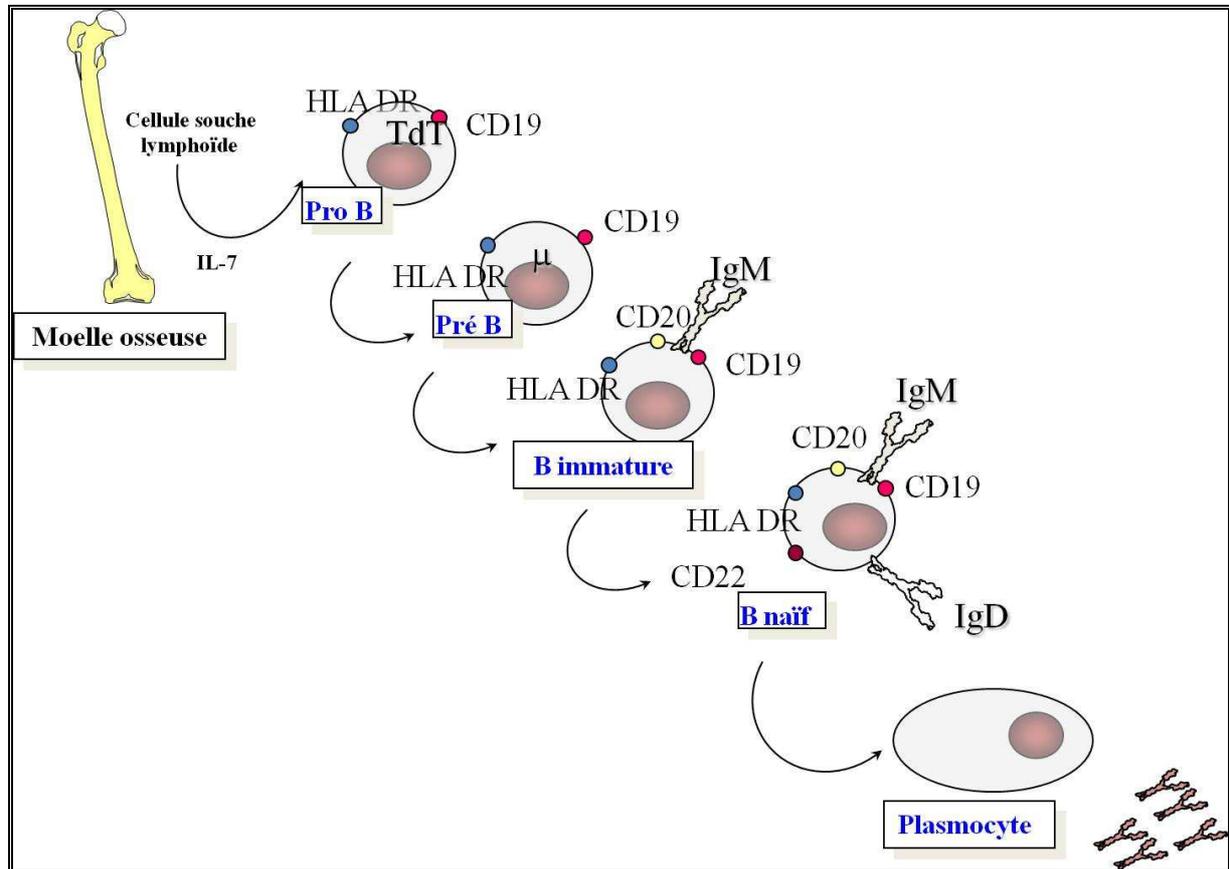
323. Lhiaubet, A.M., C. Avard, and R.M. Schimpff, *Apparent functionality but impractical quantification of neurotensin receptors on human peripheral lymphocytes*. *Horm Res*, 1998. 49(5): p. 233-9.
324. Sundler, F., et al., *Immunoreactive neurotensin and somatostatin in the chicken thymus. A chemical and histochemical study*. *Cell Tissue Res*, 1978. 194(3): p. 367-76.
325. Vanneste, Y., et al., *Identification of neurotensin-related peptides in human thymic epithelial cell membranes and relationship with major histocompatibility complex class I molecules*. *J Neuroimmunol*, 1997. 76(1-2): p. 161-6.
326. Dal Farra, C., et al., *Involvement of the neurotensin receptor subtype NTR3 in the growth effect of neurotensin on cancer cell lines*. *Int J Cancer*, 2001. 92(4): p. 503-509.
327. Boudin, H., et al., *Cellular distribution of neurotensin receptors in rat brain: immunohistochemical study using an antipeptide antibody against the cloned high affinity receptor*. *J Comp Neurol*, 1996. 373(1): p. 76-89.
328. Perron, A., et al., *NTS2 modulates the intracellular distribution and trafficking of NTS1 via heterodimerization*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 353(3): p. 582-90.
329. Sarret, P., et al., *Pharmacology and functional properties of NTS2 neurotensin receptors in cerebellar granule cells*. *J Biol Chem*, 2002. 277(39): p. 36233-36243.
330. Boudin, H., et al., *Immunologic differentiation of two high-affinity neurotensin receptor isoforms in the developing rat brain*. *J Comp Neurol*, 2000. 425(1): p. 45-57.
331. Contessa, J.N., et al., *Inhibition of N-linked glycosylation disrupts receptor tyrosine kinase signaling in tumor cells*. *Cancer Res*, 2008. 68(10): p. 3803-9.
332. Souzaze, F. and P. Forgez, *Molecular and cellular regulation of neurotensin receptor under acute and chronic agonist stimulation*. *Peptides*, 2006. 27(10): p. 2493-2501.
333. Wang, X., et al., *Curcumin inhibits neurotensin-mediated interleukin-8 production and migration of HCT116 human colon cancer cells*. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(18): p. 5346-5355.
334. Civallero, M., et al., *Effects of enzastaurin, alone or in combination, on signaling pathway controlling growth and survival of B-cell lymphoma cell lines*. *Leuk Lymphoma*, 2010. 51(4): p. 671-9.
335. Carraway, R.E. and A.M. Plona, *Involvement of neurotensin in cancer growth: evidence, mechanisms and development of diagnostic tools*. *Peptides*, 2006. 27(10): p. 2445-60.
336. Roussy, G., et al., *Evidence for a role of NTS2 receptors in the modulation of tonic pain sensitivity*. *Mol Pain*, 2009. 5: p. 38.
337. Richard, F., et al., *Agonism, inverse agonism, and neutral antagonism at the constitutively active human neurotensin receptor 2*. *Mol Pharmacol*, 2001. 60(6): p. 1392-1398.
338. Kawamura, N., et al., *Inhibition of brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase B signaling suppresses choriocarcinoma cell growth*. *Endocrinology*, 2010. 151(7): p. 3006-14.
339. Nye, S.H., et al., *K-252a and staurosporine selectively block autophosphorylation of neurotrophin receptors and neurotrophin-mediated responses*. *Mol Biol Cell*, 1992. 3(6): p. 677-686.
340. Mazella, J. and J.P. Vincent, *Functional roles of the NTS2 and NTS3 receptors*. *Peptides*, 2006. 27(10): p. 2469-2475.

341. Morinville, A., et al., *Internalization and trafficking of neurotensin via NTS3 receptors in HT29 cells*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. 36(11): p. 2153-68.
342. Ehlers, R.A., et al., *Neurotensin-mediated activation of MAPK pathways and AP-1 binding in the human pancreatic cancer cell line, MIA PaCa-2*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. 269(3): p. 704-8.
343. Watson, M.A., et al., *The rat neurotensin receptor expressed in Chinese hamster ovary cells mediates the release of inositol phosphates*. *J Neurochem*, 1992. 59(5): p. 1967-70.
344. Mazella, J., et al., *Solubilization and characterization of active neurotensin receptors from mouse brain*. *J Biol Chem*, 1988. 263(1): p. 144-149.
345. Wiese, S., et al., *Adenosine receptor A2A-R contributes to motoneuron survival by transactivating the tyrosine kinase receptor TrkB*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(43): p. 17210-17215.
346. Fischer, O.M., et al., *EGFR signal transactivation in cancer cells*. *Biochem Soc Trans*, 2003. 31(Pt 6): p. 1203-8.
347. Luttrell, L.M., Y. Daaka, and R.J. Lefkowitz, *Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors*. *Curr Opin Cell Biol*, 1999. 11(2): p. 177-83.
348. Almendro, V., S. Garcia-Recio, and P. Gascon, *Tyrosine kinase receptor transactivation associated to G protein-coupled receptors*. *Curr Drug Targets*, 2010. 11(9): p. 1169-80.
349. Rajagopal, R., et al., *Transactivation of Trk neurotrophin receptors by G-protein-coupled receptor ligands occurs on intracellular membranes*. *J Neurosci*, 2004. 24(30): p. 6650-8.
350. Lee, E.B., et al., *Tumor necrosis factor receptor 2 polymorphism in systemic lupus erythematosus: no association with disease*. *Hum Immunol*, 2001. 62(10): p. 1148-1152.
351. Lee, F.S., R. Rajagopal, and M.V. Chao, *Distinctive features of Trk neurotrophin receptor transactivation by G protein-coupled receptors*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002. 13(1): p. 11-17.
352. Maoret, J.J., et al., *Neurotensin receptor and its mRNA are expressed in many human colon cancer cell lines but not in normal colonic epithelium: binding studies and RT-PCR experiments*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. 203(1): p. 465-71.
353. Souzae, F., et al., *Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression*. *Cancer Res*, 2006. 66(12): p. 6243-6249.
354. Moody, T.W., et al., *SR48692 is a neurotensin receptor antagonist which inhibits the growth of small cell lung cancer cells*. *Peptides*, 2001. 22(1): p. 109-15.
355. Myers, R.M., et al., *Cancer, chemistry, and the cell: molecules that interact with the neurotensin receptors*. *ACS Chem Biol*, 2009. 4(7): p. 503-25.
356. Zhang, B., et al., *Clinical significance of increased CD4+CD25-Foxp3+ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus*. *Ann Rheum Dis*, 2008. 67(7): p. 1037-40.
357. Bonelli, M., et al., *Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE)*. *Int Immunol*, 2008. 20(7): p. 861-8.
358. Mellor-Pita, S., et al., *Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus*. *Ann Rheum Dis*, 2006. 65(4): p. 553-4.

359. Lee, J.H., et al., *Inverse correlation between CD4⁺ regulatory T-cell population and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus*. *Immunology*, 2006. 117(2): p. 280-6.
360. Gerli, R., et al., *Identification of regulatory T cells in systemic lupus erythematosus*. *Autoimmun Rev*, 2009. 8(5): p. 426-30.
361. Ho, A., et al., *A decrease in complement is associated with increased renal and hematologic activity in patients with systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 2001. 44(10): p. 2350-7.
362. Kapczinski, F., et al., *Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes*. *Rev Bras Psiquiatr*, 2008. 30(3): p. 243-5.
363. Wu, A., Z. Ying, and F. Gomez-Pinilla, *The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition*. *Eur J Neurosci*, 2004. 19(7): p. 1699-707.
364. Pers, J.O., et al., *BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases*. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. 1050: p. 34-9.
365. Lin-Lee, Y.C., et al., *Nuclear localization in the biology of the CD40 receptor in normal and neoplastic human B lymphocytes*. *J Biol Chem*, 2006. 281(27): p. 18878-87.
366. Brodie, C., et al., *Nerve growth-factor and anti-CD40 provide opposite signals for the production of IgE in interleukin-4-treated lymphocytes*. *Eur J Immunol*, 1996. 26(1): p. 171-8.
367. Shimizu, E., et al., *Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants*. *Biol Psychiatry*, 2003. 54(1): p. 70-5.
368. Seidel, M.F., et al., *Nerve growth factor in rheumatic diseases*. *Semin Arthritis Rheum*, 2010. 40(2): p. 109-26.
369. Ramos-Casals, M., et al., *Cryoglobulinemia in primary Sjogren's syndrome: prevalence and clinical characteristics in a series of 115 patients*. *Semin Arthritis Rheum*, 1998. 28(3): p. 200-5.
370. Grimsholm, O., et al., *BDNF in RA: downregulated in plasma following anti-TNF treatment but no correlation with inflammatory parameters*. *Clin Rheumatol*, 2008. 27(10): p. 1289-97.
371. Aloe, L., et al., *The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases*. *Allergy*, 1997. 52(9): p. 883-94.
372. Binard, A., et al., *Is the blood B-cell subset profile diagnostic for Sjogren syndrome?* *Ann Rheum Dis*, 2009. 68(9): p. 1447-52.
373. Anaf, V., et al., *Hyperalgesia, nerve infiltration and nerve growth factor expression in deep adenomyotic nodules, peritoneal and ovarian endometriosis*. *Hum Reprod*, 2002. 17(7): p. 1895-900.
374. Miller, L.J., et al., *Nerve growth factor and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome*. *Urology*, 2002. 59(4): p. 603-8.

Annexes

Annexe1 : Maturation des LB



Stades de maturation lymphocytaire B

D'après Pr. Prin, 2005 <http://www3.univ-lille2.fr/immunologie/labo/Cours/dcem1/rpse-adapt.pdf>

La différenciation B débute au niveau de la moelle osseuse. Les progéniteurs lymphoïdes vont être activés par le biais de l'IL7 sécrété par les cellules stromales de la moelle osseuse. L'IL-7 par fixation à son récepteur va ainsi permettre la survie et la prolifération des progéniteurs lymphoïdes. On distingue plusieurs stades de maturation au cours de la lymphopoïèse B. La cellule va évoluer du stade pro-B au stade B mature en exprimant pour chacun de ces stades des marqueurs spécifiques. Dans la moelle osseuse, les gènes codant les portions variables des chaînes lourdes et légères des Igs sont soumis, via l'action des recombinaisons RAG1 et RAG2, au processus de recombinaison V(D)J aboutissant à la formation d'un récepteur B (BCR) de spécificité donnée, constitué de deux chaînes lourdes identiques et de deux chaînes légères

identiques. La cellule B naïve ou B mature qui possède à sa surface un BCR fonctionnel et non autoréactif quitte la moelle osseuse et gagne les organes lymphoïdes secondaires. La reconnaissance antigène/anticorps entraîne la prolifération cellulaire et leur différenciation en plasmocytes, cellules sécrétrices d'anticorps spécifiques de cet antigène.

Annexe 2 : Critères révisés du syndrome de Sjögren primitif

Critères révisés américano-européens du syndrome de Sjögren primitif

1. Symptômes oculaires

Au moins un des 3 critères ci-dessous :

- sensation quotidienne, persistante et gênante d'œil sec depuis plus de 3 mois
- sensation fréquente de « sable dans les yeux »
- utilisation de larmes artificielles plus de 3 fois par jour

2. Symptômes buccaux

Au moins un des trois critères ci-dessous :

- Sensation quotidienne de bouche sèche depuis plus de trois mois
- A l'âge adulte, épisodes récidivants ou permanents de gonflements parotidiens
- Consommation fréquente de liquide pour avaler des aliments secs

3. Signes objectifs d'atteinte oculaire

Au moins un des 2 tests ci-dessous positif :

- Test de Shirmer ≤ 5 mm/5 minutes
- Score de Van Bijsterveld ≥ 4 après examen au Rose-Bengale ou au Vert de Lissamine

4. Signes objectifs d'atteinte salivaire

Au moins un des 3 tests ci-dessous positif :

- Scintigraphie parotidienne anormale
- Sialographie parotidienne anormale
- Flux salivaire sans stimulation $\leq 1,5$ mL/15 min

5. Signes histologiques

Sialadénite avec focus score ≥ 1 sur la biopsie des glandes salivaires accessoires

(Le focus score est le nombre de foyers par 4 mm² de tissu glandulaire, un foyer étant défini par l'agglomérat d'au moins 50 cellules mononucléées)

6. Autoanticorps

Présence d'anticorps anti-SSA ou anti-SSB

Le diagnostic de SGSp est porté devant :

- la présence de 4 sur 6 items avec présence obligatoire de l'histologie ou de la sérologie
- la présence de 3 des 4 items objectifs

Les critères d'exclusion sont les suivants :

- antécédents d'irradiation cervicale
- infection par le VHC ou le VIH
- lymphome pré-existant
- sarcoïdose ou maladie auto-immune
- réaction du greffon contre l'hôte
- utilisation de médicaments anti-cholinergique

Annexe 3 : Score de SJODAI

Score de SJODAI

Pouvez-vous évaluer organe par organe l'activité des manifestations systémiques de votre patient ?

Atteinte cutanée	Score	Evaluation
Absence d'activité	1	
Activité faible : érythème noueux ou érythème polymorphe ou urticaire chronique	2	[]
Activité moyenne : purpura limité aux pieds et aux chevilles	3	
Activité élevée : purpura diffus, ou ulcères sans autre cause que le Sjo	4	
Atteinte musculaire		
Absence d'activité	1	
Activité faible : douleur musculaire sans déficit et $N < CPK < 2N$ ou anomalies EMG	2	[]
Activité moyenne : $2N < CPK < 3N$, ou déficit maximal coté à 4/5, ou atteinte histologique	3	
Activité élevée : $CPK \geq 3N$, ou déficit $\leq 3/5$	4	
Atteinte articulaire avec synovite		
Absence de synovite	1	
Activité faible : 1 ou 2 synovites	2	[]
Activité moyenne : 3 à 6 synovites	3	
Activité élevée : > 6 synovites	4	
Atteinte broncho-pulmonaire		
Absence d'activité	1	
Activité faible : toux sèche, EFR normales	2	[]
Activité moyenne : bronchites à répétition, ou dyspnée d'effort (sans dyspnée au repos), ou épanchement pleural lié à une atteinte broncho-pulmonaire spécifique, ou anomalies significatives aux EFR	3	
Activité élevée : pneumopathie interstitielle, ou dilatation des bronches, ou dyspnée au repos, ou hypoxémie ou désaturation à l'effort	4	
Atteinte rénale		
Absence d'activité	1	
Activité faible : protéinurie $< 0.5g/24h$, ou acidose tubulaire asymptomatique	2	[]
Activité moyenne : insuffisance rénale avec créatinine $> 50ml/mn$, avec une protéinurie $< 1g/24h$, sans hématurie, ou acidose tubulaire nécessitant une supplémentation en potassium	3	
Activité élevée : atteinte glomérulaire ou tubulo-interstitielle documentée ou rein de cryoglobulinémie avec insuffisance rénale	4	
Atteinte neurologique périphérique		
Absence d'activité	1	
Activité faible : paresthésie des pieds, sans autres anomalies à l'examen clinique, et atteinte sensitive à l'EMG, ou névralgie du trijumeau	2	[]
Activité moyenne : paresthésie des jambes, ou poly neuropathie, ou atteinte motrice clinique avec déficit maximal coté à 4/5	3	
Activité élevée : multinévrite, ou ganglionopathie, ou polyradiculonévrite, ou atteinte motrice avec un déficit $\leq 3/5$, ou atteinte des nerfs crâniens (V excepté), ou vascularite documentée à la biopsie neuromusculaire	4	
Atteinte neurologique centrale		
Absence d'activité	1	
Activité faible : dépression franche	2	[]
Activité moyenne : anomalie clinique cognitive avec hyper signaux de la substance blanche à l'IRM cérébrale sans autre cause que le Sjo	3	
Activité élevée : méningite lymphocytaire ou apparition d'une comitialité sans autre cause, ou déficit focal, ou encéphalite, ou myélite, ou hémiparésie, ou aphasie, ou nystagmus, ou atteinte des nerfs crâniens d'origine centrale, avec lésions démyélinisantes, ou de vascularite à l'angio-IRM ou à l'artériographie sans autre cause que le Sjo	4	
Atteinte hématologique/lymphome		
Absence d'activité	1	
Activité faible : neutropénie entre 1500 et 1000/mm ³ ou anémie entre 10 et 12g d'Hb ou thrombopénie entre 10000 et 130000/mm ³ ou composant monoclonal	2	[]
Activité moyenne : cryoglobulinémie non symptomatique, ou neutropénie entre 1000 et 500, ou anémie entre 8 et 10g, ou thrombopénie entre 100000 et 50000	3	
Activité élevée : anémie hémolytique auto-immune avec $Hb < 8g$, ou neutropénie < 500 , ou thrombopénie < 50000 , ou myélome ou lymphome actuel	4	
Gonflement de glandes salivaires, lacrymales/adénopathie		
Absence d'activité	1	
Activité faible : présence d'adénopathies $< 2cm$ (lymphome excepté)	2	[]
Activité moyenne : parotidomégalie $< 5cm$ ou gonflement des glandes sous-maxillaires, ou gonflement des glandes lacrymales (lymphome excepté)	3	
Activité élevée : parotidomégalie $> 5cm$, ou gonflement des glandes sous-maxillaires, ou gonflement des glandes lacrymales ou existence d'une splénomégalie (lymphome excepté)	4	

Annexe 4: Score de VITALI

Scores de VITALI

Score d'activité SJSDAI

Pouvez-vous noter en fonction des items référencés l'activité de la maladie chez votre patient ?

Entourez le score correspondant à votre choix.

Items	Définitions	Score
<u>Signes généraux</u>		
a. Fièvre	- $\geq 38^{\circ}\text{C}$, d'origine non infectieuse	1
b. Fatigue	- assez sévère pour affecter les activités quotidiennes	1
c. Fatigue évolutive	- apparition ou aggravation de la fatigue	1
<u>Signes glandulaires</u>		
a. Gonflement des glandes salivaires	- Apparition ou augmentation d'un gonflement des glandes parotides ou sous mandibulaires (infections et lithiases exceptées)	3
<u>Atteinte articulaire</u>	Synovite dans une ou plusieurs articulations OU apparition OU aggravation des arthralgies sans synovite (à l'exclusion des autres cause comme l'arthrose, la fibromyalgie, etc.)	2
b. Synovite		
c. Arthralgies évolutives		
<u>Atteinte hématologique</u>		
a. Leuco/lymphopénie	- $<3500/<1000/\text{mm}^3$	1
b. Adénopathie/splénomégalie	- Adénopathie/splénomégalie palpable cliniquement	2
<u>Atteinte pleuro pulmonaire</u>	Confirmée par l'imagerie, d'origine non infectieuse ou aspect en verre dépoli au TDM	4
a. Pleurésie		
b. Pneumonie		
<u>Vascularite</u>		3
a. Vascularite évolutive	Apparition ou aggravation d'une vascularite (purpura, ...)	
<u>Atteinte rénale active</u>		2
b. Apparition ou aggravation d'une protéinurie $>0.5\text{g}/24\text{h}$ OU		
c. Elévation de la créatinine au dessus de la normale OU		
d. Apparition ou aggravation d'une atteinte glomérulaire ou interstitielle histologiquement prouvée		
<u>Neuropathie périphérique</u>	Début récent, (>6 mois), neuropathie prouvée à l'EMG	1

Score lésionnel SjsDDI

Pouvez-vous noter en fonction des variables référencées les séquelles de la maladie chez votre patient ?

Entourez le score correspondant à votre choix.

Variables	Définitions	Score
<u>Lésions orales/salivaires</u>		
a. Diminution du flux salivaire	- Flux salivaire $<1.5\text{ml}/15\text{min}$	1
b. Perte de dents	- Complète ou incomplète	1
<u>Lésions oculaires</u>		
a. Insuffisance lacrymale	- Test de Schirmer $<5\text{mm}/5\text{min}$	1
b. Lésion structurale	- Ulcère cornéen, cataracte, blépharite chronique	1
<u>Lésions neurologiques</u>		
a. Atteinte SNC	- Atteinte durable et stable du SNC	2
b. Neuropathie périphérique	- Atteinte durable et stable du SN périphérique ou autonome	1
<u>Lésions pleuro pulmonaires</u>		
	- Fibrose pleurale (confirmée par l'imagerie) OU	
	- Fibrose interstitielle (confirmée par l'imagerie) OU	
	- Atteinte irréversible des échanges gazeux (EFR)	2
<u>Lésions rénales</u>	Elévation persistante de la créatinine ou diminution de la clairance Acidose tubulaire ($\text{pHu}>6$, et $\text{HCO}_3\text{-sanguin}<15\text{mmol.L}$ à 2 reprises) Néphrocalcinose (confirmée à l'imagerie)	2
<u>Lymphoprolifération</u>	Histologiquement prouvée - Lymphome B OU - Myélome multiple OU - Maladie de Waldenström	5

Annexe 5 : Article 1

Serum neurotrophin profile in systemic sclerosis.

Marie-Claude Lise¹, Agnès Sparsa^{1,3}, Isabelle Marie⁵, Fabrice Lalloué¹, Kim Ly², C Martel¹, Holy Bezanahary², Guillaume Gondran², Véronique Loustaud-Ratti², Jean-Marie Bonnetblanc³, Elisabeth Vidal^{1,2}, Marie-Odile Jauberteau^{1,4}, Anne-Laure Fauchais^{1,2}.

Departments and Institution: ¹EA3842 Homéostasie Cellulaire et Pathologies, IFR 145 and Departments of ²Internal Medicine, ³Dermatology and ⁴Immunology, Limoges University Hospital, Limoges, France. ⁵Departments of Internal Medicine Rouen University Hospital, Rouen, France.

Academic degrees of all authors: MC Lise, PhD student; A Sparsa MD; I Marie MD, PhD, Prof; K Ly MD; C Martel MD; F Lalloué PhD; H Bezanahary MD; G Gondran MD; V Loustaud-Ratti MD; JM Bonnetblanc MD, Prof; E Vidal MD, Prof; MO Jauberteau MD, PhD, Prof; AL Fauchais MD, PhD.

Requests for reprints and correspondence:

AL Fauchais, MD, PhD

Department of Internal Medicine and EA3842-Immunology

Limoges University Hospital, 87042, Limoges, France

Phone number: 33 5 55 05 80 63

Fax number: 33 5 55 05 80 66

E-mail: anne-laure.fauchais@chu-limoges.fr

Abstract:

Background: Neurotrophins (NTs) are able to activate lymphocytes and fibroblasts, they can modulate angiogenesis and sympathetic vascular function. Thus, they can be implicated in the three pathogenic processes of systemic sclerosis (SSc). The aims of this study are to determine blood levels of Nerve Growth Factor (NGF), Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Neurotrophin-3 (NT-3) in SSc and to correlate them with clinical and biological data.

Methods: Serum samples were obtained from 55 SSc patients and 32 control subjects to measure NTs levels by ELISA and to determine their relationships with SSc profiles.

Findings: Serum NGF levels were higher in SSc patients (288.26 ± 170.34 pg/mL) than in control subjects (170.34 ± 50.8 pg/mL, $p < 0.001$) and correlated with gammaglobulins levels and the presence of both anti-cardiolipin and anti-Scl-70 antibodies ($p < 0.05$). In contrast, BDNF levels were lower in SSc patients than in controls (1121.9 ± 158.1 vs 1372.9 ± 190.9 pg/mL, $p < 0.0001$), especially in pulmonary arterial hypertension and diffuse SSc as compared to limited forms (all $p < 0.05$). NT-3 levels were similar in SSc and in the control group (2657.2 ± 2296 vs 2959.3 ± 2555 pg/mL, NS). BDNF levels correlated negatively with increased NGF levels in the SSc group (and not in controls).

Conclusion: Low BDNF serum levels were not previously documented in SSc, particularly in the diffuse SSc subset and in patients with pulmonary hypertension or anti-Scl-70 antibodies. The negative correlation between NGF and BDNF levels observed in SSc and not in healthy controls could be implicated in sympathetic vascular dysfunction in SSc.

Key words: Systemic sclerosis – Neurotrophins – NGF – BDNF – Neurotrophin-3 – Raynaud’s phenomenon.

INTRODUCTION :

Systemic sclerosis (SSc) is a chronic connective tissue disease characterized by at least 3 pathogenic processes: immunological abnormalities, micro-vascular dysfunction and fibrosis [1].

Neurotrophins (NTs) belong to a family of growth factors that control the development, growth and apoptotic death of neurons and astrocytes [2]. Accumulating evidences suggest that NTs, especially Nerve Growth Factor (NGF) and Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), participate in inflammatory responses, including the modulation and regulation of immune functions in inflammatory and autoimmune diseases [2]. NGF serum levels are increased in various autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis [3]. Increased NGF and BDNF plasmatic levels have also been recently reported in primary Sjögren's syndrome in correlation with systemic activity and B and T cell activation [4].

Neurotrophins could also be implicated in the generalized microangiopathy observed in SSc. Indeed, angiogenesis, endothelial cell activation, apoptosis and sympathetic vasoconstriction are modulated by these neuropeptides. NGF promotes angiogenesis and synthesis of angiogenic factors such as Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [5]. As recently evidenced, BDNF can induce angiogenesis in ischemic tissues [6]. In acute coronary syndromes, ischemic tissues contain increased BDNF levels that correlate with inflammation and oxidative stress whereas serum levels are decreased [7]. Furthermore, pulmonary expression of p75^{NTR}, the low affinity NT receptor, regulates endothelial susceptibility to endothelin-1 [8]. Thus, NTs could regulate agonist-induced pulmonary vasoconstriction [8].

NGF is able to induce both fibroblast proliferation and collagen production [9]. These pro-fibrogenic properties of NGF are mediated by transforming growth factor-beta (TGF β) [10,11], a key cytokine in the pathogenesis of SSc related fibrosis [12].

However, data concerning the implication of NTs in SSc are sparse and restricted to

NGF. Skin NGF expression is increased in SSc patients compared to healthy controls, especially in the early stages of the disease [13]. The same group reported increased blood NGF levels in SSc, especially in the diffuse subset of the disease and in patients with prominent articular disease [14].

The aim of the present study was to evaluate serum levels of NGF, BDNF and NT-3 in patients with SSc and to investigate their relationship with clinical and immunological data.

MATERIALS AND METHODS:

Patients and control population

Fifty five consecutive SSc patients including 49 women (median age 54.2 ± 12.5 years), all fulfilling the revised American College of Rheumatology (ACR) criteria for SSc were included in a cross sectional study in two French SSc competence centers by using the same screening protocol [15]. Mean disease duration at time of the study was 5.5 ± 3.3 years. Disease stages were defined as suggested by Medsger and Steen: early limited SSc, disease duration < 5 years; intermediate/late limited SSc, disease duration ≥ 5 years, early diffuse SSc, disease duration < 3 years and intermediate/late diffuse SSc, disease duration ≥ 3 years [16].

Patients with evolutive neoplastic disorders or depression were excluded in order to avoid interferences in serum NTs levels [17].

The control population consisted of 32 age- and sex-matched healthy volunteers. Informed consent was obtained from all patients and control subjects who participated in the study, which was approved by the local ethic review board "Comité d'éthique de la commission d'établissement du CHU de Limoges" directed by Dr G Terrier (35-2009-17).

Clinical feature

The disease was classified as diffuse (dSSc) or limited SSC (lSSc) according to the degree of skin involvement [18]. Four patients have anti-RNP Ab and presented with an overlap syndrome, with clinical features evoking lupus erythematosus in 3 cases and polymyositis in one case. The diagnoses of each disease component were determined according to ACR criteria.

A clinical profile was determined in every SSc patient (Table 1). Skin involvement was measured by the modified Rodnan skin score on a scale of 0-51 [19]. The presence of fingertip ulcers at the time of blood sampling and the existence of previous digital ulcers were

systematically recorded. Lung disease was assessed by pulmonary function tests, annual X-rays (n=55) and computed tomography scans (n=11) performed within 12 month before blood sampling. For the interpretation of the pulmonary function tests, FVC (liters, percentage of predicted forced vital capacity), DLCO (CO ml / min / mmHg and percentage of predicted capacity of carbon monoxide), DLCO / alveolar volume values (percentage of predicted) and 6 minutes walk test (meters and percentage of predicted) were measured and compared to those obtained 6 to 12 months earlier. Pulmonary arterial hypertension (PAH) was defined by a mean pulmonary artery pressure > 25 mm Hg at right heart catheterization. Joint involvement was recorded as positive when there was objective evidence of tender or swollen joints, or both. Disease severity was scored by the Medsger's index [20].

Concomitant treatment of SSc patients included angiotensin-converting enzyme inhibitors (n=14), calcium channel blockers (n=43), endothelin inhibitors (n=6), aspirin (n=12) and statins (n=12). Eight patients had cyclic intravenous iloprost infusions for severe Raynaud's phenomenon within the six-month period before blood sampling. Fifteen patients were receiving immunomodulating drugs at the time of blood sampling: low doses of corticosteroids (n=10, mean 11 ± 6.3 mg/day), hydroxychloroquine (n=5), methotrexate (n=5) cyclophosphamide (n=2) and mycophenolate mofetil (n=1).

Measurement of autoantibodies gammaglobulins and neurotrophins levels

Anti-nuclear, anti-centromere and anti-Scl70 antibodies (Ab) were characterized by immunofluorescence on HEp2 cells (The Binding Site, Saint Egrève, France) and by ELISA (Phadia, Saint Quentin Yvelines, France). Anti-cardiolipin Ab were measured by ELISA (Ingen, Chilly Mazarin, France).

Total serum gammaglobulins were measured by serum protein immunoelectrophoresis.

Serum NGF, BDNF and NT3 levels were measured using commercial ELISA kits according to the manufacturer's instructions (NGF E_{max}[®] ELISA, BDNF E_{max}[®] ELISA, NT-3 ELISA, Promega, Charbonnières, France). All assays were performed in duplicate and the data are presented as pg/mL. Detection limits were 15 pg/mL for BDNF and 4 pg/mL for NT-3 and NGF. Coefficients of variability for the individual samples run in the ELISAs were 0.99, 0.94 and 1.17 for NGF, BDNF and NT3, respectively.

Determination of BDNF production by B and T cells

Expression of intracellular BDNF by T and B lymphocytes was assessed by flow cytometry in 5 SSc patients and 5 controls. Whole blood cells were stained with either phycoerythrin (PE)-cyanin (Cy) 7-conjugated anti-CD3 or anti-CD19 antibodies (Ab) for 15 min at room temperature. After red blood cell lysing (Immunoprep, Beckman Coulter, France), white blood cells were fixed, permeabilized (Intraprep, Beckman Coulter, France) and incubated at room temperature for 30 min with mouse anti-BDNF Ab (1/100; Santa Cruz Biotechnology, France) in Phosphate Buffered Saline (PBS) containing 1% Bovine Serum Albumin. After two washes in PBS, mAb were revealed using Alexafluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG Ab (10 µg/mL; Invitrogen, France) for 30 min at 4°C. Cells stained with mouse isotypic immunoglobulins (Santa Cruz Biotechnology, France) were used as controls to determine background and positivity thresholds. After washing twice in PBS, cells were suspended in PBS and analyzed with a flow cytometer (FacsCantoTM II).

Statistical analysis

The results were expressed as means ± standard deviations. *p* values ≤ 0.05 were considered significant. One-way analysis of variance (ANOVA), chi-square tests and Mann-Whitney tests were used when appropriate. To search for correlations between serum NTs

levels and clinical and other biological data, linear regression analysis was used and p -values determined by Spearman's rank correlation test.

RESULTS:

Variations in NTs expression in SSc

Serum NGF levels were higher in SSc patients (288.26 ± 170.34 pg/mL) than in healthy controls (170.34 ± 50.8 pg/mL, $p < 0.0001$) (Figure 1A) whereas BDNF levels were lower (1121.9 ± 158.1 vs 1372.9 ± 190.9 pg/mL) (Figure 1B). Serum NT-3 levels were similar in SSc and in controls (2657.2 ± 2296 vs 2959.3 ± 2555 pg/mL, NS) (Figure 1C).

The lowest BDNF concentrations were those of patients affected with dSSc (1045.67 ± 202.8 pg/mL), as compared with lSSc patients (1146 ± 126.8 pg/mL, $p = 0.03$) (Figure 1D). In contrast, serum NGF levels were similar in patients with dSSc (346.16 ± 210 pg/mL), lSSc (271.4 ± 136.5 pg/mL) and overlap syndrome (195.5 ± 52 pg/mL).

To examine whether the variation of NGF and BDNF is a feature of both early and intermediate/late stages of the disease, serum samples were analyzed according to disease duration. In all subgroups of patients defined by this criterion, levels of BDNF were significantly reduced than in healthy controls (BDNF early dSSc 1041 ± 33.8 and late dSSc 1067.2 ± 182 pg/mL, NS) and (BDNF early lSSc 1140.9 ± 151.5 and late lSSc 1144.84 ± 116.6 , NS) vs controls (1372.9 ± 190.9 pg/mL, all $p < 0.003$).

NGF levels were also similar in early (204.9 ± 53.4 pg/ml) and late dSSc (440.1 ± 354.7 pg/mL, NS) as well as in lSSc (260 ± 138.5 pg/mL) and late lSSc (249.8 ± 101.1 pg/mL, NS).

NGF and BDNF balance

A strong negative correlation was observed between reduced BDNF levels and increased NGF concentrations in the whole SSc group ($r = -0.33$, $p = 0.01$, Figure 2A), in contrast to the lack of any correlation between these levels in the control group ($r = -0.13$, NS, Figure 2B). No correlation could be observed between NT-3 serum levels and NGF and BDNF concentrations either in the SSc group (NGF $r = 0.11$, NS; BDNF $r = 0.05$, NS) or in the controls

(NGF $r=0.06$, NS; BDNF $r=0.09$, NS).

Neurotrophins and SSC clinical profile

Whereas BDNF levels were reduced in the subgroup of patients with PAH (922.8 ± 235.6 vs 1135.8 ± 145.4 pg/mL in the absence of PAH, $p=0.05$); patients with grade II, III and IV PAH had similar BDNF decreased serum levels (893.9, 898 and 1130 pg/mL, respectively). In contrast, NGF concentrations were similar in patients with or without PAH (393.2 ± 143.8 vs 293.6 ± 169.8 pg/mL, NS).

BDNF levels were not significantly different in patients with (1072.4 ± 95.7 pg/mL) and without (1128 ± 163.8 pg/mL) fingertip ulcers (NS). Similarly, there was no correlation between NGF levels and the presence of fingertip ulcers.

The presence of articular involvement or digestive complications did not influence serum levels of NGF, BDNF and NT-3. NGF, NT-3 and BDNF concentrations were also similar in SSc patients with or without secondary Sjögren syndrome. No correlation of NGF, BDNF and NT-3 levels with the Rodnan skin score was found either.

BDNF levels were lower in patients with severe (according to Medsger's classification) SSc (1055.1 ± 127.8 pg/mL) than in those with mild forms (stage 2, 1162.8 ± 104 pg/mL, $p = 0.05$). In contrast, NGF and NT-3 levels were similar in all Medsger's classification groups.

A significant correlation between BDNF and FVC ($r=0.39$, $p=0.02$) (Figure 3) was found in the ISSc group. There were no significant correlation between serum NTs levels and carbon monoxide diffusion capacity, DLCO/VA or 6-minutes walk tests. Declines of DLCO/VA or 6-minutes tests observed during a 6 months follow-up failed to correlate with serum NTs levels also.

Serum NGF, BDNF and NT-3 concentrations were similar in SSc patients whatever they were treated or not by angiotensin-converting enzyme inhibitors, calcium channel blockers

or statins. NGF serum concentrations tended to be slightly higher in patients receiving aspirin (347.9 ± 246.1 pg/mL) than in those without platelet aggregation-inhibiting drug (261 ± 122.7 pg/mL, $p=0.08$, NS). NGF and BDNF levels were also similar in SSc patients with or without endothelin inhibitors. However in the subgroup of patients with active or previous digital ulcers, NGF levels were reduced in the 5 patients given endothelin inhibitor therapy (215.4 ± 115.9 pg/mL) as compared to the 19 others (313.2 ± 89 pg/mL, $p=0.04$). Disease-modifying drugs, except hydroxychloroquine did not affect serum NTs levels; NT-3 levels were higher in SSc patients with than without (4555.6 ± 3933.3 vs 2474.5 ± 2031.6 pg/mL, $p=0.05$) hydroxychloroquine, an immuno-modulative drug prescribed for severe articular manifestations in 80% of the cases.

Neurotrophins and immunological profile.

Patients with anti-Scl-70 antibodies showed significantly high NGF levels (408.3 ± 241.4 vs 262 ± 122.2 pg/mL, $p=0.008$). NGF levels were also increased in patients with anti-cardiolipin antibodies (408.5 ± 262 vs 264.2 ± 99.2 pg/mL, $p=0.008$) (Figure 4A) and correlated positively with serum gammaglobulin levels ($r=0.42$, $p=0.03$) (Figure 4B).

BDNF production by B and T cells.

Intracellular production of BDNF by B and T lymphocytes estimated by flow cytometry was similar in SSc patients and controls (mean fluorescence intensity of B cells 3.2 ± 1.6 vs 2.3 ± 1.1 , NS and T cells 3.7 ± 0.8 vs 2.9 ± 1.5 , NS).

DISCUSSION

The present study documents the yet unreported finding of reduced serum BDNF levels in SSc, particularly in the diffuse SSc subset, as well as in patients with severe forms or pulmonary hypertension. We confirm the increase of serum NGF concentrations previously reported in SSc [14]. Interestingly, NGF and BDNF levels correlated negatively in SSc patients and not in healthy controls. Although NT-3 has been recently shown to be involved in cardiovascular diseases [21], the present data fail to document its implication in SSc

The present results confirmed previous reports [13,14,22] that circulating levels of NGF are increased in SSc. The persistence of high serum NGF levels in intermediate-late forms of SSc strongly suggests of an implication of NGF in disease pathogeny independently of the disease duration. Although enhanced dermal levels of NGF reflect skin involvement in SSc, previous data and the present study suggest that increased serum NGF levels do not reflect skin or pulmonary fibrosis in SSc [14]. Indeed, no statistical correlation between the Rodnan score and serum NGF levels could be found. Whereas NGF production in the skin could reflect local inflammatory processes and fibrosis, we hypothesize that enhanced serum levels are a consequence of the autoimmune aspect of SSc, especially B cell chronic activation. Indeed, NGF levels are increased in SSc as well as in various others autoimmune disease such as lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and primary Sjögren's syndrome [3,4,23-25]. NGF, produced by activated B and T cells, is involved in the maintenance of immunological memory B cells and it can provide a CD40-independent signal for immunoglobulin production [26,27]. We herein evidence a statistical association between increased NGF levels and anti-Scl-70 and anti-cardiolipin Ab. We also confirmed the correlation between serum NGF concentrations and gammaglobulins levels, as previously demonstrated in primary Sjögren's syndrome [4]. Altogether, theses findings suggest an involvement of NGF in the B cell chronic activation in SSc.

Immunomodulating drugs did not affect NGF and BDNF levels in SSc. However, data concerning the influence of corticosteroid and/or immunosuppressive drugs on systemic levels of NGF and BDNF in autoimmune diseases are contradictory. Whereas serum NGF levels can be down-regulated by corticosteroid in asthma [28], immunomodulating drugs do not appear to reduce NGF levels in rheumatoid arthritis or primary Sjögren's's syndrome [4,29]. The same discrepancy was reported for BDNF in the same diseases [28,30]. Although pro-inflammatory cytokines play a role in promoting NT secretion, other mechanisms are probably involved in NGF and BDNF release in autoimmune diseases. High serum NT-3 levels in patients receiving hydroxychloroquine are intriguing. No previous report deals with NT-3 modulation by anti-malarial drugs.

Low BDNF levels were not previously reported in SSc. They are likely unrelated to the immune component of SSc. Indeed, serum BDNF levels have been reported to be increased in autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and primary Sjögren's syndrome independently of immunosuppressive treatment [4,29]. No previous reports deal with serum BDNF levels in skin fibrosis; accordingly, BDNF serum levels did not correlate with Rodnan skin score in the present study. Therefore, we hypothesize that decreased BDNF levels do not reflect skin fibrosis in SSc.

Serum BDNF concentrations reflected his production by various cell types including both endothelial cells [31] and circulating lymphocytes [4, 32]. The production of BDNF by normal B and T lymphocytes is also modulated by cell activation [4, 33]. Local production of BDNF as well as the expression of its high affinity receptor TrkB is also enhanced in synovitis in autoimmune disease [34,35]. However, BDNF production by B and T lymphocytes was similar in SSc patients and controls. Therefore, decreased BDNF concentrations are unlikely to reflect a direct modulation of lymphocytic BDNF production in SSc.

The decreased BDNF levels in SSc patients could be related to microvascular disease

and oxidative stress. BDNF and his receptor TrkB are expressed by endothelial cells and vascular smooth cells of capillaries and arteries [36,37]. A reduced BDNF synthesis by endothelial cells and the binding of serum BDNF to activated endothelial cells that express the tropomyosin receptor kinase B (TrkB) might play a role [38]. BDNF is implicated in vascular development and enhances the survival of vascular endothelial cells [37]. It enhances vascular flow and regulates revascularization of ischemic tissues also [39]. *In vitro* effects of BDNF on endothelial cells are comparable to those observed with VEGF [39]. Decreased BDNF concentrations have been observed in acute coronary syndrome [7, 40]. In addition, increased oxidative stress decrease serum BDNF concentrations [41, 42]. The positive correlation between serum BDNF levels and forced vital capacity could also reflect the potential link between this NT and oxidative stress. Forced vital capacity is known to decrease with enhanced oxidative stress in SSc [43,44]. Furthermore, BDNF-induced activation of TrkB signaling *in vivo* promotes prostacyclin biosynthesis by cerebral arteries [45]. Altogether, decreased BDNF levels observed in SSc could reflect vascular damages. This hypothesis may be supported by the fact that the lowest levels of BDNF in this study were observed in the 5 patients with PAH.

The present paper reports on the intriguing finding that decreased BDNF and increased NGF levels correlate both in early and intermediate/late forms of SSc, which suggests a potential physiopathological role of this dysbalance. Such a serum NGF / BDNF balance is not observed normally nor in psychological stress, depression, autoimmune diseases or acute coronary syndrome [4,7,29,46]. This BDNF / NGF balance abnormality observed in SSc patients might be a marker of chronic vascular dysfunction and oxidative stress. It is clear that NTs play an important role in maintaining normal vascular tone, oxidative homeostasis and in the regulation of the response of both endothelial and vascular smooth muscle cells to injury [35,37]. Exogenous BDNF co-infused with NGF-receptor blocking Ab induces a marked

vasoconstriction and perivascular inflammation [47], in accordance with the fact that NGF exerts a protective function in vascular control whereas BDNF alone has no significant effect on vascular diameter [47]. NGF reduces oxidative stress-induced injury by up-regulating antioxidants and oxygen free radical scavengers such as catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase [48]. Hence, NGF can protect against post-ischemic dysfunction of sympathetic innervations and ischemia-reperfusion myocardial injury [49,50]. In the present study, the relationship between oxidative stress and enhanced NGF levels could be deduced from the statistical relationship between NGF levels and anti-cardiolipin antibodies, which reflect vascular damage in SSc [51,52]. The normalization of NGF levels in the 5 patients undergoing endothelin inhibitor therapy reinforces the assumption of the relationship between NGF levels and oxidative stress in SSc [53].

Altogether, reduced serum BDNF levels associated with vascular lesions and oxidative stress in SSc could be counterbalanced by “protective” increased NGF levels. Further studies and animal models should help to further elucidate the pathological relevance of NGF/BDNF balance, as well as uncover the precise mechanism of this interaction in the multifaceted pathogenesis of SSc.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Professor JL Preud'homme, for the English correction of this manuscript.

We especially thank Both Rouen University Hospital Clinical Investigation Center and Limoges Clinical Research Center for their help in the realization of this study.

REFERENCES

1. Matucci-Cerinic M, Steen V, Nash P, Hachulla E (2009) The complexity of managing systemic sclerosis: screening and diagnosis. *Rheumatology (Oxford)* 48: iii8-13.
2. Aloe L, Bracci-Laudiero L, Bonini S, Manni L (1997) The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases. *Allergy* 52: 883-894.
3. Bracci-Laudiero L, Aloe L, Levi-Montalcini R, Galeazzi M, Schilter D, et al. (1993) Increased levels of NGF in sera of systemic lupus erythematosus patients. *Neuroreport* 4: 563-565.
4. Fauchais AL, Boumediene A, Lalloue F, Gondran G, Loustaud-Ratti V, et al. (2009) Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor correlate with T-cell activation in primary Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 38: 50-57.
5. Julio-Pieper M, Lozada P, Tapia V, Vega M, Miranda C, et al. (2009) Nerve Growth Factor Induces Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Granulosa Cells via a trkA Receptor/ MAPK-ERK2 dependent pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 3065-3071.
6. Kermani P, Hempstead B (2007) Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 17: 140-143.
7. Manni L, Nikolova V, Vyagova D, Chaldakov GN, Aloe L (2005) Reduced plasma levels of NGF and BDNF in patients with acute coronary syndromes. *Int J Cardiol* 102: 169-171.
8. Xu M, Remillard CV, Sachs BD, Makino A, Platoshyn O, et al. (2008) p75 neurotrophin receptor regulates agonist-induced pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H1529-1538.
9. Micera A, Vigneti E, Pickholtz D, Reich R, Pappo O, et al. (2001) Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6162-6167.
10. Coassin M, Lambiase A, Micera A, Tirassa P, Aloe L, et al. (2006) Nerve growth factor modulates in vitro the expression and release of TGF-beta1 by amniotic membrane. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 244: 485-491.
11. Micera A, Puxeddu I, Lambiase A, Antonelli A, Bonini S, et al. (2005) The pro-fibrogenic effect of nerve growth factor on conjunctival fibroblasts is mediated by transforming growth factor-beta. *Clin Exp Allergy* 35: 650-656.
12. Denton CP, Abraham DJ (2001) Transforming growth factor-beta and connective tissue growth factor: key cytokines in scleroderma pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol* 13: 505-511.

13. Tuveri MA, Passiu G, Mathieu A, Aloe L (1993) Nerve growth factor and mast cell distribution in the skin of patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 11: 319-322.
14. Matucci-Cerinic M, Giacomelli R, Pignone A, Cagnoni ML, Generini S, et al. (2001) Nerve growth factor and neuropeptides circulating levels in systemic sclerosis (scleroderma). *Ann Rheum Dis* 60: 487-494.
15. Lonzetti LS, Joyal F, Raynaud JP, Roussin A, Goulet JR, et al. (2001) Updating the American College of Rheumatology preliminary classification criteria for systemic sclerosis: addition of severe nailfold capillaroscopy abnormalities markedly increases the sensitivity for limited scleroderma. *Arthritis Rheum* 44: 735-736.
16. Medsger T, Steen V (1996) Classification, prognosis. In: Clements P, Furst D, editors. *Systemic sclerosis*. Baltimore: Williams & Wilkins. pp. 51-79.
17. Yang ZF, Ho DW, Lau CK, Tam KH, Lam CT, et al. (2006) Significance of the serum brain-derived neurotrophic factor and platelets in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 16: 1237-1243.
18. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, et al. (1988) Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 15: 202-205.
19. Clements P, Lachenbruch P, Siebold J, White B, Weiner S, et al. (1995) Inter and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 22: 1281-1285.
20. Medsger TA, Jr., Bombardieri S, Czirjak L, Scorza R, Della Rossa A, et al. (2003) Assessment of disease severity and prognosis. *Clin Exp Rheumatol* 21: S42-46.
21. Kawaguchi-Manabe H, Ieda M, Kimura K, Manabe T, Miyatake S, et al. (2007) A novel cardiac hypertrophic factor, neurotrophin-3, is paradoxically downregulated in cardiac hypertrophy. *Life Sci* 81: 385-392.
22. Piga M, Passiu G, Carta P, Satta L, Cherchi VV, et al. (2000) Increased pulmonary epithelial permeability in systemic sclerosis is associated with enhanced cutaneous nerve growth factor expression. *Eur J Intern Med* 11: 156-160.
23. Dicou E, Masson C, Jabbour W, Nerriere V (1993) Increased frequency of NGF in sera of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. *Neuroreport* 5: 321-324.
24. Aalto K, Korhonen L, Lahdenne P, Pelkonen P, Lindholm D (2002) Nerve growth factor in serum of children with systemic lupus erythematosus is correlated with disease activity. *Cytokine* 20: 136-139.
25. Seidel MF, Herguijuela M, Forkert R, Otten U (2009) Nerve Growth Factor in Rheumatic Diseases. *Semin Arthritis Rheum*.

26. Otten U, Ehrhard P, Peck R (1989) Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 10059-10063.
27. Torcia M, Bracci-Laudiero L, Lucibello M, Nencioni L, Labardi D, et al. (1996) Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell* 85: 345-356.
28. Noga O, Hanf G, Schaper C, O'Connor A, Kunkel G (2001) The influence of inhalative corticosteroids on circulating Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3 in allergic asthmatics. *Clin Exp Allergy* 31: 1906-1912.
29. Grimsholm O, Rantapaa-Dahlqvist S, Dalen T, Forsgren S (2008) BDNF in RA: downregulated in plasma following anti-TNF treatment but no correlation with inflammatory parameters. *Clin Rheumatol* 27: 1289-1297.
30. del Porto F, Aloe L, Lagana B, Triaca V, Nofroni I, et al. (2006) Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor levels in patients with rheumatoid arthritis treated with TNF-alpha blockers. *Ann N Y Acad Sci* 1069: 438-443.
31. Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, Li J, Kambayashi J, et al. (2000) Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett* 470: 113-117.
32. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, et al. (1999) Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* 189: 865-870.
33. Besser M, Wank R (1999) Cutting edge: clonally restricted production of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA by human immune cells and Th1/Th2-polarized expression of their receptors. *J Immunol* 162: 6303-6306.
34. Barthel C, Yeremenko N, Jacobs R, Schmidt RE, Bernateck M, et al. (2009) Nerve growth factor and receptor expression in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther* 11: R82.
35. Rihl M, Kruithof E, Barthel C, De Keyser F, Veys EM, Zeidler H, Yu DT, Kuipers JG, Baeten D. Involvement of neurotrophins and their receptors in spondyloarthritis synovitis: relation to inflammation and response to treatment. *Ann Rheum Dis*. 2005 Nov;64(11):1542-9.
36. Donovan MJ, Miranda RC, Kraemer R, McCaffrey TA, Tessarollo L, et al. (1995) Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. *Am J Pathol* 147: 309-324.
37. Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, Ringstedt T, Kraemer R, et al. (2000) Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development* 127: 4531-4540.

38. Ricci A, Greco S, Amenta F, Bronzetti E, Felici L, et al. (2000) Neurotrophins and neurotrophin receptors in human pulmonary arteries. *J Vasc Res* 37: 355-363.
39. Kermani P, Rafii D, Jin DK, Whitlock P, Schaffer W, et al. (2005) Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB⁺ endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors. *J Clin Invest* 115: 653-663.
40. Chalidakov GN, Fiore M, Stankulov IS, Hristova M, Antonelli A, et al. (2001) NGF, BDNF, leptin, and mast cells in human coronary atherosclerosis and metabolic syndrome. *Arch Physiol Biochem* 109: 357-360.
41. Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2004) The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci* 19: 1699-1707.
42. Kapczynski F, Frey BN, Andrezza AC, Kauer-Sant'Anna M, Cunha AB, et al. (2008) Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes. *Rev Bras Psiquiatr* 30: 243-245.
43. Ogawa F, Shimizu K, Muroi E, Hara T, Hasegawa M, et al. (2006) Serum levels of 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, are elevated in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 45: 815-818.
44. Iwata Y, Ogawa F, Komura K, Muroi E, Hara T, et al. (2007) Autoantibody against peroxiredoxin I, an antioxidant enzyme, in patients with systemic sclerosis: possible association with oxidative stress. *Rheumatology (Oxford)* 46: 790-795.
45. Santhanam AV, Smith LA, Katusic ZS Brain-derived neurotrophic factor stimulates production of prostacyclin in cerebral arteries. *Stroke* 41: 350-356.
46. Chul BL, Choi IG, Kim YK, Ham BJ, Yang BH, et al. (2009) Relation between plasma brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in the male patients with alcohol dependence. *Alcohol* 43: 265-269.
47. Kasselmann LJ, Sideris A, Bruno C, Perez WR, Cai N, et al. (2006) BDNF: a missing link between sympathetic dysfunction and inflammatory disease? *J Neuroimmunol* 175: 118-127.
48. Goss JR, Taffe KM, Kochanek PM, DeKosky ST (1997) The antioxidant enzymes glutathione peroxidase and catalase increase following traumatic brain injury in the rat. *Exp Neurol* 146: 291-294.
49. Abe T, Morgan DA, Gutterman DD (1997) Protective role of nerve growth factor against postischemic dysfunction of sympathetic coronary innervation. *Circulation* 95: 213-220.

50. Hiltunen JO, Laurikainen A, Vakeva A, Meri S, Saarma M (2001) Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor mRNAs are regulated in distinct cell populations of rat heart after ischaemia and reperfusion. *J Pathol* 194: 247-253.
51. Assous N, Allanore Y, Batteux F, Meune C, Toulon P, et al. (2005) Prevalence of antiphospholipid antibodies in systemic sclerosis and association with primitive pulmonary arterial hypertension and endothelial injury. *Clin Exp Rheumatol* 23: 199-204.
52. Delgado Alves J, Mason LJ, Ames PR, Chen PP, Rauch J, et al. (2005) Antiphospholipid antibodies are associated with enhanced oxidative stress, decreased plasma nitric oxide and paraoxonase activity in an experimental mouse model. *Rheumatology (Oxford)* 44: 1238-1244.
53. Gupta SK, Saxena A, Singh U, Arya DS (2005) Bosentan, the mixed ETA-ETB endothelin receptor antagonist, attenuated oxidative stress after experimental myocardial ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem* 275: 67-74.

TABLE 1

Clinical characteristics		
Age, y (<i>mean ± sd</i>)	54.5 ± 12	
Female, n(%)	43 (93)	
Classification of scleroderma spectrum of disease, n (%)		
Diffuse scleroderma	9 (19)	
Limited scleroderma	33 (72)	
Overlap syndrome	4 (9)	
Skin involvement, Rodnan score (<i>mean ± sd</i>)	9.3 ± 7.5	
Digital ulcers, n (%)		
evolutive	5 (11)	
previous	15 (33)	
Articular involvement, n (%)	15 (33)	
Pulmonary fibrosis, n (%)	1 (2)	
Pumonary hypertension, n (%)	2 (4)	
associated with pulmonary fibrosis	1 (2)	
isolated	1 (2)	
Digestive complications, n (%)	18 (39)	
Associated Sjögren syndrome, n (%)	9 (19)	
Functional respiratory tests characteristics		
FVC (<i>liters mean ± sd; % mean ± sd</i>)	3.45 ± 0.89	110 ± 16.2
DLCO (<i>CO ml / min / mmHg mean ± sd; % of predicted</i>)	18.6 ± 4.47	76.5 ± 13.5
DLCO/ VA (<i>% of predicted</i>)		88.7 ± 15.4
6 month-previous DLCO/ VA (<i>% of predicted</i>)		86.2 ± 15.9
6 minutes walk test (<i>meters mean ± sd; % of predicted</i>)	440.45 ± 97.8	84.4 ± 11.2
Immunological characteristics		
Anti-nuclear Ab, n (%)	44 (96)	
Anti-Scl70 Ab, n (%)	3 (7)	
Anti-centromere Ab, n (%)	33 (71)	
Anti-cardiolipin Ab, n (%)	8 (17)	

Table 1: clinical, immunological profiles and functional respiratory tests characteristic of patients with systemic sclerosis (SSc). FVC: forced vital capacity, DLCO: diffusing lung factor for carbon monoxide, DLCO/VA diffusing capacity divided by the alveolar volume. sPAP: Systolic pulmonary artery pressure at right heart catheterism. Ab: antibodies.

LEGENDS TO THE FIGURES

Figure 1: (A) Nerve Growth Factor (NGF), (B) Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and (C) Neurotrophin-3 (NT-3) concentrations measured by ELISA in systemic sclerosis (SSc) patients compared to healthy controls (Controls) (Mann-Whitney tests). The boxes represent the 50th percentiles while the bars outside the boxes show the 10th and 90th percentiles (●); the horizontal grey lines represent median values. (D) BDNF serum levels in overlap syndrome (white box), limited SSc (lSSc, grey box) and diffuse SSc (dSSc grey dotted box) (Mann-Whitney tests).

Figure 2: (A) Correlation between Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Nerve Growth Factor (NGF) levels in (A) SSc patients (grey circles) and (B) healthy controls (white circles). The linear regression curve and coefficient of determination given by the analysis of variance are both represented. Each point represents an individual patient and a healthy control. r defines the coefficient of determination given by the analysis of the variance table. p -values were determined by Spearman's rank correlation test.

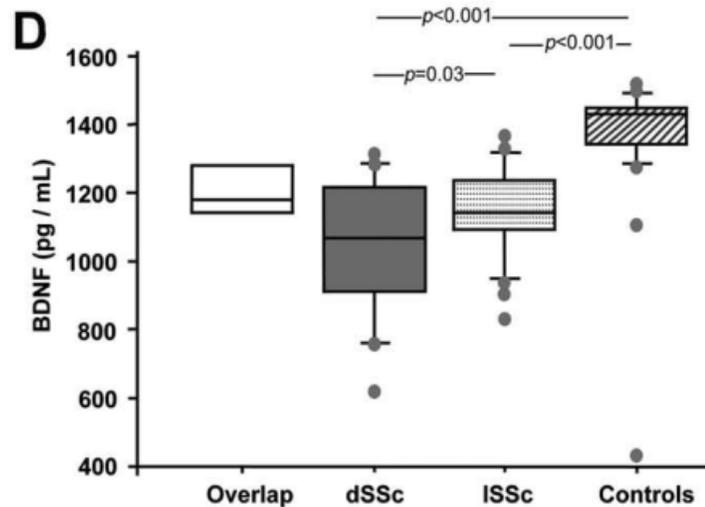
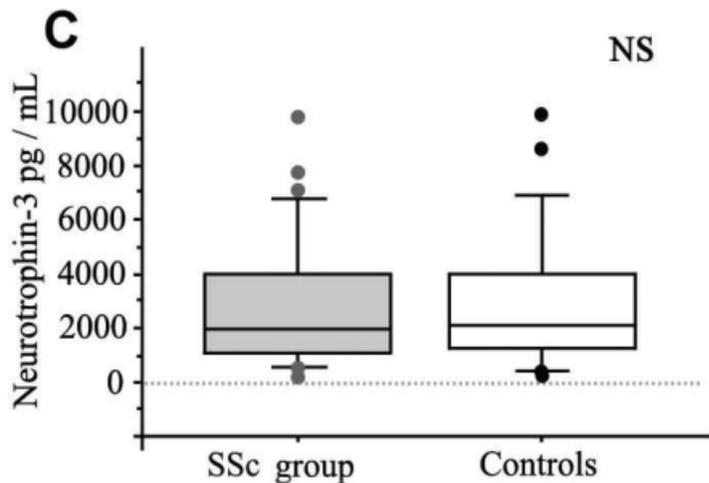
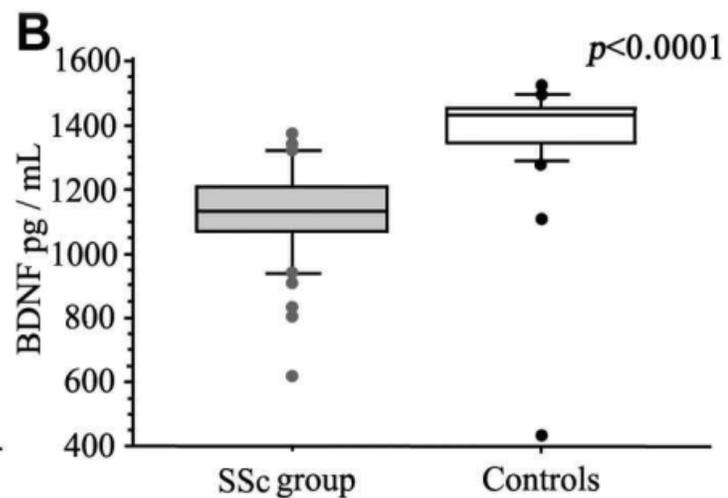
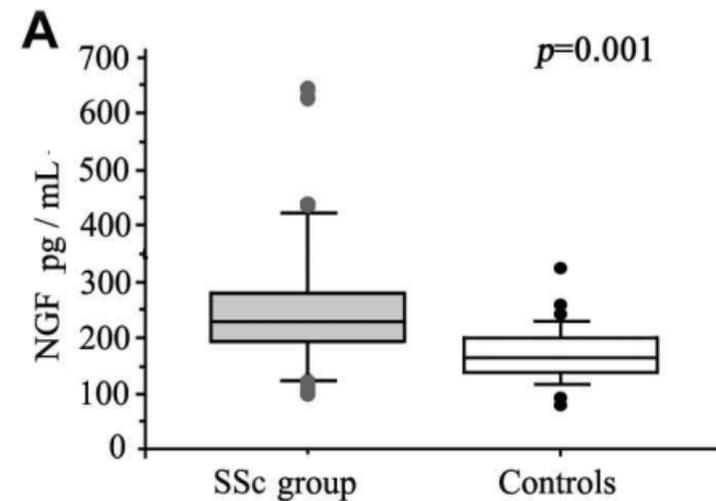
Figure 3: Correlation between Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) concentrations and forced vital capacity in limited SSc group (lSSc, grey circles). Each point represents an individual patient. r defines the coefficient of determination given by the analysis of variance table. p -value was determined by Spearman's rank correlation test.

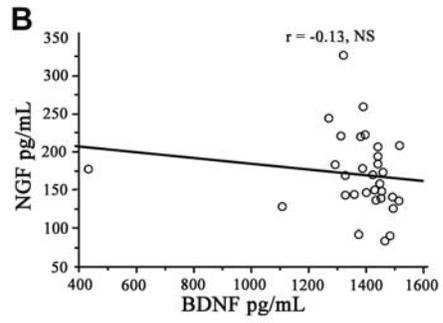
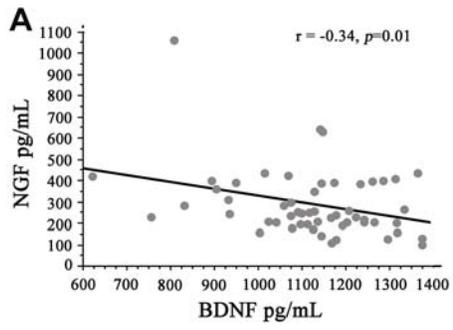
Figure 4: (A) Nerve Growth Factor (NGF) concentrations (ELISA) in patients with (acl+) or without (acl-) anti-cardiolipin Ab (Mann-Whitney test). The boxes represent the 50th percentiles while the bars outside the boxes show the 10th and 90th percentiles (●); the horizontal grey lines represent median values. (B) Correlation between Nerve Growth Factor

(NGF) concentrations and gammaglobulins levels. The linear regression curve and coefficient of determination given by the analysis of variance are both represented. *p*-value was determined by Spearman's rank correlation test.

Table 1: clinical, immunological profiles and functional respiratory tests in patients with SSc. FVC: forced vital capacity, DLCO: diffusing lung factor for carbon monoxide. sPAP: Systolic pulmonary artery pressure at right heart catheterism. Ab: antibodies.

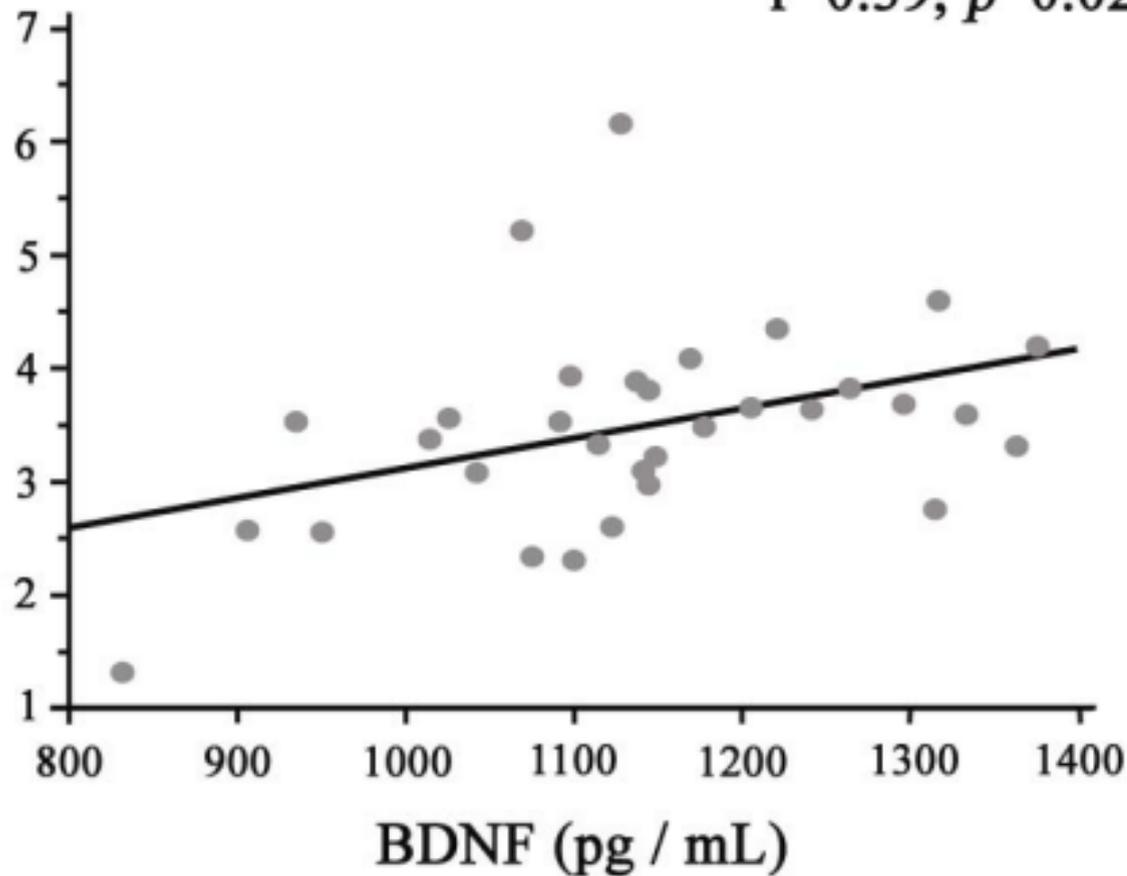
DISCLOSURE STATEMENT: The authors have declared no conflicts of interest.

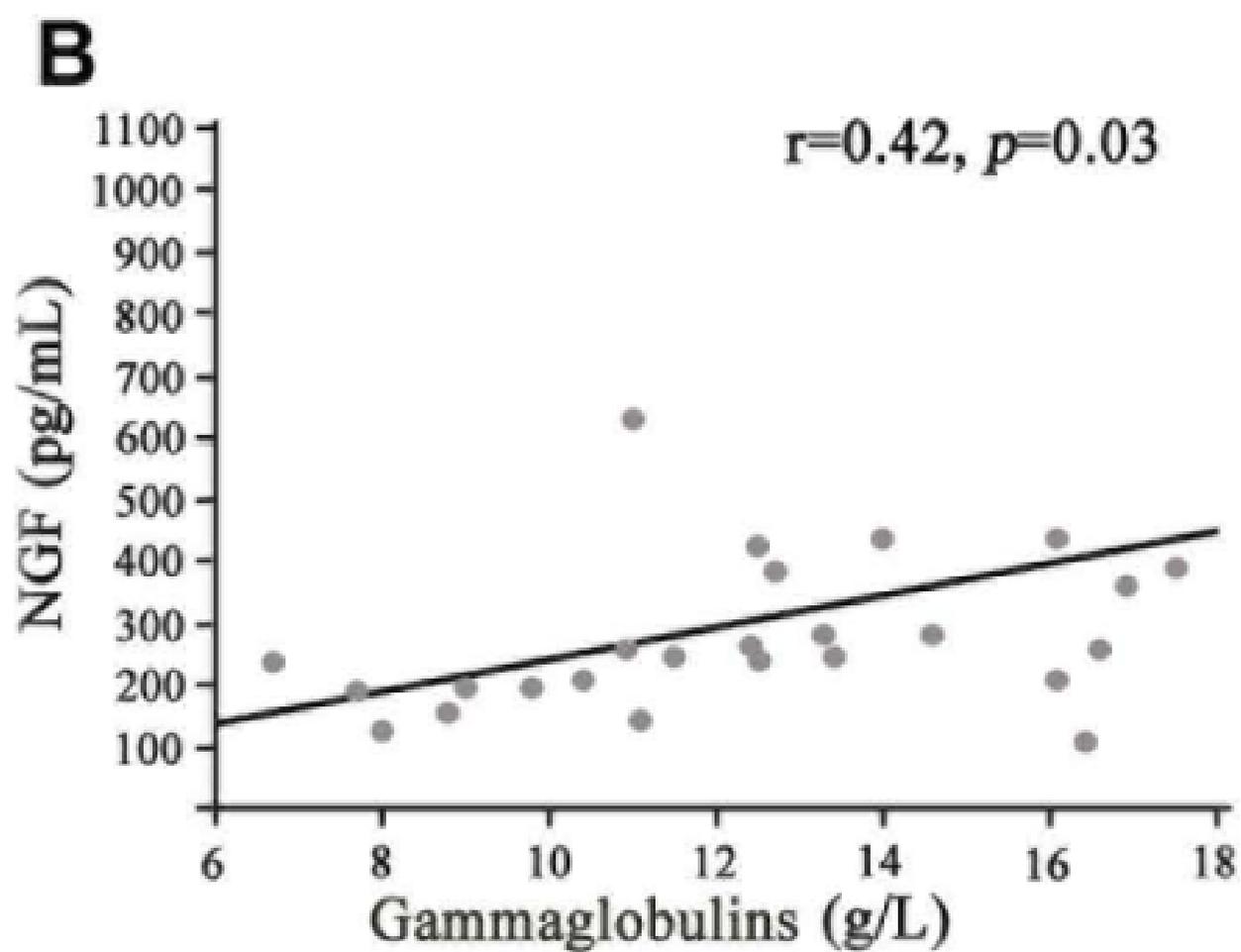
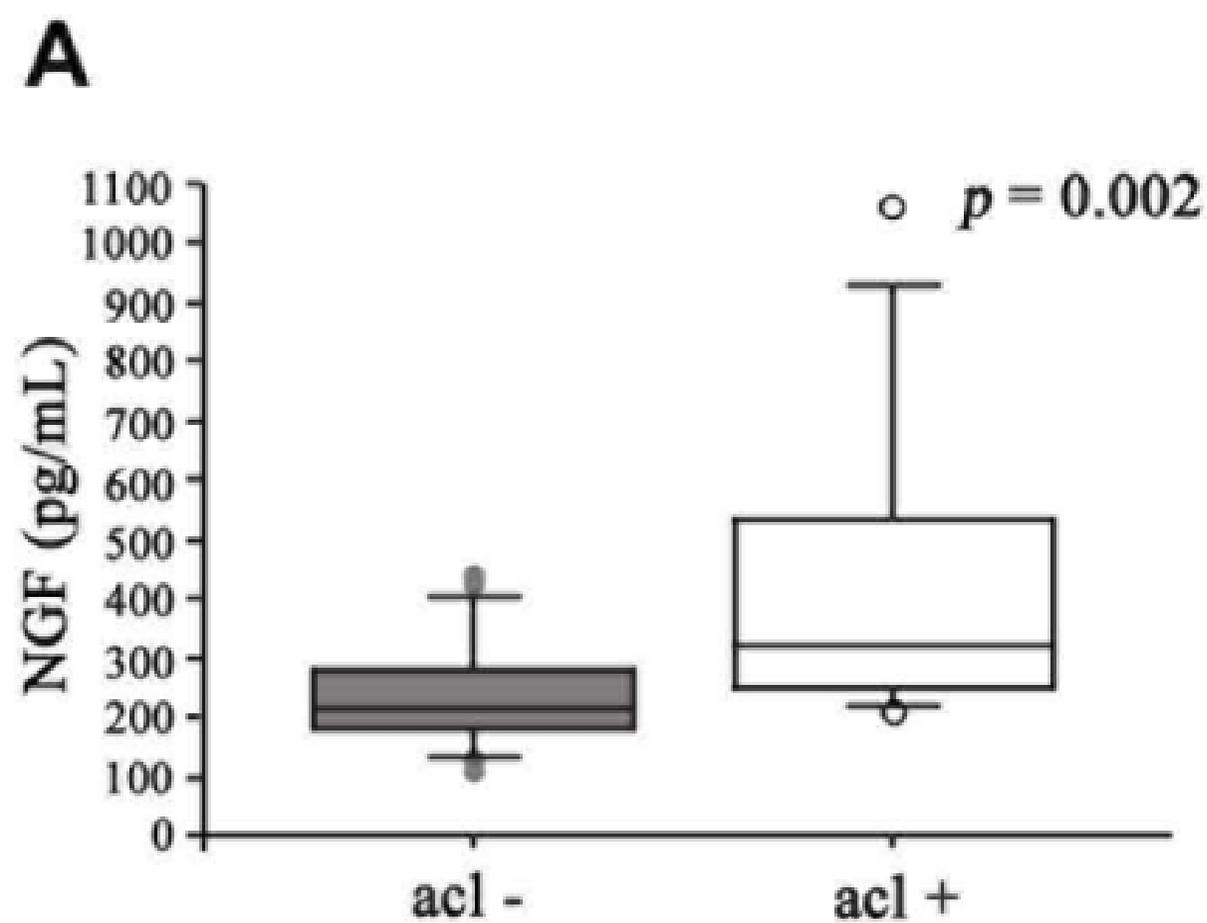




Forced vital capacity (L)

$r=0.39, p=0.02$





Annexe 6: Article 2