



Thèse

2006

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Régulation de la production de cytokines par le tissu adipeux in vivo

Schwarz, Claude

How to cite

SCHWARZ, Claude. Régulation de la production de cytokines par le tissu adipeux in vivo. Doctoral Thesis, 2006. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:421

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:421>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:421](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:421)

Université de Genève

Faculté de médecine

Section de médecine clinique

Département de médecine interne

Service d'endocrinologie, diabétologie et nutrition

Unité d'endocrinologie

Thèse préparée sous la direction du Pr. Christoph A. Meier

Régulation de la production de cytokines par le tissu adipeux in vivo

Thèse
présentée à la Faculté de Médecine
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

Par

Claude SCHWARZ

de
Genève (GE)

Thèse n° 10480

Genève

2006

Résumé

Le tissu adipeux blanc est probablement l'organe où le degré de nos connaissances et la variété de fonctions ont évolués les plus ces quinze dernières années. Il est de plus en plus clair que le tissu adipeux joue un rôle important dans l'inflammation. Cette étude réalisée sur 26 volontaires sains a permis de montrer la réaction inflammatoire présente dans le tissu adipeux suite à une agression mécanique minime. L'étude a porté sur le dosage sanguin de l'IL-1-Ra, MCP-1, adiponectine et IL-8. Cette réaction peut être modulée par certains anti-inflammatoires tel que le diclofenac ou la dexaméthasone. Nous avons pu prouver que l'agression minime localisée était à l'origine d'une augmentation de cytokines pro inflammatoires accompagnée d'une augmentation de lymphocytes. L'étude histologique des prélèvements effectués nous suggère une participation active du tissu adipeux dans cette réaction inflammatoire par la sécrétion de cytokines.

Sommaire

A. Introduction.....	4
1. Importance de l'obésité dans notre société	
2. Le tissu adipeux, un organe à part entière	
3. Cytokines :	
a. TNF α	
b. IL-6	
c. IL-8	
d. MCP-1	
e. Adiponectine	
f. IL-1/IL-1Ra	
4. Les cytokines du tissu adipeux contribuent à l'inflammation locale.	
B. Etude.....	12
1. Introduction	
2. Personnes cibles	
3. Technique de prélèvement	
4. Technique d'analyse	
C. Résultats.....	17
1. Effet d'une agression mécanique minime sur l'expression des cytokines/chémokines	
2. Effet d'une agression mécanique minime sur l'expression des cytokines/chémokines avec prise de dexaméthasone	
3. Effet d'une agression mécanique minime sur l'expression des cytokines/chémokines avec prise de diclofenac	
4. Histologie	
D. Conclusions.....	29
E. Remerciements.....	31
F. Références.....	31

1. Introduction

1. Importance de l'obésité dans notre société

En médecine on définit l'obésité par un indice appelé Body Mass Index (BMI). Si cet indice est supérieur à 30kg/m² il y a obésité, s'il est situé entre 25 et 30 il s'agit de surpoids. Au delà de 40 il y a une obésité morbide.

Les données les plus récentes des études effectuées au plan national par l'OMS, laissent à penser que la prévalence de l'obésité dans les pays européens se situe actuellement entre 10 et 20% chez l'homme et entre 10 et 25% chez la femme. La prévalence de l'obésité est en général plus élevée chez la femme que chez l'homme.

Fréquemment l'obésité est associée à une constellation de pathologies que l'on a regroupée sous le nom de syndrome métabolique. Ce syndrome comprend notamment l'obésité, l'hypertension artérielle, l'intolérance au glucose ou diabète de type 2 (insulino-résistant), les dyslipidémies (augmentation des triglycérides, et cholestérol de type LDL, baisse du cholestérol HDL) et l'hyperuricémie. Nous savons de plus en plus que le tissu adipeux est un tissu actif qui a un rôle endocrinien et inflammatoire (1,2).

2. Le tissu adipeux, un organe à part entière

Le tissu adipeux blanc (TAB) est probablement l'organe où le degré de nos connaissances et la variété de fonctions ont évolués le plus ces quinze dernières années. Pendant longtemps, il a été considéré comme un organe relativement inerte stockant de l'énergie sous forme de triglycérides. Sécrétant une vaste gamme de peptides d'actions variées et multiples, c'est devenu un organe central du métabolisme et de l'inflammation. En effet, certains de ces peptides ont tout d'abord inscrit leurs effets dans le catalogue des effets métaboliques, mais par la suite d'autres propriétés telles que celles liées à l'inflammation ont été démontrées pour des hormones telles que la leptine et l'adiponectine (Fig. 1). D'autres protéines sont des cytokines bien caractérisées telles que l'interleukine (IL-6, l'IL-1), et l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra) ou encore le "tumor necrosis factor α " (TNF α), dont les effets vont bien au-delà de leurs propriétés pro- ou anti-inflammatoires. Il est devenu évident que de part l'augmentation de sa masse, le TAB peut jouer un rôle clé dans les dysfonctionnements métaboliques et inflammatoires liés à l'obésité tels que la résistance à l'insuline, le diabète et l'athérosclérose (Fig. 1), cette dernière étant maintenant reconnue comme une maladie inflammatoire (3).

Le TNF α et l'IL-6 sont des cytokines qui induisent une réponse inflammatoire à la fois aiguë et chronique (4) et sont souvent décrites comme étant étroitement liées à la résistance à l'insuline induite par l'obésité. TNF α a tout d'abord été décrit comme induisant la nécrose de tumeurs et la cachexie. Ce dernier effet peut être expliqué par la suppression de gènes spécifiques des adipocytes tels que la lipoprotéine lipase et par la stimulation de la lipolyse (5, 6). Le tissu adipeux exprime cette cytokine dans différents modèles d'obésité du rongeur où son expression est augmentée (7). Chez l'homme cette augmentation est plus controversée et la sécrétion dans la circulation à partir du tissu adipeux reste à éclaircir (8, 9, 10). Il n'en demeure pas moins que TNF α est décrit comme l'un des éléments participant à l'évolution du diabète de type 2 dans l'obésité par son action sur la sensibilité à l'insuline (11, 12). Quant au niveau sérique de l'IL-6, il est augmenté dans l'obésité et le diabète de type 2 et correspond avec l'index de poids corporel (BMI) (13). Cette cytokine est produite in vivo et in vitro par le tissu adipeux et en plus grande quantité par le dépôt viscéral (14, 10). L'IL-6 diminue la signalisation de l'insuline dans les hépatocytes et le transport du glucose induit par l'insuline dans les adipocytes (15, 16). De plus, les souris déficientes pour le gène de l'IL-6 sont obèses, ce qui est en accord avec l'effet lipolytique de l'IL-6 (17, 18). Ces effets peuvent être médiés par un effet direct sur le tissu adipeux ou bien encore centralement par l'augmentation de la dépense énergétique (19).

Nous reviendrons plus en détails sur chacune de ces cytokines.

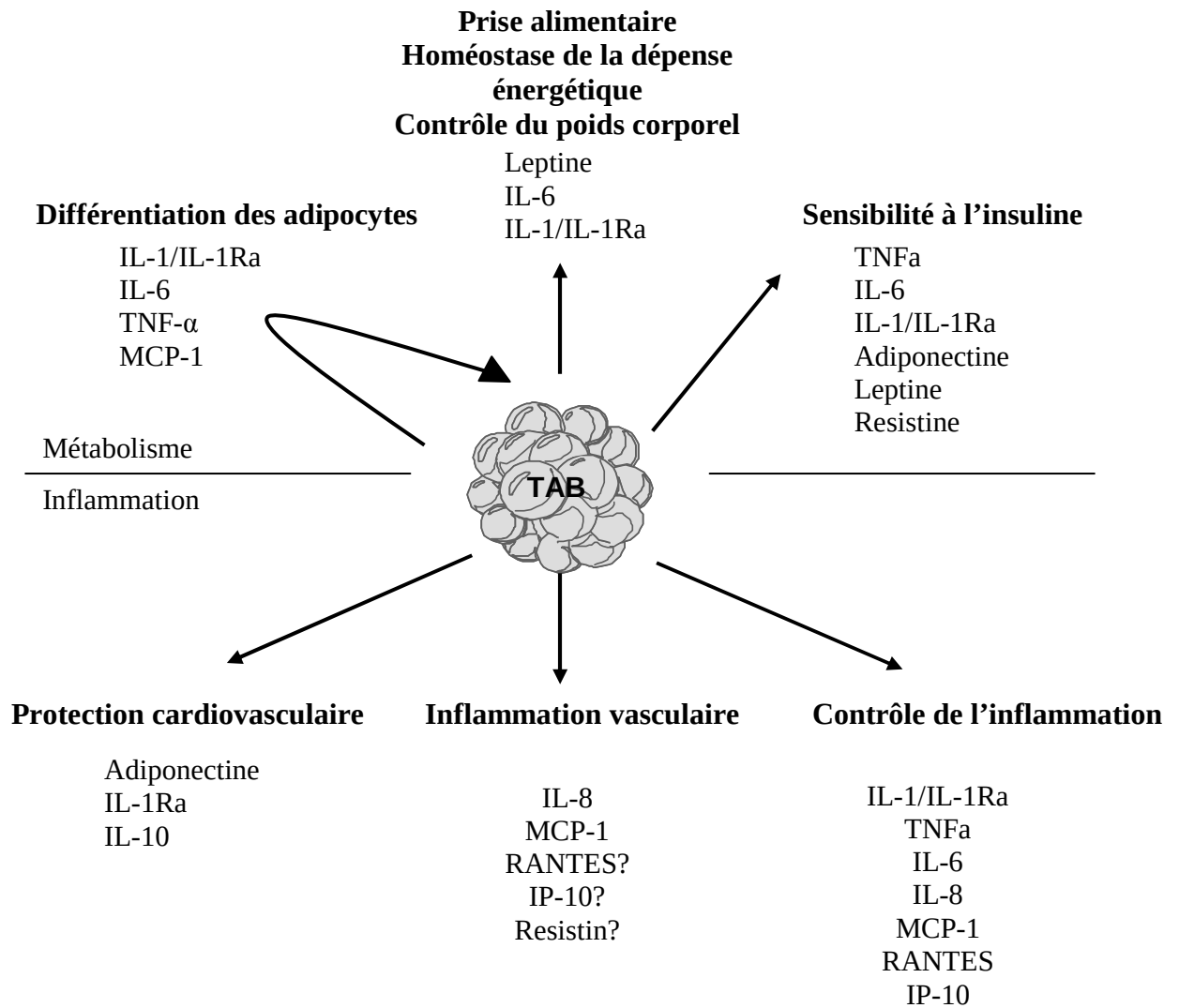


Figure 1. Le tissu adipeux blanc produit une large variété de protéines ayant un rôle de régulateur dans le métabolisme et l'inflammation. En effet, ces protéines contribuent au maintien de l'homéostasie de la dépense énergétique mais sont aussi impliquées dans la pathogenèse de complications vasculaires et métaboliques de l'obésité.

3. Cytokines et protéines apparentées

a. TNF α

TNF α a été originalement décrit comme induisant la nécrose de tumeur après infection bactérienne. Cette cytokine est également impliquée dans l'inflammation, les maladies auto-immunes, la genèse tumorale, les métastases, la réplication virale, les chocs septiques et la fièvre. Une grande variété d'agents peut induire sa sécrétion comme les endotoxines, les virus, les cytokines (par exemple IL-1) et les médicaments. La production de TNF α est diminué par IFN α , IFN- β , IL-6 et par des cytokines immunosuppressives telles que IL-4 et

IL-10. Plusieurs médicaments peuvent inhiber la production de TNF α comme la dexaméthasone et la cyclosporine A. TNF α est produite par beaucoup de cellules, du système immunitaires (monocytes, lymphocytes T et B, polymorphonucléaires), aux cellules tumorales, fibroblastes et cellules du muscle lisse (20).

Initialement décrite comme un facteur induisant une cachexie malgré une alimentation normale, TNF α a été ultérieurement impliqué dans le métabolisme lipidique par son effet suppresseur d'expression de nombreux gènes spécifiques adipeux, comme la lipoprotéine lipase et par son effet stimulateur de la lipolyse en induisant une diminution des triglycérides dans les adipocytes (21,6). Le premier lien avec l'obésité a été fait chez des souris génétiquement modifiée (*db/db*) obèse. Leur tissu adipeux épидидymial sécrète le TNF α à un niveau significativement très élevé (7). Cependant l'augmentation de TNF α chez l'humain obèse est controversée (8, 9).

Le rôle de TNF α dans le développement de la résistance à l'insuline a été découvert par ses capacités à diminuer le glucose transporteur type 4 (GLUT4) dans le tissu adipeux et le muscle (11). L'administration chronique de TNF α diminue l'utilisation du glucose induite par l'insuline du muscle squelettique des rats (11).

Une délétion du gène de TNF α diminue modestement le poids corporel et la masse graisseuse. L'obésité induite par une alimentation riche en graisse ou par une lésion hypothalamique ne montre pas de différence chez l'animal de type sauvage, ce qui laisse à penser que cette cytokine n'est pas un facteur majeur pour le contrôle du poids corporel ou de la masse graisseuse (22,23). Cependant les souris obèses déficientes en TNF α sont moins hyperglycémiques, moins hyperinsulinémiques et plus intolérantes vis à vis du glucose que les souris de type sauvage (22, 23). Ces différences sont expliquées par une diminution des acides gras libres et une augmentation des GLUT4 dans le muscle et par la phosphorylation des récepteurs à l'insuline dans le tissu adipeux et musculaire (23).

b. IL-6

L'IL-6 circulant, souvent en association avec IL-1 et TNF α , provoque une réaction aigue comme de la fièvre ou la production hépatique de protéines. IL-6 a aussi des actions anti-inflammatoires puisqu'elle diminue le taux de TNF α et IFN γ , IL-1Ra (24). La concentration d'IL-6 est augmenté dans le diabète de type 2, dans le syndrome métabolique et il existe une corrélation entre la concentration et le BMI (13). IL-6 est sécrété par le tissu adipeux humain in vitro et in vivo et préférentiellement par le tissu adipeux viscéral (10,25). 90% de la

production d'IL-6 vient de cellules stromales non adipeuses. Récemment l'IL-6 a montré sa capacité à induire une résistance à l'insuline partielle, par les adipocytes 3T3-L1, en diminuant la phosphorylation de IRS-1 et l'expression de IRS-1 et GLUT4 (16).

D'autres effets auto/paracrine de l'IL-6 sur le tissu adipeux ont été décrit : le taux d'IL-6 est élevé dans les cancers cachexisants. IL-6 diminue l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) dans les adipocytes 3T3-L1 et induit une lipolyse dans les adipocytes de sein humain (18). Une étude in vivo chez l'homme a montré que l'infusion d'IL-6 induit une oxydation des acides gras et une lipolyse. Cet effet paraît être médié centralement puisque l'administration centrale d'IL-6 augmente la dépense énergétique et résulte en une perte de masse graisseuse.

c. IL-8

Interleukine 8 (IL-8) est secrétée par beaucoup de cellules notamment les monocytes, lymphocytes, granulocytes, fibroblastes, cellules endothéliales, cellules de l'épithélium bronchial, kératinocytes, hépatocytes, cellules mésangiales et les chondrocytes. Cette cytokine est impliquée dans de nombreux processus inflammatoires via ses propriétés chimotactiques (chimokines) et angiogéniques. IL-8 est chimotactique pour beaucoup de cellules comme les neutrophiles, cellules T, basophiles, cellules du muscle lisse. L'IL-8 a un rôle essentiel dans l'inflammation aigue mais aussi un rôle dans la prolifération des cellules endothéliales et c'est un important facteur angiogénique (26). L'angiogénèse intervient dans l'athérosclérose et le rôle d'IL-8 dans ce processus n'est pas encore très clair (27, 28). L'IL-8 aurait la capacité d'arrêter les monocytes dans l'endothélium et participer ainsi à son infiltration dans les tissus. La régulation est la suivante : IL-1 β et TNF α augmentent la sécrétion d'IL-8 alors que la dexaméthasone et IFN β la diminuent (29).

De nombreuses études ont démontré l'augmentation de sécrétion d'IL-8 chez les obèses en particulier par le tissu adipeux viscéral (30). Chez les patients obèses le taux d'IL-8 est corrélé à la masse adipeuse (31).

d. MCP-1

L'expression basale de MCP - 1 est en générale très faible, mais cette cytokine (de la classe des chemokines) peut être induite par différents stimuli tel que IL-1, TNF α ou LPS. Dans des conditions normales, le taux de MCP-1 est indétectable. L'expression de MCP-1 a été détectée dans des processus inflammatoires associant une infiltration de cellules

mononucléaires incluant l'athérosclérose (32, 3). On a pu récemment démontrer qu'un taux trop élevé de MCP-1 chez l'humain obèse diminuait avec la perte de poids (33). De plus une infusion de MCP-1 chez la souris augmente le nombre de monocytes sanguins sans changement de poids (34).

On a pu démontrer une production de MCP-1 par le tissu adipeux épigastrique parallèle à l'infiltration de cellules inflammatoires (35). Ceci renforce l'hypothèse que les macrophages présents dans le tissu adipeux contribuent à la production locale de cytokines. Ces résultats sont corroborés par Weisberg et al. qui ont démontré, chez la souris et l'humain, la corrélation positive entre les macrophages présents dans le tissu adipeux et le degré d'obésité (36).

L'expression isolée de MCP-1 par les adipocytes a été clairement démontrée (33). La production de MCP-1 a été mise en évidence par les adipocytes 3T3-L1 (37). MCP-1 est sécrété *in vitro* par les cellules 3T3-L1 insulino-résistantes. Cette sécrétion est augmentée par un traitement d'insuline, ainsi MCP-1 reste insulino-sensible chez ces cellules insulino-résistantes (37).

e. Adiponectine

L'adiponectine a été découverte en même temps que 4 autres groupes d'adipocytes, adipocyte complement-related protein of 30kDa (Acrp30). Sa production est exclusivement réalisée dans le tissu adipeux (38). Chez l'homme sa production est légèrement supérieure dans le tissu adipeux sous cutané que le tissu adipeux viscéral (39).

On retrouve cette protéine à raison de quelques microgrammes par millilitre et sa concentration est plus basse chez l'obèse que chez le svelte. On a pu démontrer une concentration inversement proportionnelle au BMI (40).

L'adiponectine a un rôle dans la résistance à l'insuline. En effet on a constaté qu'une surexpression d'adiponectine chez les souris *ob/ob* (obèse et diabétique) augmente la sensibilité à l'insuline (41). L'administration d'adiponectine avant un repas riche en graisse prévient l'augmentation d'acide gras libre dans le plasma en stimulant l'oxydation des acides gras dans le muscle par l'intermédiaire de l'activation de l'AMP-activated protein kinase (38). Les récepteurs à l'adiponectine sont quasi exclusivement situés dans le muscle (AdipoR1) et le foie (AdipoR2) et l'effet sur la captation du glucose via l'AMPkinase a été observé chez les adipocytes de rat (42, 43).

L'adiponectine a un rôle anti-inflammatoire particulièrement par rapport à l'athérosclérose. In vivo des souris déficientes en adiponectine montrent une formation néointimale artérielle plus importante après une induction inflammatoire de l'adventice (38). In vitro, l'adiponectine inhibe l'adhésion induit par $\text{TNF}\alpha$ des monocytes aux cellules endothéliales en diminuant l'expression de VCAM-1, ICAM-1 et E-selectin (38). L'adiponectine augmente l'expression du TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloprotease-1) dans les macrophages humains ce qui résulte en une augmentation de la stabilité des plaques athéromateuses (44). Le niveau d'adiponectine est inversement proportionnel aux concentrations d'IL-6 et CRP. Les personnes ayant un taux d'adiponectine bas présentent une augmentation de la prévalence des maladies cardiovasculaires (45, 46).

f. IL-1 et IL-1Ra

L'une des cytokines les plus exprimées dans le tissu adipeux humain, est l'IL-1Ra. Comme cela a été signalé plus haut, il s'agit une cytokine anti-inflammatoire, faisant partie de la famille des interleukines 1 et exerçant son action en s'opposant à l'effet de l'IL-1 en se liant à son récepteur sans engendrer de signal intracellulaire (47). Dès lors, il semble clair que son action métabolique va se diriger dans le sens opposé de celui de l'IL-1.

Depuis un certain temps déjà les effets métaboliques de l'IL-1 sont documentés tendant à lui attribuer plusieurs actions tant au niveau central que périphérique. En effet, si l'on considère l'effet anorexigène de l'IL-1, peut être en partie expliqué par son action hypothalamique puisque cette interleukine ainsi que son récepteur y sont exprimés de façon constitutive et que l'expression de l'IL-1 est promue par la leptine (48, 49). Plus directement, lorsque le gène du récepteur de l'IL-1 est invalidé, l'action de la leptine au niveau de la prise alimentaire est inhibée engageant l'IL-1 dans un rôle prépondérant pour le contrôle de la balance énergétique (50, 51). En périphérie, son action métabolique se situe essentiellement au niveau de l'adipogenèse et de la sensibilité à l'insuline pour le transport du glucose. En effet, l'IL-1 exerce un effet direct inhibiteur sur l'activité et de lipoprotéine lipase (LPL) et augmente la lipolyse. De plus, il inhibe l'expression d'un facteur de transcription important pour la différenciation adipocytaire, le "peroxisome proliferator-activated receptor γ " (PPAR γ) (52, 53, 54). Les effets de l'IL-1 sur l'homéostasie du glucose sont aussi bien documentés. Il apparaît que l'interleukine peut contrôler la sensibilité à l'insuline à travers des mécanismes périphériques et centraux dans divers modèles de rongeurs diabétiques (55, 56, 57). In vitro, il a été démontré que l'IL-1 améliorait le transport du glucose, allant dans le même sens que des

observations faites in vivo sur l'augmentation de la capture du glucose en périphérie et de la diminution de production hépatique de glucose (30, 58).

L'IL-1Ra est produit par une grande variété de cellules et notamment par les monocytes. Il a été particulièrement intéressant de constater que la production de cette cytokine dans les monocytes était contrôlée entre autre par la leptine suggérant qu'en cas d'hyperleptinémie, les taux sériques pouvaient être plus élevés (59). Ceci a pu être indirectement démontré dans le sérum de patients obèses où la leptine est élevée et où une augmentation importante de l'IL-1Ra d'environ 7 fois par rapport aux sujets minces a été mesurée (60). De plus, le taux sérique de l'IL-1Ra est modulé par la perte de poids chez les patients subissant une chirurgie baryatrique et une bonne corrélation a été obtenue entre le taux d'IL-1Ra, la leptinémie et le "body mass index" (BMI). Compte tenu que l'effet de la leptine dépend de la présence du récepteur de l'IL-1, on pouvait dès lors imaginer que l'IL-1Ra participait à la résistance à la leptine souvent décrite dans l'obésité (60).

La diminution de la concentration sérique de l'IL-1Ra lors de la perte de poids laissait supposer que les monocytes n'étaient peut-être pas la source majeure de cette cytokine, mais que le tissu adipeux était un bon candidat. En effet, le tissu adipeux humain sous-cutané produit de manière importante l'IL-1Ra et 3 fois plus chez les sujets obèses que minces (61). Dans les modèles d'obésité des rongeurs, par exemple chez les souris *ob/ob*, ou chez des souris soumises à une diète riche en graisse, on trouve également que l'expression de l'IL-1Ra est particulièrement augmentée dans le tissu adipeux (61, 62).

Compte tenu du fait que chez l'homme on a constaté que la meilleure corrélation obtenue était celle entre la concentration sérique d'IL-1Ra et l'index de résistance à l'insuline, et connaissant le rôle de l'IL-1 dans le transport du glucose, on a évalué les conséquences de cette augmentation sur l'homéostasie du glucose chez les rongeurs. Après un traitement chronique avec l'IL-1Ra, des clamps euglycemic/hyperinsulinemic ont montré que la dose de perfusion pour le maintien d'une glycémie stable était plus faible pour les rats traités avec la cytokine, de plus la sensibilité à l'insuline était diminuée et reflétait une diminution d'utilisation du glucose par le muscle (62). Dans le même sens, l'invalidation du gène de l'IL-1Ra (IL-1Ra^{-/-}) entraîne une diminution de la glycémie et de l'insulinémie et un rapport insuline:glucose plus bas que les souris de type sauvage suggérant une sensibilité accrue à l'insuline (62, 63).

En accord avec les effets lipolytiques de l'IL-1, les souris IL-1Ra^{-/-} présentent un pourcentage de masse grasse de 25% plus faible que le type sauvage, essentiellement dû à une diminution de 77% de la taille des adipocytes. Cet effet peut être expliqué par la diminution de

l'expression de facteurs de transcription clés pour la différenciation, Krox20, PPAR γ et "CAAT enhancer-binding protein γ " (C/EBP γ) ainsi que par l'enzyme LPL impliqué dans le transport des acides gras dans la cellule (64). Il est important de constater qu'en dépit d'une prise alimentaire plus élevée, le poids des animaux IL-1Ra^{-/-} était moindre et leur masse adipeuse plus faible, ce qui peut être expliqué par une dépense énergétique plus élevée (64). En conclusion, on peut envisager que l'excès d'IL-1Ra dans l'obésité peut avoir des conséquences non négligeables au niveau du contrôle de la dépense énergétique, de la prise alimentaire, de la masse adipeuse, ainsi que de la sensibilité à l'insuline, en s'opposant aux effets de l'IL-1 constitutivement présente.

4. Les cytokines du tissu adipeux contribuent à l'inflammation locale.

L'obésité est un facteur de risque important pour les maladies cardiovasculaires. Bien que le diabète et l'hypertension artérielle peuvent expliquer l'augmentation de ce risque, il est de plus en plus clair que certaines des cytokines et chemokines pourrait y jouer un rôle spécifique. Nous voudrions en connaître plus par rapport au rôle du tissu adipeux dans l'inflammation. Est-il capable d'initier lui même une réaction inflammatoire ?

2. Etude

1. Introduction

Le tissu adipeux produit des cytokines cependant on comprend mal la régulation de ces dernières. On sait que le tissu adipeux participe activement à une inflammation notamment suite à une agression avec du lipopolysaccharide (LPS) qui a pour effet d'augmenter l'IL-1Ra (fig. 2).

Le but de ce travail est d'étudier la réaction du tissu adipeux suite à une agression minime. Ladite « agression » est constituée par le fait même de ponctionner le tissu adipeux. L'expérience consiste à prélever du tissu adipeux à l'état basal, à jeun, et de prélever ensuite à nouveau 6h plus tard, au même endroit, pour y déterminer la réaction inflammatoire. Dans le même temps nous avons ponctionné du sang pour le contrôle du taux des cytokines sanguines, mais les taux sanguins n'ont pas été influencés par cette ponction, nous n'avons donc pas présenté ces résultats.



- c. Un groupe chez qui nous avons administré un anti-inflammatoire non stéroïdien à savoir le diclofenac 50 mg (Voltaren, inhibiteur non sélectif de la cyclo-oxygénase). Nous avons effectué le premier prélèvement au temps t0 puis nous avons administré 50 mg de diclofenac (t1), puis nous avons effectué un deuxième prélèvement 6 heures plus tard (t2).



Ensuite nous avons effectué un test contrôle chez 3 patients en effectuant la même manœuvre, à la différence que nous avons prélevé du tissu adipeux à deux endroits différents.

L'analyse s'est faite dans le tissu adipeux sous-cutané pour déterminer l'expression des cytokines. Une étude histologique du tissu adipeux a été faite pour déterminer la présence de cellules inflammatoires.

2. Personnes cibles

Après autorisation de la commission d'éthique des hôpitaux universitaires genevois, avoir donné une information éclairée et fait signer une feuille de consentement sur l'étude, nous avons procédé aux prélèvements de sang et de tissu adipeux. Les personnes étaient des personnes en bonne santé habituelle. Nous avons eu 26 sujets selon la répartition de 15 hommes pour 11 femmes. Un BMI moyen de 26 ± 7.2 kg/m² (range entre 20.2 et 45.7). L'âge moyen est de 27 ± 9 kg/m² (range entre 19 et 59 ans).

La répartition s'est faite selon 3 groupes : groupe sans traitement (9 personnes), groupe après administration de dexaméthasone 8 mg (8 personnes), groupe avec administration de diclofenac (Voltaren) 50 mg (9 personnes). Le traitement a été administré juste après le premier prélèvement. L'attribution des personnes dans les groupes s'est faite au hasard.

Nous avons exclus les personnes allergiques à la lidocaïne, aux AINS et à la dexaméthasone, celles prenant des anticoagulants ainsi que celles ayant certaines maladies telles que diabète, maladies inflammatoires, tumeurs malignes.

Les dosages des différentes cytokines au niveau RNA et protéine ont été couverts par les projets de fonds nationaux du Prof Christoph A. Meier, du Prof Alain Golay, du Prof Jean-Michel Dayer.

3. Technique de prélèvement

Nous avons effectué deux ponctions veineuses au niveau du bras, soit 2 tubes de sang de 8 ml. Puis nous avons prélevé des biopsies de graisse sous-cutanée abdominale. La technique (66) consiste à utiliser une aiguille de 14G avec une seringue de 50 cc. Cela nécessite une petite anesthésie locale à la Lidocaïne et un champ stérile. Une dépression est maintenue dans la seringue pendant que l'on avance avec l'aiguille dans le tissu. En faisant des prélèvements radialement par rapport au site d'entrée on peut espérer récolter entre 100 mg et 1 g. Cette technique très utilisée à l'avantage d'être rapide (moins de 3 min) et de permettre la récolte d'adipocytes viables tout en ne laissant pas de cicatrice. Le tissu adipeux a été immédiatement congelé dans de l'azote liquide.

4. Techniques d'analyse

Préparation de l'ARN total et quantification de l'ARN messager :

L'ARN total a été préparé à partir d'environ 100-500 mg par échantillon de tissu adipeux abdominal. En utilisant le réactif TRIzol (Invitrogen, Bâle, Suisse), selon les instructions du fabricant. L'ARN total (5 µg) a été reverse-transcrité en utilisant 800 unités de reverse transcriptase Moloney murine virus leukemia (Invitrogen), en présence de 0.3 unité/µl de RNAsin (Promega, Madison, WI, USA), 7.5 µmol/l d'amorces aléatoires (oligo(dN)6), 1.2 mmol/l de dNTP et 12 µmol/l de dithiothreitol.

La détermination de l'ARN messager pour l'IL-1Ra, l'IL-8, MCP-1, l'Acrp30 ainsi que le 28S s'est faite par polymérase chain reaction (PCR) quantitative en temps réel utilisant un LightCycler (Roche Diagnostics, Suisse) avec le DNA Master SYBR Green I ou Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals, Bâle, Suisse) kits selon le gène.

Dans le tableau ci-dessous sont décrites les amorces utilisées pour le PCR quantitative :

Gène	Sens	Anti-sens
IL-1Ra	5'-TCCGCAGTCACCTATCACTC-3'	5'- TTGACACAGGACAGGACAAT-3'
IL-8	5'-CTGCGCCAACACAGAAATTA-3'	5'-ATTGCATCTGGCAACCCTAG-3'
MCP-1	5'-GCCTCCAGCATGAAAGTCTC-3'	5'-ATAACAGCAGGTGACTGGGG-3'
Acrp30	5'-ATGGGGAAGGAGAGCGTAAT-3'	5'-ATTGACTTTGGGGCTGTTTG-3'
28S	5'- TTGAAAATCCGGGGGAGAG-3'	5'-ACATTGTTCCAACATGCCAG-3'

Détermination de l'IL-1Ra et de l'adiponectine dans le sérum

La concentration d'IL-1Ra et d'adiponectine dans le sérum a été déterminée avec les kits « quantikine enzyme-linked immunosorbent assay » (R&D Systems Europe Ltd, UK).

Coupes histologiques :

Tissu adipeux congelé fixé dans du formol, enrobé dans de la paraffine, coupé à 5 µm, coloration à l'hématoxyline-éosine.

en t0 était alors très élevée (17.6). Notons également les résultats d'un patient qui sont très positif en t2 (de 3.00 en t0 à 94.25 en t2).

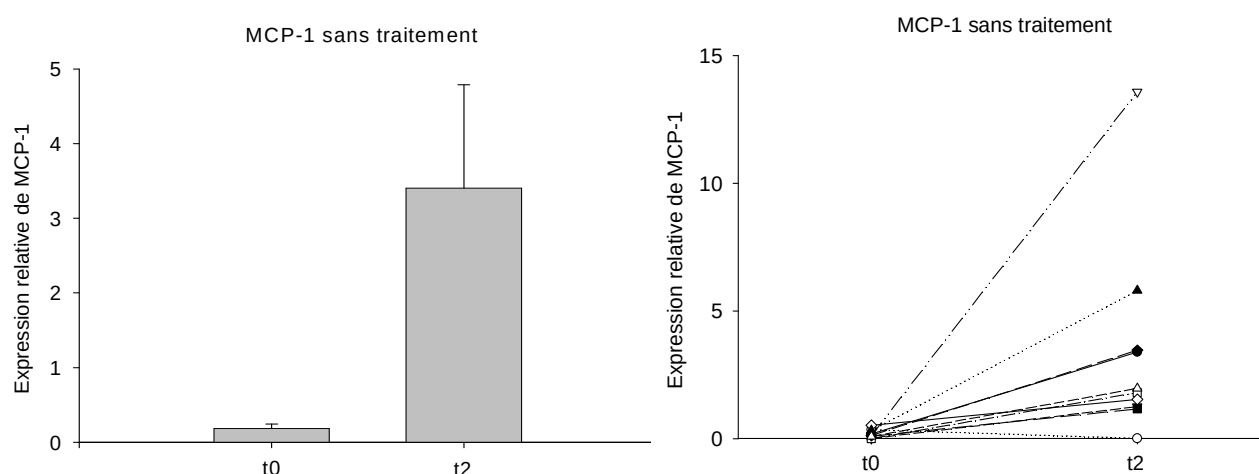


Figure 3b. Expression relative de MCP-1 dans le tissu adipeux humain. Les biopsies du tissu adipeux ont été effectuées par aspiration à l'aiguille sur 9 volontaires le matin entre 8 et 9h (t0) et 6h après la première biopsie (t2). Après préparation de l'ARN total et de la transcription inverse, l'expression des cytokines a été déterminée par PCR quantitative en temps réel et corrigée par celle du ARN ribosomal 28s. Le panneau de droite représente les valeurs individuelles à t0 et t2 et le panneau de gauche la moyenne $\pm$ SEM de l'expression relative cytokine/28s calculée par rapport à t0. $p < 0.05$ pour t2 comparé à t0.

Ensuite nous avons testé le MCP-1 (fig. 3b) dans les mêmes conditions que précédemment. Les résultats montrent de nouveau une nette augmentation significative ($p < 0.05$) de MCP-1 en t2 par rapport à t0 d'un facteur 10. En étudiant les résultats en détail, on remarque que nous avons un résultat montrant une augmentation très importante (de 0.12 à 13.58). Le patient en question était une femme de 25 ans avec un BMI de 25 kg/m² soit une personne homogène à notre groupe de travail. A noter qu'il s'agit de la même personne qui a également présenté une grande réponse à IL-1Ra précédemment.

Pour continuer, nous avons alors testé le dosage de IL-8 à t0 et t2 (fig. 3c) toujours dans les mêmes conditions et selon la même technique. Les résultats montrent une augmentation significative ($p < 0.05$) d'un facteur d'environ 50 en t2 par rapport à t0. En observant en détail, on relève que tous nos résultats sont en augmentation. Il existe cependant une grande variabilité des réponses. Les personnes ayant des résultats extrêmes présentent des caractéristiques semblables au reste du groupe.

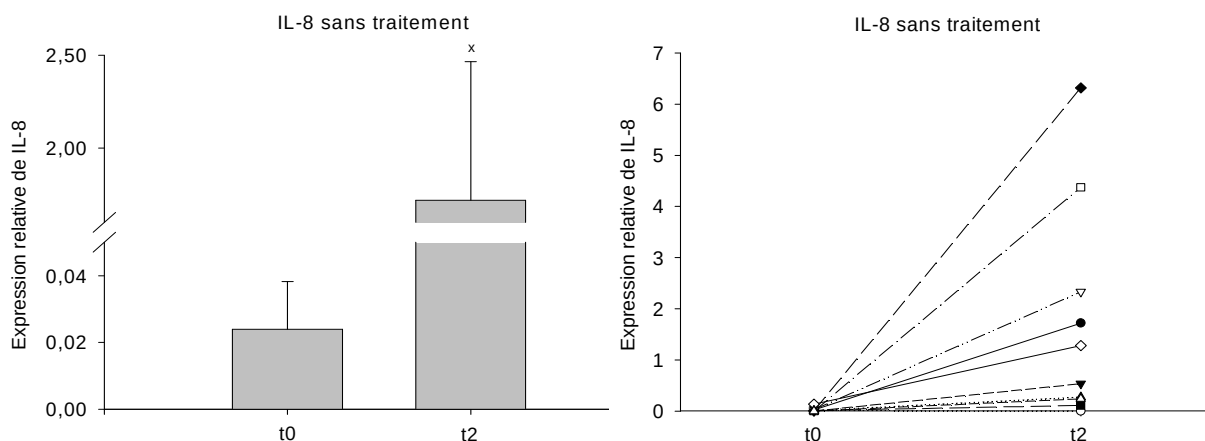


Figure 3c. Expression relative de IL-8 dans le tissu adipeux humain. Les biopsies du tissu adipeux ont été effectuées par aspiration à l'aiguille sur 9 volontaires le matin entre 8 et 9h (t0) et 6h après la première biopsie (t2). Après préparation de l'ARN total et de la transcription inverse, l'expression des cytokines a été déterminée par PCR quantitative en temps réel et corrigée par celle du ARN ribosomal 28s. Le panneau de droite représente les valeurs individuelles à t0 et t2 et le panneau de gauche la moyenne $\pm$ SEM de l'expression relative cytokine/28s calculée par rapport à t0. $p < 0.05$ pour t2 comparé à t0.

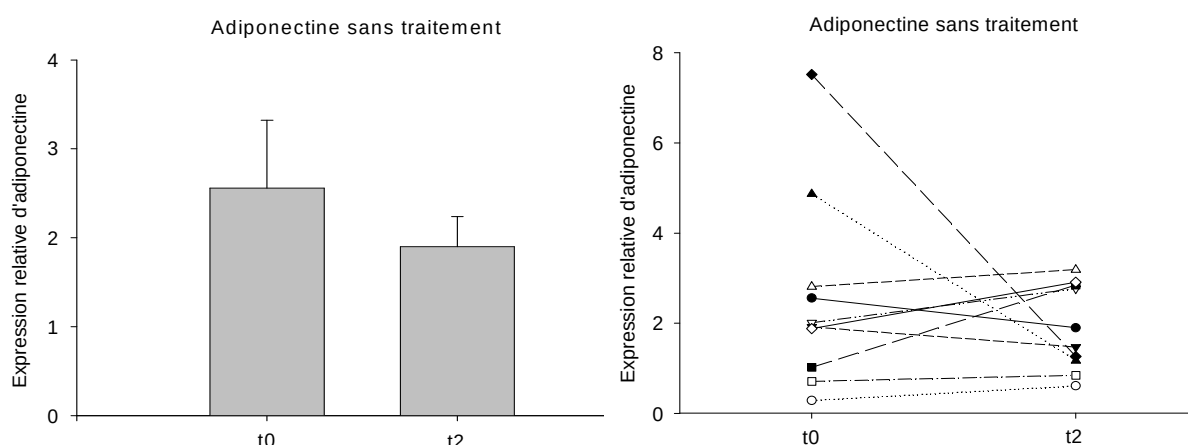


Figure 3d. Expression relative de l'adiponectine dans le tissu adipeux humain. Les biopsies du tissu adipeux ont été effectuées par aspiration à l'aiguille sur 9 volontaires le matin entre 8 et 9h (t0) et 6h après la première biopsie (t2). Après préparation de l'ARN total et de la transcription inverse, l'expression des cytokines a été déterminée par PCR quantitative en temps réel et corrigée par celle du ARN ribosomal 28s. Le panneau de droite représente les valeurs individuelles à t0 et t2 et le panneau de gauche la moyenne $\pm$ SEM de l'expression relative cytokine/28s calculées par rapport à t0. $p < 0.05$ pour t2 comparé à t0.

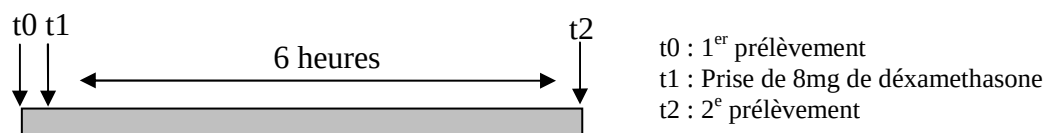
Enfin pour terminer, nous avons dosé dans les mêmes conditions que précédemment, l'expression relative d'adiponectine à t0 et t2 (fig. 3d). Les résultats montrent globalement des taux quasi identiques entre t0 et t2, bien qu'une légère tendance à la baisse puisse être mise en évidence mais avec un $p < 0.23$. Si on prend le graphique détaillé, on observe que les résultats sont effectivement plutôt à la stagnation bien que 2 dosages montrent une diminution claire

entre t0 et t2. Dans ces cas, il s'agit plutôt des taux en t0 qui sont très élevés (4.86 et 7.52). Les valeurs en t2 sont, par contre, homogènes au reste du groupe.

2. Effet d'une agression mécanique minime sur l'expression des cytokines/chemokines avec prise de dexaméthasone.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence de la dexaméthasone sur l'expression des cytokines IL-1Ra, MCP-1, IL-8 et adiponectine. Pour rappel la dexaméthasone est une substance anti-inflammatoire qui agit sur le couple GCRII/GC ainsi formé au niveau du cytoplasme, traverse la membrane nucléaire et va se fixer au niveau d'un site spécifique présent sur l'ADN, résultant en une synthèse de protéines anti-inflammatoires tels que notamment : anti-protéase, lipocortine 1 et 2, endopeptidase. On relève également l'inhibition de la synthèse de protéines pro inflammatoires tels que IL-6 et IL-8, une diminution de la synthèse des phospholipases A2, de la cyclooxygénase 2, avec pour conséquence une diminution de la synthèse de nombreux médiateurs, dont le PAF Acéter, les prostaglandines et les leucotriènes.

Pour cela nous avons procédé de la même manière que précédemment mis à part que nous avons administré 8 mg de dexaméthasone à nos patients juste après le premier prélèvement. Nous avons rajouté un temps t1 qui correspond à la prise du médicament.



Nous avons commencé par doser l'IL-1Ra à 6h d'intervalle en ponctionnant toujours au même endroit (fig. 4a). Les résultats sont obtenus par PCR quantitatives en temps réels et corrigés par ceux de l'ARN ribosomal 28s. Nous observons une augmentation de l'IL-1Ra en t2 par rapport à t0. Cette augmentation est d'un facteur 5 pour $p < 0.09$. Rappelons que sous dexaméthasone l'IL-1Ra augmentait également d'un facteur 5 en t2.

Nous avons ensuite testé le MCP-1 avec administration de dexaméthasone et les résultats sont obtenus dans les mêmes conditions qu'auparavant. Nous remarquons une augmentation de MCP-1 en t2 de l'ordre d'un facteur 4 par rapport à t0 avec un $p < 0.05$. Pour rappel, sans dexaméthasone, le MCP-1 était augmenté d'un facteur 10 ($p < 0.05$). Nous avons donc une différence significative qui soulignerait le rôle anti-inflammatoire de la dexaméthasone dans notre étude.

Nous avons continué avec l'IL-8, toujours en administrant la dexaméthasone et toujours selon la technique précédente. Nous observons une augmentation significative ($p < 0.05$) d'un facteur 8 de l'IL-8 en t2 par rapport en t0. Sans traitement, l'IL-8 augmentait d'un facteur 50 ($p < 0.05$). De nouveau, nous avons un résultat en faveur du rôle anti-inflammatoire de la dexaméthasone sur cette cytokine. Nous avons terminé avec le dosage de l'adiponectine selon la même technique. Dans ce cas nous avons pu remarquer une stabilité des taux ($p < 0.25$).

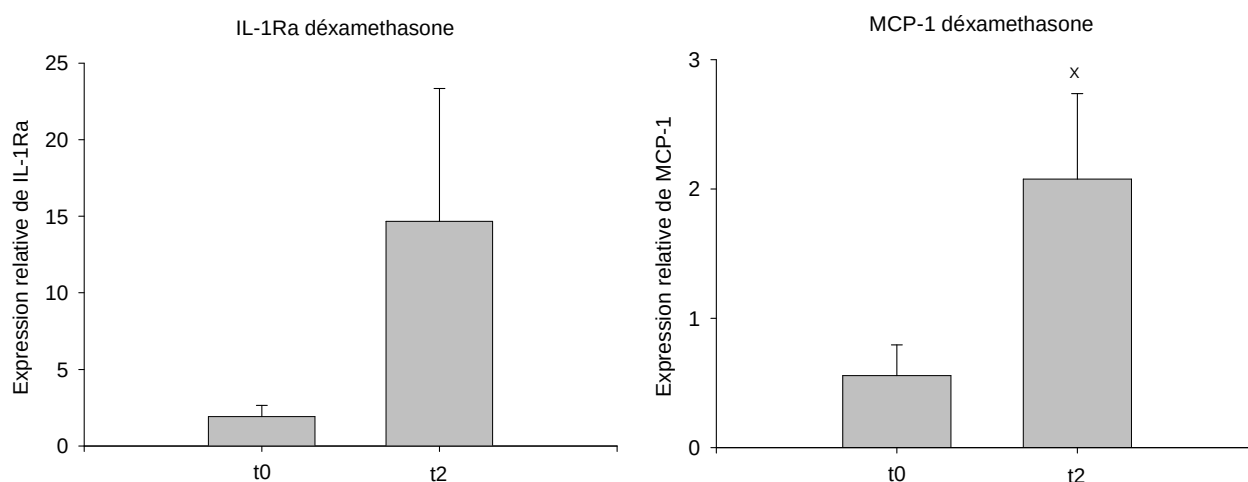


Figure 4a et 4b. Expression relative des cytokines IL-1Ra et MCP-1 dans le tissu adipeux humain après traitement à la dexaméthasone. Les biopsies du tissu adipeux ont été effectuées par aspiration à l'aiguille sur 9 patients le matin entre 8 et 9h (t0) et 6h après la première biopsie (t2) et la prise orale de dexaméthasone 8 mg (t1). L'expression des cytokines a été déterminée par PCR quantitative en temps réel (voir Fig. 3). Les panneaux représentent la moyenne $\pm$ SEM de l'expression relative cytokine/28s calculée par rapport à t0. $p < 0.09$ pour IL-1Ra et $p < 0.05$ pour MCP-1 pour t2 comparé à t0.

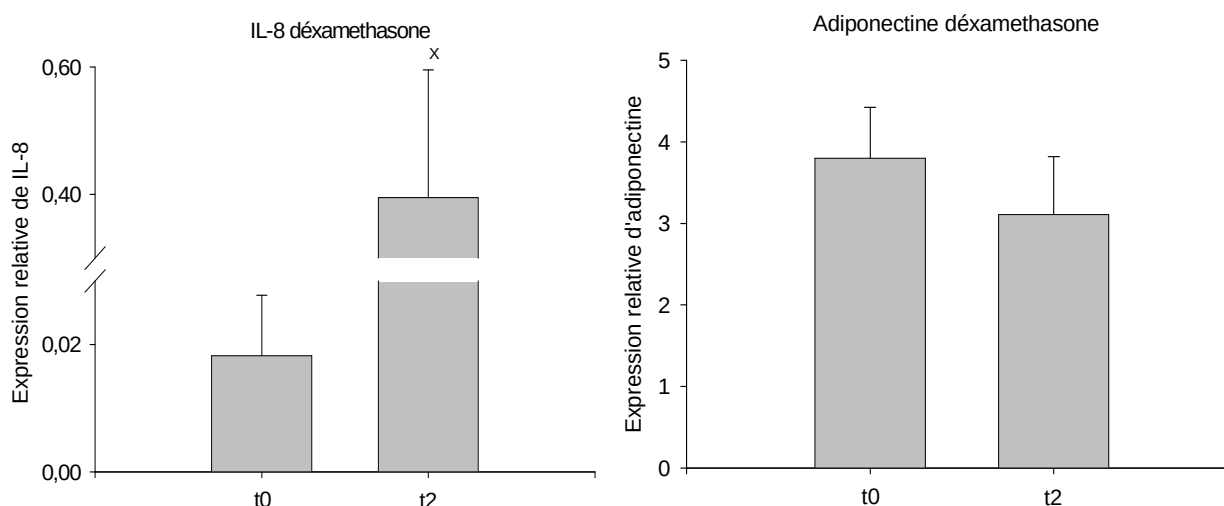


Figure 4c et 4d. Expression relative de l'IL-8 et de l'adiponectine dans le tissu adipeux humain après traitement à la dexaméthasone. Les biopsies du tissu adipeux ont été effectuées par aspiration à l'aiguille sur 9 patients le matin entre 8 et 9h (t0) et 6h après la première biopsie (t2) et la prise orale de dexaméthasone 8 mg (t1). L'expression des cytokines a été

déterminée par PCR quantitative en temps réel (voir Fig. 3). Les panneaux représentent la moyenne $\pm$ SEM de l'expression relative cytokine/28s calculée par rapport à t0. $p < 0.05$ pour IL-8 et $p < 0.25$ pour l'adiponectine pour t2 comparé à t0.

Nous avons terminé avec un dosage de l'adiponectine selon la même technique. Dans ce cas nous avons pu remarquer une stabilité des résultats entre t0 et t2 ($p < 0.25$), comme nous l'avions déjà constaté dans le groupe sans traitement.

3. Effet d'une agression mécanique minime sur l'expression des cytokines/chemokines avec prise de diclofenac.

Finalement nous avons voulu voir l'effet du diclofenac (Voltaren) sur le taux de nos cytokines (IL-1Ra, MCP-1, IL-8 et adiponectine). Le diclofenac, comme les autres anti-inflammatoires non stéroïdiens, agit en inhibant la cyclooxygenase bloquant ainsi la production de prostaglandines et de thromboxane. Dans ce groupe de 8 patients nous avons procédé de manière identique aux groupes précédents si ce n'est que nous avons remplacé la dexaméthasone par du diclofenac 50 mg juste après le premier prélèvement.

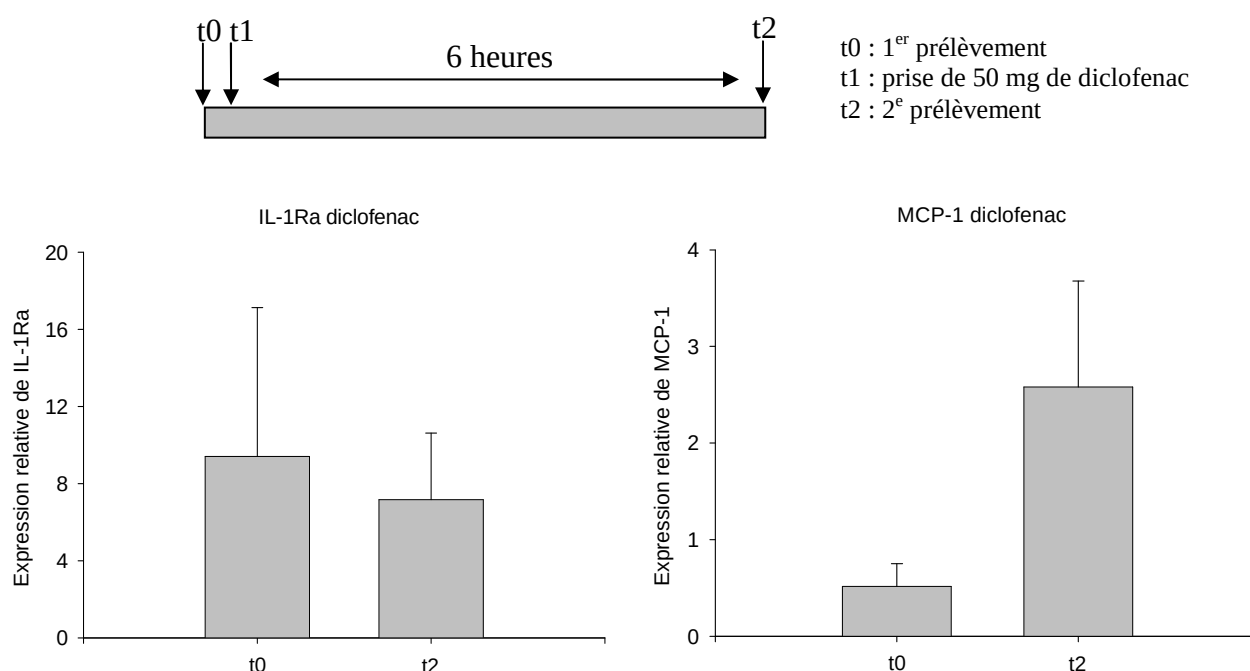


Figure 5a et 5b. Expression relative des cytokines IL-1Ra et MCP-1 dans le tissu adipeux humain après administration de 50 mg de diclofenac. Les biopsies du tissu adipeux ont été effectuées par aspiration à l'aiguille sur 8 patients le matin entre 8 et 9h (t0) et 6h après la première biopsie (t2) et la prise orale de 50 mg de diclofenac (Voltaren) en t1. L'expression des cytokines a été déterminée par PCR quantitative en temps réel (voir Fig. 3). Les panneaux représentent la moyenne $\pm$ SEM de l'expression relative cytokine/28s calculée par rapport à t0. $p < 0.33$ pour IL-1Ra et $p < 0.06$ pour MCP-1 pour t2 comparé à t0.

Nous avons commencé par doser l'IL-1Ra à 6h d'intervalle en ponctionnant au même endroit (fig. 5a). Nous observons une stabilisation voire une diminution de l'expression de IL-1Ra en t2 par rapport à t0 ($p < 0.33$). Pour rappel, dans le deuxième groupe (ayant reçu de la dexaméthasone), l'IL-1Ra augmentait d'un facteur 5 en t2 par rapport à t0 ($p < 0.05$). Ces résultats suggèrent un effet anti-inflammatoire beaucoup plus important du diclofenac 50 mg que de la dexaméthasone 8 mg.

Nous avons ensuite dosé l'expression de MCP-1 avec administration de diclofenac en t1 (fig. 5b). Les résultats montrent une augmentation d'un facteur 5 ($p < 0.06$) du taux de MCP-1 en t2 par rapport à t0. Dans le groupe sans traitement, l'expression de MCP-1 augmentait d'un facteur 10 par rapport à t0. Dans ce cas les résultats sont superposables à ceux obtenus avec l'administration de la dexaméthasone et montrent un effet anti-inflammatoire quasi identique.

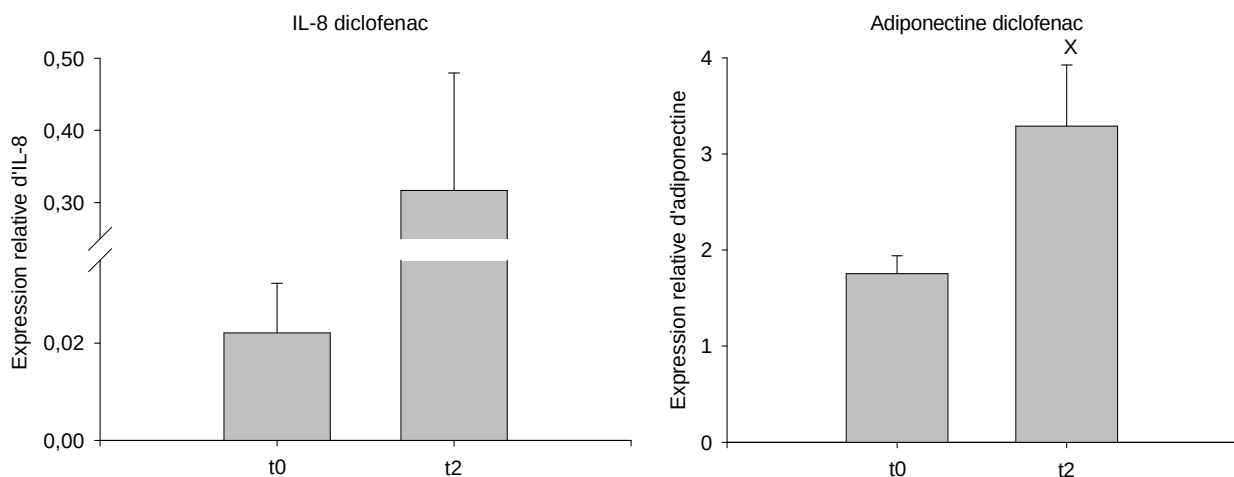


Figure 5c et 5d. Expression relative des cytokines IL-8 et adiponectine dans le tissu adipeux humain après administration de 50 mg de diclofenac. Les biopsies du tissu adipeux ont été effectuées par aspiration à l'aiguille sur 8 patients le matin entre 8 et 9h (t0) et 6h après la première biopsie (t2) et la prise orale de 50 mg de diclofenac (Voltaren) en t1. L'expression des cytokines a été déterminée par PCR quantitative en temps réel (voir Fig. 3). Les panneaux représentent la moyenne $\pm$ SEM de l'expression relative cytokine/28s calculée par rapport à t0. $p < 0.06$ pour l'IL-8 et $p < 0.05$ pour l'adiponectine pour t2 comparé à t0.

Nous avons continué en dosant l'expression d'IL-8, toujours dans les mêmes conditions (fig. 5c). Les résultats montrent une augmentation significative ($p < 0.06$) d'un facteur 15 en t2 par rapport à t0. Dans le groupe sans traitement, nous avons une augmentation d'un facteur 20. De nouveau nous observons une prédominance de l'effet anti-inflammatoire du diclofenac sur celui de la dexaméthasone aux doses reçues.

Pour terminer, nous avons dosé l'adiponectine avec administration de 8 mg de diclofenac en t1. Nous avons pu constater ici une augmentation de l'expression en t2 par rapport en t0 d'un

facteur 1,88 ($p < 0.05$). Comparée aux deux autres groupes, cette cytokine était restée plutôt stable entre t2 et t0. Dans ce cas on observe une augmentation de l'adiponectine, ce qui renforce le fait que le diclofenac aurait un rôle anti-inflammatoire plus important que la dexaméthasone aux doses données.

Voici un tableau récapitulatif qui nous permet de résumer les différents résultats en fonction de la cytokine et de la substance administrée.

	Rien	dexaméthasone 8 mg	diclofenac 50 mg
IL-1Ra	x 5	x 5	Stable
MCP-1	x 10	x 4	x 5
IL-8	x 50	x 20	x 15
Adiponectine	Stable	Stable	x 1.88

Tableau 1. Tableau montrant les variations de l'expression de cytokines dans le TAB entre t0 et t2, 6 heures plus tard, selon le médicament reçu.

On remarquera l'effet anti-inflammatoire qui est variable en fonction de la cytokine et de la substance. En effet on constatera que l'IL-1Ra et l'adiponectine ne semblent pas être influencés par la dexaméthasone, par contre l'expression de MCP-1 et de l'IL-8 sont nettement diminués. De plus il semble que le diclofenac soit un anti-inflammatoire plus puissant que la dexaméthasone en ce qui concerne l'IL-1Ra et l'adiponectine. En ce qui concerne l'IL-8, le diclofenac est un peu plus puissant que la dexaméthasone. Pour le MCP-1 le rôle anti-inflammatoire est identique avec les deux substances.

Nous avons effectué un test control chez 3 patients (fig. 6) en effectuant un prélèvement abdominal de tissu adipeux à 2 endroits différents (espacés d'au moins 20 cm) à 6h d'intervalle, à jeun, en t0 (1^{ère} prise) et en t2 (2^e prise). On remarque que l'expression relative d'IL-1Ra/28s dans le tissu adipeux est stable entre t0 et t2, 6h plus tard à des endroits différents pour les 3 patients. Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une réaction inflammatoire localisée.

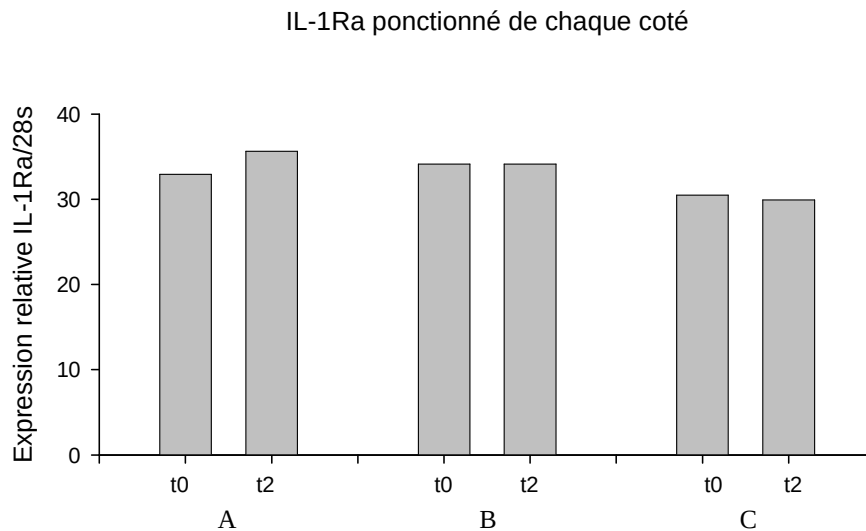


Figure 6. Expression relative d'IL-1Ra dans le tissu adipeux humain sans prise de traitement. Les biopsies du tissu adipeux ont été effectuées par aspiration sur 3 patients (A, B et C) le matin entre 8h et 9h (t0) et 6h après (t2). Les ponctions ont été réalisées en 2 endroits distincts au niveau abdominal espacés d'au moins 20 cm. L'expression des cytokines a été déterminée par PCR quantitative en temps réel (voir Fig. 3). Les panneaux représentent la moyenne de l'expression relative cytokines/28s calculée par rapport à t0.

Cette série d'expérience permet de mettre en évidence une réponse inflammatoire du tissu adipeux suite à une agression localisée minime en montrant une augmentation des cytokines/chemokines pro-inflammatoires tels que l'IL1-Ra, MCP-1 et l'IL-8.

D'autre part, cette réponse peut être modulée par la prise de certaines substances anti-inflammatoires telles que de la dexaméthasone ou le diclofenac. La variation de cette réponse inflammatoire est significativement plus importante avec le diclofenac 50 mg, qu'avec la dexaméthasone 8 mg.

A noter que les dosages sanguins des cytokines effectuées n'ont pas été influencées par les ponctions de tissu adipeux.

4. Histologie

Par la suite, et au vu de ces résultats nous voulions savoir si l'augmentation de ces cytokines dans le tissu adipeux, suite à une agression minime localisée était dû à la sécrétion de cellules inflammatoires nouvellement arrivées sur le site de ponction ou bien s'il s'agissait d'une sécrétion par les adipocytes eux mêmes. Pour cela nous avons procédé à une étude histologique du tissu adipeux que nous avons prélevé pour nos dosages (fig. 7).

Après coloration simple à l'hématoxyline-éosine, nous avons effectué un comptage manuel des cellules inflammatoires dont les lymphocytes et les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN). Nous avons observé deux coupes par prélèvement et effectué un comptage dans 3 champs par coupe. Soit un comptage pondéré sur 6 champs par prélèvement (fig. 7).

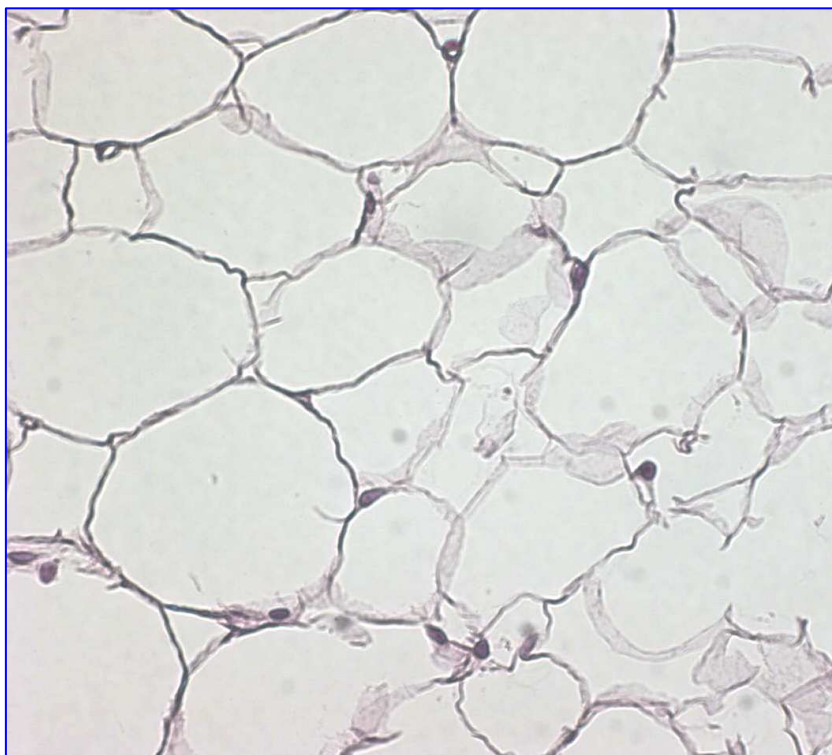


Figure 7. On voit ici un échantillon de prélèvement de tissu adipeux abdominal humain. On distingue les adipocytes avec leur paroi fine, leurs noyaux aplatis en périphérie et un grand cytoplasme peu coloré. On note ici la présence de quelques lymphocytes.

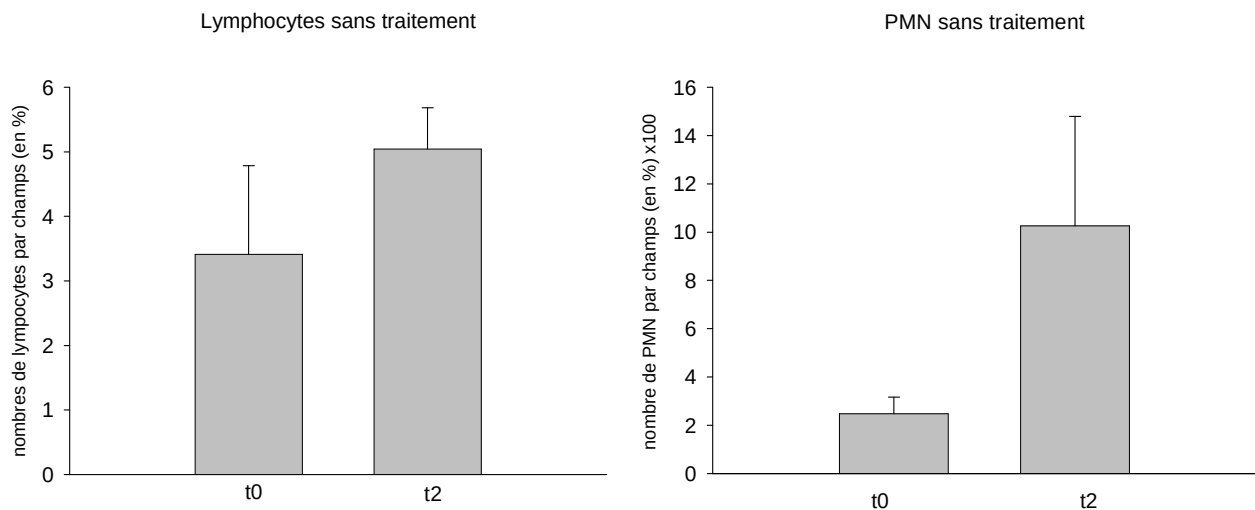


Figure 8a et b : Comptage du nombre relatif de lymphocytes et de PMN, entre t0 et t2 moyenné sur 6 champs par prélèvement. Il s'agit de prélèvements issus du groupe sans traitement. Les panneaux représentent la moyenne $\pm$ SEM du nombre de lymphocytes et de PMN, par rapport au nombre d'adipocytes en t2 calculées par rapport à t0. $p < 0.05$ pour t2 comparé à t0.

Dans le cas sans traitement, on observe une nette augmentation du nombre de lymphocytes par rapport au nombre d'adipocytes par champs, d'un facteur environs 1.5, entre t0 et t2 (fig. 8a). Le résultat est significatif par ailleurs ($p < 0.05$).

Concernant les PMN, nous observons également une augmentation fortement significative par rapport au nombre d'adipocytes par champs d'un facteur d'environs 4.8, entre t0 et t2 (fig. 8b). Le résultat est hautement significatif ($p < 0.05$).

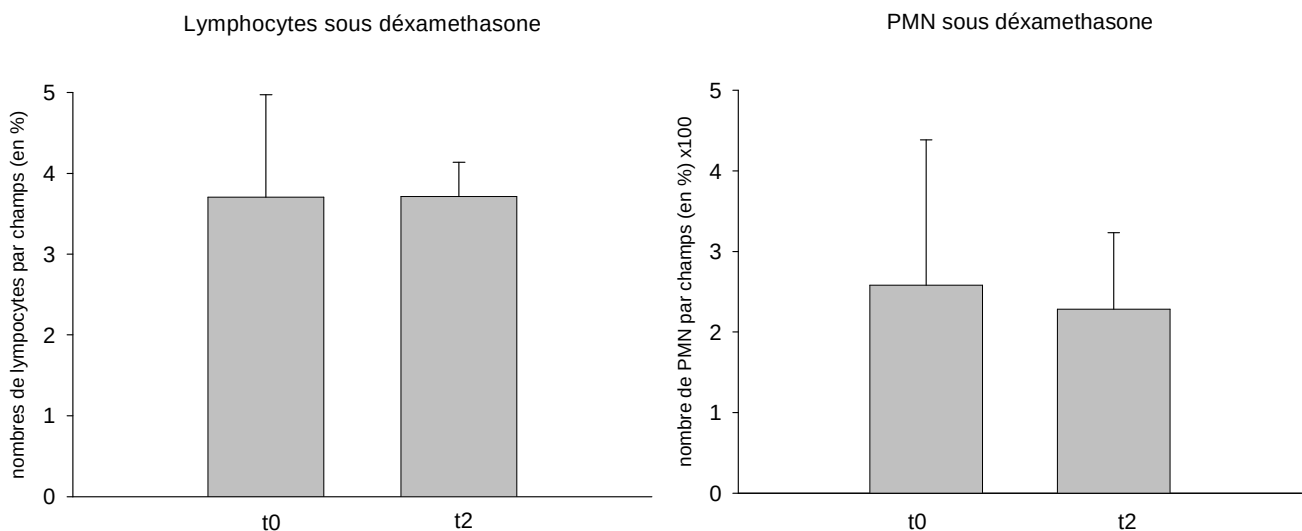


Figure 8c et d : Comptage du nombre relatif de lymphocytes et de PMN, entre t0 et t2, moyenné sur 6 champs par prélèvement. Il s'agit de prélèvements issus du groupe ayant reçu 8 mg de dexaméthasone. Les panneaux représentent la moyenne $\pm$ SEM du nombre de lymphocytes et de PMN, par rapport au nombre d'adipocytes en t2 calculées par rapport à t0. $p < 0.05$ pour t2 comparé à t0.

Sous dexaméthasone, la réponse lymphocytaire est stable entre t0 et t2 (fig. 8c). Par rapport au groupe sans traitement, on note que le taux de lymphocytes en t2 n'est pas augmenté. De même le nombre de PMN sous dexaméthasone est plutôt stable entre t0 et t2 ($p < 0.05$) (fig. 8d).

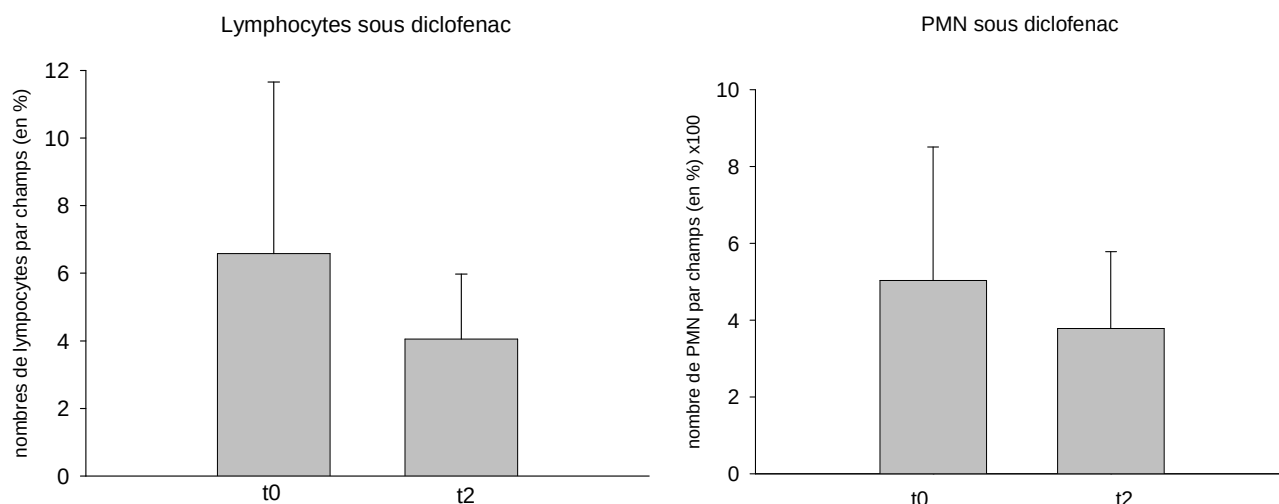


Figure 8e et f : Comptage du nombre relatif de lymphocytes et de PMN, entre t0 et t2, moyenné sur 6 champs par prélèvement. Il s'agit de prélèvements issus du groupe ayant reçu 50 mg de diclofenac. Les panneaux représentent la moyenne $\pm$ SEM du nombre de lymphocytes et de PMN, par rapport au nombre d'adipocytes en t2 calculées par rapport à t0. $p < 0.05$ pour t2 comparé à t0.

Sous 50 mg de diclofenac, la réponse lymphocytaire est diminuée d'un facteur environ 0.6 en t2 par rapport à t0, ce qui laisse suggérer le rôle anti-inflammatoire de cette substance à ce niveau (fig. 8e). Concernant les PMN, on note plutôt une légère diminution entre t0 et t2, mais la différence n'est pas significative (fig. 8f).

Nous n'avons pas effectué de comptage d'autres cellules inflammatoires telles que les monocytes car leur présence était trop marginale pour entrer dans des statistiques.

Grâce à cette étude histologique, nous avons put constater que la réponse inflammatoire cellulaire est présente d'une part, mais qu'elle peut être modulée, de manière négative, par la dexaméthasone et le diclofenac. Cependant, l'augmentation de la cellularité est beaucoup moins importante (1.5 à 4.8 x environ) comparé à ceux des cytokines (5 à 50 x), suggérant fortement que les adipocytes contribuent activement à la modulation des cytokines après une lésion mécanique minime.

4. Conclusions

Comme nous l'avons évoqué plus haut, nous avons remarqué qu'une agression minimale réalisée à l'aide d'une aiguille par la ponction même d'un fragment de tissu adipeux, a montré une réaction inflammatoire au sein du tissu adipeux.

Cette réaction est marquée par une augmentation des cytokines pro inflammatoires tels que IL-1Ra, MCP-1, IL-8, 6 heures après le stimulus. L'évolution du taux d'adiponectine n'est pas significative.

D'autre part, nous avons pu montrer l'effet significatif de substances anti-inflammatoires sur la sécrétion de certaines cytokines/chémokines (IL-1Ra, MCP-1, IL-8, adiponectine). On relèvera que le diclofenac 50 mg a une action plus importante que la dexaméthasone 8 mg sur la sécrétion de ces cytokines en freinant l'augmentation de leur production (IL-1Ra, MCP-1, IL-8), ou en augmentant la production d'adiponectine.

Des ponctions de tissu adipeux effectuées à deux endroits différents renforce l'hypothèse que l'agression minimale et à l'origine d'une réaction locale.

Les observations histologiques réalisées nous ont permis de constater la présence augmentée de lymphocytes et de PMN suite à une agression localisée minimale. Cette réponse est également modulée par les substances anti-inflammatoires que nous avons administrées avec un effet prédominant pour le diclofenac 50 mg.

Nous avons pu prouver que l'agression minimale localisée était l'origine d'une augmentation de cytokines pro-inflammatoires (IL-1Ra, MCP-1, IL-8) et ceci explique probablement l'augmentation des lymphocytes et des PMN sur le site de ponction.

Nous pouvons maintenant nous poser la question suivante : les cytokines/chemokines pro inflammatoires sont-elles secrétées par les adipocytes et attirent-elles ainsi des cellules inflammatoires ou bien est-ce que l'agression a-t-elle attirée elle-même les cellules inflammatoires par un processus mécanique, et ont ainsi secrétées ces cytokines ?

Hypothèse :

1. Adipocytes → Cytokines → Lymphocytes/PMN → Inflammation ?
ou
2. Adipocytes → Lymphocytes/PMN → Cytokines → Inflammation ?

Un argument indirect en faveur de notre première hypothèse est la cellularité qui est beaucoup moins importante (1.5 à 4.8 x environ) comparé à ceux des cytokines (5 à 50 x), laissant

suggérant fortement que les adipocytes contribuent activement à la modulation des cytokines après une lésion mécanique minime.

Pour cela il serait intéressant d'effectuer un immuno-marquage des adipocytes permettant ainsi de montrer directement la réaction de l'adipocyte. Il serait alors possible de démontrer le rôle pro-inflammatoire des adipocytes suite à une agression physique du tissu adipeux.

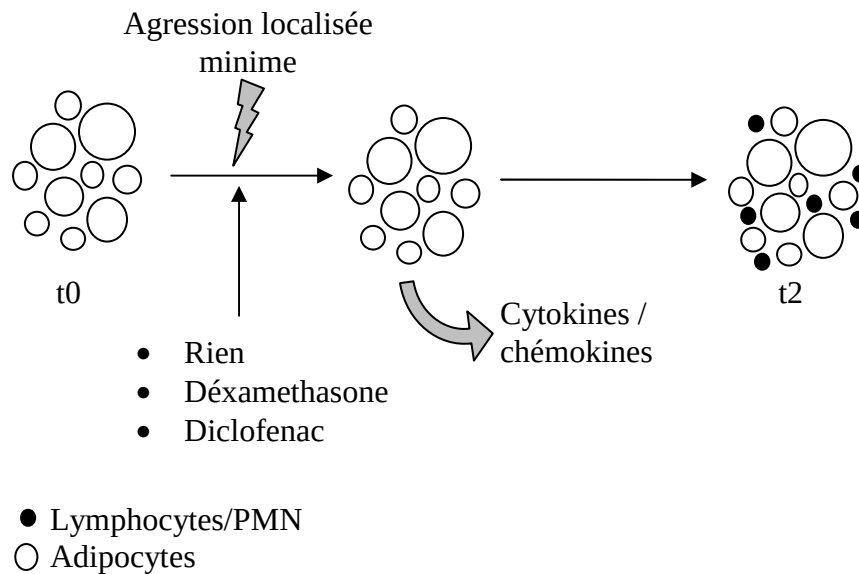


Figure 8. Sécrétion de cytokines/chémokines suite à une agression localisée minime attirant des cellules inflammatoires de type lymphocyte et PMN. Cette réponse serait modulée par la prise de substances anti-inflammatoires.

5. Remerciements

Je tiens à remercier le Prof C. A. Meier mon directeur de thèse, qui m'a soutenu tout le long de ce travail. Je tiens également à remercier sa collaboratrice Cristiana Juge ainsi que toute son équipe, qui m'ont beaucoup aidé à la préparation et les analyses sur le tissu adipeux, le Prof Alain Golay ainsi que le Dr Vincent Makoundou pour leurs soutiens technique et financier, le Prof Jean Michel Dayer et le Dr Roux Lombard pour les analyses des échantillons de sang, le Dr V. Giusti au CHUV pour son aide à la mise au point de la technique.

6. Références

1. Rexford S.Ahima and Jeffery S.Flier. Adipose tissue as an endocrine organ. TEM 2000 Vol.11 No.8.327-332
2. Kathryn E.Wellen and Gökhan S.Hotamisligil. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. JCI 2003 112:1785-1788
3. Hansson GK Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N Engl J Med 2005 352:1685-1695
4. Oppenheim JJ Feldmann M Introduction to the role of cytokines in innate host defense and adaptative immunity. In Oppenheim JJ, Feldmann M (eds), Cytokine Reference 2001 Oxford, Academic Press pp3-20
5. Delikat S, Harris RJ, Galvani DW IL-1 β inhibits adipocyte formation in human long-term bone marrow culture. Exp Hematol 1993 21:31-37
6. Zerchner R., Newman T.C., Sherry B., Cerami A, Breslow JL Recombinant human cachectin/tumor necrosis factor but not interleukin-1 β downregulates lipoprotein lipase gene expression at the transcriptional level in mouse 3T3-L1 adipocytes. Mol Cell Biol 1988 8:2394-2401
7. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. Science 1993 259:87-91
8. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. J Clin Invest 1995 95:2409-2415

9. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001 280:E745-E751
10. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 82:4196-4200
11. Moller DE Potential role of TNF- α in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2000 11:212-217
12. Schreyer SA, Chua SC, Jr., LeBoeuf RC Obesity and diabetes in TNF- α receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 1998 102:402-411
13. Fernandez-Real JM Ricart W Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 2003 24:278-301
14. Crichton MB, Nichols JE, Zhao Y, Bulun SE, Simpson ER Expression of transcripts of interleukin-6 and related cytokines by human breast tumors, breast cancer cells, and adipose stromal cells. *Mol Cell Endocrinol* 1996 118:215-220
15. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem* 2003 278:13740-13746
16. Rotter V, Nagaev I, Smith U Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor α overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 2003 278:45777-45784
17. Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C, Jansson JO Interleukin-6-deficient mice develop mature onset obesity. *Nature Med* 2002 8:75-79
18. Aggarwal BB, Samanta A, & Feldmann M. TNF- α . In Oppenheim JJ & Feldmann M (eds) *Cytokine Reference*. Pp 413-434. New york, London, 2000
19. Greenberg AS, Nordan RP, McIntosh J, Calvo JC, Scow RO, Jablons D Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer Res* 1992 52:4113-4116
20. Rahmouni K, Haynes WG, Morgan DA, Mark AL Selective resistance to central neural administration of leptin in agouti obese mice. *Hypertension* 2002 39:486-490
21. Torti FM, Dieckermann B, Beutler et al. A macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: an in vivo model of cachexia. *Science* 1985; 229: 867-869.

22. Ventre J, Doebber T, Wu M et al. Targeted disruption of the tumor necrosis factor α gene- Metabolic consequences in obese and nonobese mice. *Diabetes* 1997; 46:1526-1531.
23. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW et al. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 1997; 389: 610-614.
24. Matsuda T & Hirano T. IL-6. in Oppenheim JJ & Feldmann M (eds) *Cytokine Reference*. Pp 537-563. New York, London, 2000.
25. Crichton MB, Nichols JE, Zaho Y et al. Expression of transcripts of interleukin-6 and related cytokines by human breast tumors, breast cancer cells, and adipose stromal cells. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 118: 215-220.
26. Lizasa Hisashi Matsushima K IL-8. In Oppenheim JJ, Feldmann M (eds), *Cytokine Reference* 2001 Oxford, Academic Press pp1061-1067
27. Lip GY Blann AD Thrombogenesis, atherogenesis and angiogenesis in vascular disease: a new 'vascular triad'. *Ann Med* 2004 36:119-125
28. Bian XW, Chen JH, Jiang XF, Bai JS, Wang QL, Zhang X Angiogenesis as an immunopharmacologic target in inflammation and cancer. *Int Immunopharmacol* 2004 4:1537-1547
29. Bruun JM, Pedersen SB, Richelsen B Regulation of interleukin 8 production and gene expression in human adipose tissue in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 86:1267-1273
30. Metzger S, Nusair S, Planer D, Barash V, Pappo O, Shilyansky J, Chajek-Shaul T Inhibition of hepatic gluconeogenesis and enhanced glucose uptake contribute to the development of hypoglycemia in mice bearing interleukin- 1β secreting tumor. *Endocrinology* 145:5150-5156
31. Strackowski M, Dzienis-Strackowska S, Stepien A, Kowalska I, Szelachowska M, Kinalska I Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor- α system. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 87:4602-4606
32. Ross R. Atherosclerosis – An inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
33. Christiansen T, Richelsen B, Bruun JM Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. *Int J Obes* 2004 29:146-150

34. Takahashi K, Mizuarai S, Araki H, Mashiko S, Ishihara A, Kanatani A, Itadani H, Kotani H Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem* 2003 278:46654-46660
35. Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, Mannion JD, Diehl JT, Arafat H, Sarov-Blat L, O'Brien S, Keiper EA, Johnson AG, Martin J, Goldstein BJ, Shi Y Human epicardial adipose tissue Is a source of inflammatory mediators. *Circulation* 2003 108:2460-2466
36. Dinarello CA Interleukin-1. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 1997 8:253-265
37. Sartipy P Loskutoff DJ Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 100:7265-7270
38. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T et al. Asiponectin: More than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 2003; 26: 2442-2450.
39. Fain JN, Madan AK, Hiler ML et al. Comparaison of release of adipokines by adipose tissue, adipose tissu matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humains. *Endocrinology* 2004; 145: 2273-2282.
40. Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T et al. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor- α expression. *Diabetes* 2003; 52: 1779-1785
41. Yamauchi T, Kamon J, Waki H et al. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem* 2003; 278:2461-2468.
42. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003; 423: 762-769.
43. Wu X, Motoshima H, Mahadev K et al. Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes* 2003; 52: 1355-1363.
44. Kumada M, Kihara S, Ouchi N et al. Adiponectin specifically increased tissu inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in humain macrophages. *Circulation* 2004; 109: 2046-2049.
45. Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S et al. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 85-89.
46. Garaulet M, Viguerie N, Porubsky et al. Adiponectin gene expression and plasma values in obese woman during very-low-calorie diet. Relationship with cardiovascular risk factors and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 756-760.

47. Burger D, Dayer JM IL-1Ra. In Oppenheim JJ, Feldmann M (eds), Cytokine Reference 2001 Oxford, Academic Press pp319-336
48. Breder CD, Dinarello CA, Saper CB Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus. Science 1988 240:321-324
49. Ericsson A., Liu C., Hart R.P., Sawchenko PE Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. J Comp Neurol 1995 361:681-698
50. Luheshi G, Gardner J, Rushforth D, Loudon A, Rothwell N Leptin actions on food intake and body temperature are mediated by IL-1. Proc Natl Acad Sci USA 1999 96:7047-7052
51. Hosoi T, Okuma Y, Nomura Y Leptin regulates interleukin-1 β expression in the brain via the STAT3-independent mechanisms. Brain Res 2002 949:139-146
52. Fried SK, Appel B, Zechner R Interleukin 1 β decreases the synthesis and activity of lipoprotein lipase in human adipose tissue. Horm Metab Res 1993 25:129-130
53. Feingold KR, Doerrler W, Dinarello CA, Fiers W, Grunfeld C Stimulation lipolysis in cultured fat cells by tumor necrosis factor, interleukin-1, and the interferons is blocked by inhibition of prostaglandin synthesis. Endocrinology 1992 130:10-16
54. Suzawa M, Takada I, Yanagisawa J, Ohtake F, Ogawa S, Yamauchi T, Kadowaki T, Shibuya H, Gotoh Y, Matsumoto K, Kato S Cytokines suppress adipogenesis and PPAR- γ function through the TAK1/TAB1/NIK cascade. Nature Cell Biol 2003 5:224-230
55. Del Rey A Besedovsky H Antidiabetic Effects of Interleukin 1. Proc Natl Acad Sci USA 1989 86:5943-5947
56. Del Rey A, Monge-Arditi G, Klusman I, Besedovsky HO Metabolic and endocrine effects of interleukin-1 in obese, diabetic Zucker fa/fa rats. Exp Clin Endocrinol Diabetes 1996 104:317-326
57. Del Rey A, Monge-Arditi G, Besedovsky HO Central and peripheral mechanisms contribute to the hypoglycemia induced by interleukin-1. Ann NY Acad Sci 1998 840:153-161
58. Garcia-Welsh A, Schneiderman JS, Baly DL Interleukin-1 stimulates glucose transport in rat adipose cells. Evidence for receptor discrimination between IL-1 beta and IL-1 alpha. FEBS Lett 269:421-424

59. Gabay C, Dreyer MG, Pellegrinelli N, Chicheportiche R, Meier CA Leptin directly induces the secretion of interleukin 1 receptor antagonist in human monocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 86:783-791
60. Meier CA, Bobbioni E, Gabay C, Assimacopoulos-Jeannet F, Golay A, Dayer JM IL-1 receptor antagonist serum levels are increased in human obesity: a possible link to the resistance to leptin? *J Clin Endocrinol Metab* 2002 87:1184-1188
61. Juge-Aubry CE, Somm E, Giusti V, Pernin A, Chicheportiche R, Verdumo C, Rohner-Jeanrenaud F, Burger D, Dayer JM, Meier CA Adipose tissue is a major source of interleukin-1 receptor antagonist: upregulation in obesity and inflammation. *Diabetes* 2003 52:1104-1110
62. Somm E, Cettour-Rose P, Asensio C, Charollais A, Klein M, Theander-Carrillo C, Juge-Aubry C, Dayer J, Nicklin M, Meda P, Rohner-Jeanrenaud F, Meier C Interleukin-1 receptor antagonist is upregulated during diet-induced obesity and regulates insulin sensitivity in rodents. *Diabetologia* 2006 in press
63. Matsuki T, Horai R, Sudo K, Iwakura Y IL-1 plays an important role in lipid metabolism by regulating insulin levels under physiological conditions. *J Exp Med* 2003 198:877-888
64. Somm E, Henrichot E, Pernin A, Juge-Aubry CE, Muzzin P, Dayer JM, Nicklin MJH, Meier CA Decreased Fat Mass in Interleukin-1 Receptor Antagonist-Deficient Mice: Impact on Adipogenesis, Food Intake, and Energy Expenditure. *Diabetes* 2005 54:3503-3509
65. Source : figure 2 : Cristiana Juge, Emmanuel Somm, Vittorio Giusti, Agnès Pernin, Rachel Chicheportiche, Chantal Verdumo, Françoise Rohner-jeanrenaud, Danielle Burger, Jean-Michel Dayer et Christoph A Meier Adipose tissue is a major source of IL-1Ra.
66. R. Taylor. Use of adipose tissue for metabolic studies. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 1(4) (1987).