



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Faculté des Sciences et Techniques
U.F.R. : Sciences et Techniques Biologiques
E.D. : Biologie - Santé - Environnement
D.E.D.: Biologie structurale moléculaire et cellulaire

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

THESE

Présentée pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université Henri Poincaré - Nancy I
en Biologie structurale moléculaire et cellulaire**

par

Rachel BOXIO

SIGNALISATION INTRACELLULAIRE DANS LA REGULATION DES FONCTIONS BACTERICIDES CHEZ LES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES DE SOURIS

Soutenue publiquement le 31 mai 2005

Membres du Jury

Rapporteurs : - E. Tschirhart, Professeur, Luxembourg
- J-C Sulpice, Ingénieur de Recherche (HDR), Orsay

Examineurs : - O. Nüße, Professeur, Orsay (Directeur de thèse)
- C. Dournon, Professeur, UHP-Nancy 1
- G. Faure, Professeur, UHP-Nancy 1

EA 3442 : Génétique, Signalisation, Différenciation
Laboratoire de Biologie Expérimentale - Immunologie
Faculté des Sciences et Techniques – 54500 Vandœuvre - lès - Nancy

Table des matières

TABLI DES MATIÈRES	1
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	5
INTRODUCTION	9
I-ORIGINE ET DEVENIR DU NEUTROPHILE.....	13
II-MORPHOLOGIE DU NEUTROPHILE MATURE	17
II-1-ASPECTS BASIQUES DE LA GRANULOGÈNESE.....	17
II-2-CLASSIFICATION DES GRANULES DE NEUTROPHILES	18
II-3-CONTROLE DE L'EXOCYTOSE DES GRANULES.....	21
III-LES FONCTIONS DU POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE.....	23
III-1-LE CHIMIOTACTISME: PHASE DE "PREACTIVATION"	23
III-2-LA PHAGOCYTOSE.....	34
III-3-LA BACTERICIDIE.....	37
IV-ELIMINATION DU SITE D'INFECTION OU RESORPTION DE L'INFLAMMATION.....	47
IV-1-APOPTOSE, MORT CELLULAIRE PROGRAMMEE	47
IV-2- NEUTROPHILES ET APOPTOSE.....	62
V-LES RECEPTEURS MEMBRANAIRE DES CHIMIOATTRACTANTS.....	70
V-1-LES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G (GPCR).....	71
V-2-REGULATION DES RECEPTEURS DES CHIMIOATTRACTANTS.....	76
V-3-LES VOIES DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRE DES GPCR	78
VI-DYSFONCTIONNEMENT DU NEUTROPHILE	83
VI-1-MALADIES GENETIQUES.....	83
VI-2-CONDITIONS PATHOLOGIQUES REACTIONNELLES	86
VII-OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHES.....	89
MATERIEL & METHODES	91
I-PURIFICATION DES NEUTROPHILES	93
I-1-MODELE ANIMAL : LA SOURIS CONSANGUINE DE TYPE C57BL6.....	93
I-2-ISOLEMENT DE POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES DE SOURIS	94
I-3-ISOLEMENT DE POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES HUMAINS A PARTIR DU SANG PERIPHERIQUE.....	96
I-4-CONSERVATION DES FRACTIONS CELLULAIRES PAR CYTOCENTRIFUGATION	97
II-TESTS FONCTIONNELS	97
II-1-DETERMINATION DE LA PRODUCTION D'IONS SUPEROXYDES PAR LA NADPH OXYDASE.....	97
II-2-QUANTIFICATION DE L'EXOCYTOSE DES GRANULES PRIMAIRES	99
II-3-ESTIMATION DE L'EXOCYTOSE DES GRANULES SECONDAIRES.....	100
II-4-IMMUNOEMPREINTE PREALABLE A L'ELISA.....	103
III-ETUDE DES VOIES DE SIGNALISATIONS MISES EN JEUX POUR L'ACTIVITE MICROBICIDE DES NEUTROPHILES A L'AIDE D'INHIBITEURS SPECIFIQUES.	106
IV-DETERMINATION DE LA VIABILITE CELLULAIRE DES NEUTROPHILES DE SOURIS	107
IV-1-VIABILITE DES NEUTROPHILES EN CULTURE.	107
IV-2-EFFETS D'AGONISTES ET D'INHIBITEURS DES VOIES DE SIGNALISATION SUR LA VIABILITE DES NEUTROPHILES	109
V-LES VOIES DE SIGNALISATIONS DE L'APOPTOSE	110

V-1-EXPLORATION DE L' APOPTOSE CELLULAIRE PAR COLORATION CELLULAIRE.....	110
V-2-DETERMINATION DE L' APOPTOSE CELLULAIRE PAR IMMUNOEMPREINTE	113
VI-SYNTHESE ET PURIFICATION DU PEPTIDE H-WKYMVM-NH₂.....	115
VII-DECOUVERTE DE PEPTIDES ANTAGONISTES AU RECEPTEUR FPRL1.....	116
VIII-MATERIEL, PRODUITS ET APPAREILS	117
VIII-1-MATERIEL.....	117
VIII-2-PRODUITS.....	117
VIII-3-APPAREILS	121
X-ANALYSES STATISTIQUES ET TRAITEMENT MATHEMATIQUES	121
RESULTATS ET DISCUSSION.....	123
LA MOELLE OSSEUSE MURINE EST UN RESERVOIR DE NEUTROPHILES MATURES	
RESULTATS	126
I-PURIFICATION DE NEUTROPHILES MORPHOLOGIQUEMENT MATURES CHEZ LA SOURIS	
.....	126
I-1-QUANTITE DE CELLULES DISPONIBLES.....	126
I-2-ANALYSE MORPHOLOGIQUE DES CELLULES PURIFIEES SUR GRADIENT DE PERCOLL.....	128
II-L'ACTIVATION DE LA NADPH-OXYDASE ABOUTIT A LA FORMATION D'ANIONS	
SUPEROXYDES PAR LES NEUTROPHILES MURINS	129
II-1-CHOIX DES PLAQUES DE MICROTITRATION UTILISEES.....	129
II-2-LE PEPTIDE BACTERIEN FMLF INDUIT LA PRODUCTION D' ANIONS SUPEROXYDES PAR LES NEUTROPHILES	
MURINS.....	130
II-3-LES NEUTROPHILES DE LA MOELLE OSSEUSE SONT FONCTIONNELS	133
II-4-LA REPONSE OXYDATIVE AU PEPTIDE BACTERIEN FMLF NECESSITE LA PRESENCE DE CYTOCHALASINE B	
.....	134
II-5-UN ACTIVATEUR DE LA PROTEINE KINASE C, LE PMA, INDUIT L' ACTIVATION DE LA NADPH-OXYDASE	
.....	135
II-6-LA CHIMIOLUMINESCENCE OBSERVEE EST DUE A LA PRODUCTION D' ANIONS SUPEROXYDES PAR LA	
NADPH-OXYDASE.....	136
III-L'ENZYME B-GLUCURONIDASE, UN MARQUEUR DES GRANULES PRIMAIRES	138
III-1-COMPARAISON DE LA QUANTITE D' ENZYME B-GLUCURONIDASE	139
III-2-LA CYTOCHALASINE B JOUE UN ROLE IMPORTANT DANS L' EXOCYTOSE DES GRANULES PRIMAIRES	139
III-3-DU POINT DE VUE DE LA SECRETION DES GRANULES PRIMAIRES, LES NEUTROPHILES DE LA MOELLE	
OSSEUSE SONT AUSSI FONCTIONNELS QUE CEUX DU SANG.....	141
III-4-L' ACTIVITE DE LA B-GLUCURONIDASE PEUT ETRE DETECTEE EN REPONSE AU PMA ET A L' IONOPHORE	
CALCIQUE A23187.	142
IV-EXOCYTOSE DES GRANULES SECONDAIRES, EVALUATION DE LA SECRETION DE	
LACTOFERRINE PAR LES NEUTROPHILES DE SOURIS	142
IV-1-CONFIRMATION DE LA PRESENCE DE LACTOFERRINE DANS LES NEUTROPHILES MURINS.....	143
IV-2-L' EXOCYTOSE DES GRANULES SECONDAIRES EST ETUDIEE PAR LA MESURE DE L' EXCRETION DE	
LACTOFERRINE A L' AIDE D' UN TEST ELISA	146
DISCUSSION	150
I-CHOIX DU PROTOCOLE D' ISOLEMENT DES NEUTROPHILES	151
II-LES NEUTROPHILES DE MOELLE OSSEUSE DE SOURIS SONT MORPHOLOGIQUEMENT	
MATURES.....	152

III-LES NEUTROPHILES DE MOELLE OSSEUSE DE SOURIS SONT FONCTIONNELLEMENT MATURES.....	154
III-1-LA PRODUCTION D'ANIONS SUPEROXYDES	154
III-2-LA SECRETION DES GRANULES PRIMAIRES	156
III-3-LA SECRETION DES GRANULES SECONDAIRES	157
III - CONCLUSION.....	158

LE PEPTIDE WKYMVM-NH₂ AGIT VIA LES RECEPTEURS MEMBRANAIRES DES PEPTIDES N-FORMYLES ET ACTIVE LES NEUTROPHILES DE MOELLE OSSEUSE VIA DE MULTIPLES VOIES DE TRANSDUCTION DU SIGNAL.

RESULTATS	162
I-ETUDE DE LA PURETE DU PEPTIDE WKYMVM-NH₂	162
I-1-PURIFICATION A L'AIDE D'UNE HPLC EN PHASE INVERSE	162
I-2-AUTHENTIFICATION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE.....	164
II-TESTS FONCTIONNELS	165
II-1-ETUDE DE L'EXOCYTOSE DES GRANULES PRIMAIRES EN REPONSE AU PEPTIDE WKYMVM.	165
II-2-ETUDE DE L'EXOCYTOSE DES GRANULES SECONDAIRES EN REPONSE AU PEPTIDE WKYMVM	166
II-3-QUANTIFICATION DE LA PRODUCTION D'ANIONS SUPEROXYDES EN REPONSE AU PEPTIDE WKYMVM....	167
II-4-EFFET DE LA CYTOCHALASINE B SUR LA REPONSE MICROBICIDE	169
III-IDENTIFICATION DES VOIES DE SIGNALISATIONS INTRACELLULAIRE IMPLIQUEES DANS UNE STIMULATION PAR LE PEPTIDE WKYMVM-NH₂	170
III-1-ETUDE DE LA VOIE PI3-KINASE	171
III-2-ETUDE DES VOIES PKC, PKA ET P44/42 MAPK.....	176
III-3-ETUDE DE LA VOIE DE LA PHOSPHOLIPASE C.....	182
III-4-IMPORTANCE DU CALCIUM DANS LA SECRETION DES GRANULES	184
IV-IDENTIFICATION DES RECEPTEURS IMPLIQUES DANS UNE STIMULATION PAR LE PEPTIDE WKYMVM	191
IV-1-LE N-T-Boc-MLF : UN ANTAGONISTE DU RECEPTEUR AU FMLF	192
IV-2-LES PEPTIDES ANTAGONISTES AU RECEPTEUR FPRL1	195
DISCUSSION	203
I-COMPARAISON DES EFFETS STIMULATEURS DU FMLF ET DU WKYMVM.....	203
II-COMPARAISON DES VOIES DE SIGNALISATIONS INTRACELLULAIRE MISES EN JEU PAR LE FMLF ET PAR LE WKYMVM.	204
II-1-IMPLICATION DE LA VOIE PI3-KINASE DANS LA STIMULATION WKYMVM.....	205
II-2-IMPLICATION DES VOIES PKC, PKA ET P44/42 MAPK DANS LA STIMULATION WKYMVM.....	205
II-3-IMPLICATION DE LA VOIE PLC ET DU CALCIUM DANS LA STIMULATION WKYMVM	207
III-ETUDE DES RECEPTEURS MIS EN JEU PAR LE FMLF ET PAR LE WKYMVM.....	209
IV-CONCLUSION	211

ETUDE DE LA VIABILITE ET DES VOIES DE SIGNALISATIONS ASSOCIEES

RESULTATS	214
I-COMPARATIVEMENT AUX NEUTROPHILES ISSUS DE LA MOELLE OSSEUSE, LES NEUTROPHILES SANGUINS PRESENTENT UNE VIABILITE REDUITE.....	214

I-1-ETUDE DE LA VIABILITE DES NEUTROPHILES	214
I-2-DETERMINER LE TYPE DE MORT CELLULAIRE	216
I-3-LES NEUTROPHILES MEURENT PAR APOPTOSE VIA LA PERTE DU POTENTIEL MITOCHONDRIAL.....	217
II-EFFETS DE L'ADDITION D'AGONISTE SUR LE TEMPS DE SURVIE DES NEUTROPHILES MURINS.....	220
II-1-ETUDE DE LA VIABILITE DES NEUTROPHILES	221
II-2-DENOMBREMENT DES NOYAUX APOPTOTIQUES.....	224
II-3-DENOMBREMENT DES CELLULES PERDANT LEUR POTENTIEL MEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL	225
II-4-ETUDE DES PROTEINES PRO-APOPTOTIQUES : BAD, BAX ET CASPASE-9	227
III-IDENTIFICATION DES VOIES DE SIGNALISATIONS INTRACELLULAIRE IMPLIQUEES DANS LE PROCESSUS APOPTOTIQUE DU NEUTROPHILE MURINS.....	231
III-1-EFFET DES INHIBITEURS SEULS SUR LA VIABILITE DES NEUTROPHILES.....	231
III-2-EFFET DES AGONISTES EN PRESENCE D'INHIBITEURS SUR LA VIABILITE DES NEUTROPHILES.....	235
III-3-DENOMBREMENT DES NOYAUX APOPTOTIQUES	238
III-4-DENOMBREMENT DES CELLULES PERDANT LEUR POTENTIEL MITOCHONDRIALE MEMBRANAIRE EN PRESENCE D'INHIBITEURS.....	240
III-5-ETUDE DES VOIES DE SIGNALISATIONS IMPLIQUEES DANS LE PROCESSUS APOPTOTIQUE PAR IMMUNOEMPREINTE.....	242
 DISCUSSION	 245
I-LES NEUTROPHILES MURINS MEURENT PAR APOPTOSE.....	245
I-1-LES NEUTROPHILES SANGUINS PRESENTENT UNE VIABILITE REDUITE.....	245
I-2-PERTE DU POTENTIEL MEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL ET CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES NUCLEAIRES DE L' APOPTOSE	247
II-L' APOPTOSE EST UN PHENOMENE INFLUENÇABLE	248
II-1-MODULATION DE LA DUREE DE VIE DES NEUTROPHILES.....	248
II-2-INFLUENCE SUR LA VOIE APOPTOTIQUE MITOCHONDRIALE	251
III-LES VOIES DE SIGNALISATIONS INTRACELLULAIRES DE L' APOPTOSE	253
IV-CONCLUSION	258
 CONCLUSION GENERALE.....	 261
PERSPECTIVES.....	265
BIBLIOGRAPHIE.....	267
PUBLICATIONS	291

Liste des abréviations

AA:	Acide Aminé
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
ADP:	Adénosine DiPhosphate
AICD :	Activation Induced Cell Death ou mort cellulaire induite par l'activation
AIF:	Apoptosis Inducing Factor ou facteur inducteur de l'apoptose
AMPc :	Adénosine MonoPhosphate Cyclique
APAF:	Apoptosis Protease Activating Factor ou facteur d'activation des protéases apoptotiques
ARN :	Acide RiboNucléique
ARNm:	Acide RiboNucléique Messenger
ATNBS :	Acide 2,4,6-TriNitroBenzène Sulfonique
ATP :	Adénosine TriPhosphate
BPI :	Bactericidal Permeability Increasing protein ou protéine de perméabilisation de la membrane bactérienne
BSA:	Bovin Serum Albumin ou albumine sérique bovine
Ca²⁺_{intra} :	Calcium Intracellulaire
CAD:	Caspases Activated Desoxyribonucleases ou endonucléases activées par les caspases
CaMCKII:	Calcium calModulin dependent protein Kinase II ou protéine kinase dépendante du calcium
CARD:	CAspase Recruitment Domain ou domaine de recrutement des caspases
CCR:	Récepteur chemokines de type CC
CD :	Cluster de Différenciation
CF:	Cystic Fibrosis ou mucoviscidose
CFTR :	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator ou canal chlore transmembranaire intervenant dans les échanges sel / eau à l'intérieur de la cellule et impliqué dans la mucoviscidose
CFU-G :	Colony Forming Unit Granulocyte
CR :	Complement Receptor ou récepteur au complément
CRISP:	Cystein-Rich Secretory Protein ou protéine sécrétée riche en cystéine
CXCL:	Chemokines de type CXC
CXCR:	Récepteur aux chemokines de type CXC
Cyt b558 :	CYTochrome B558
DAF:	Decay-Accelerating Factor ou facteur accélérant la dégénérescence
DAG :	DiAcylGlycérol
DAPI:	4,6-DiAminido-2-Phenyl Indol
DED:	Death Effector Domain ou domaine effecteur de mort
DIEA :	DiIsopropylÉthylAmine
DISC:	Death Inducing Signalling Complex ou complexe de signalisation induisant la mort
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium ou milieu de Eagle modifié par Dulbecco
DMSO :	DiMéthyl SulfOxyde
DNAPK:	DNA dependent Protein Kinase ou protéine kinase dépendante de l'ADN
DTT :	DiThiThréitol
Ec₅₀ :	concentration molaire d'agoniste induisant 50 % de la réponse maximale
EDTA :	EthyleneDiamine Tetraacetic Acid ou acide éthylène diamine tétraacétatique
EGF :	Epidermal Growth Factor ou facteur de croissance épithélial
EGTA :	Acide Ethylène Glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-Tétraacétique
ELAM-1 :	Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule ou molécule endothéliale d'adhérence des leucocytes (E-Sélectine)
ELISA:	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay ou immunoanalyse utilisant un

	anticorps couplé à un marqueur enzymatique
ERK :	Extracellular signal-Regulated Kinase ou kinase régulée par un signal extracellulaire
FADD:	Fas Associated Death Domain ou protéine associée au domaine de la mort de Fas
FasL:	Ligand du récepteur FAS
Fc :	Fraction Constante des anticorps
FcR :	Récepteur de la Fraction Constante des anticorps
FITC:	Fluorescéine IsoThioCyanate
Flt3:	ligand du récepteur Fms-Like Tyrosine kinase
fMLF:	N-Formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanine
FPR :	Formyl Peptide Receptor ou récepteurs aux peptides N-Formylés
FPRL1 :	Formyl Peptide Receptor Like 1
FRN:	Formes Réactives de l'Azote
FRO :	Formes Réactives de l'Oxygène
G-CSF :	Granulocyte Colony Stimulating Factor ou facteur de croissance des colonies de granulocytes
GDP :	Guanosine DiPhosphate
GF :	Growth Factor ou facteur de croissance
GM-CSF :	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor ou facteur de croissance des colonies de granulocytes et de macrophages
GPCR:	G Protein Coupled Receptor ou récepteurs couplés aux protéines G
GRK :	G protein coupled Receptor Kinase ou kinases spécifiques des récepteurs couplés aux protéines G
GTP :	Guanosine TriPhosphate
HBSS :	Hanks' Balanced Salt Solutions
h-CAP :	Human Cathelicidin Antimicrobial Protein ou protéine humaine antimicrobienne de la famille des cathelicidines
HIV :	Human Immunodeficiency Virus (cf. SIDA)
HPC :	Hematopoietic Progenitor Cell ou cellule précurseur hématopoïétique
HPLC :	High Pressure Liquid Chromatography ou chromatographie liquide à haute pression
HRP :	HorseRardish Peroxydase ou peroxydase du radis noir
HSP :	Heat Shock Protein ou protéine de choc thermique
HSP70 :	Heat Shock Protein ou protéine de choc thermique de 70 kilodaltons
Ic₅₀ :	concentration molaire d'inhibiteur permettant une inhibition de 50 % de la réponse maximale
ICAD :	Caspases Activated Desoxyribonucleases Inhibitor ou inhibiteur des endonucléases activées par les caspases
ICAM :	InterCellular Adhesion Molecule ou molécule d'adhésion intracellulaire
ICE :	Interleukin Converting Enzyme ou enzyme de conversion de l'interleukine 1 β
Ig :	ImmunoGlobuline
IgG :	ImmunoGlobuline de type G
IgM :	ImmunoGlobuline de type M
IL :	InterLeukine
INF γ :	INterFéron γ
IP3 :	Inositol 1,4,5-triPhosphate
ITAM :	Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif ou motif de tyrosine d'activation des immunorécepteurs
LAD:	Leukocyte Adhesion Deficiency ou déficience d'adhérence des leucocytes
LAM-1 :	Leukocyte Adhesion Molecule ou molécule d'adhérence des leucocytes - 1 (L-Sélectine)
LAMs:	LipoArabinoMannans de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Lf :	LactoFerrine
LFA-1 :	Leukocyte Function associated Antigen ou intégrine α L- β 2 (CD11a:CD18)

LMWG :	Low-Molecular-Weight GTP-binding protein ou protéines G de faible poids moléculaire
LPS :	LipoPolySaccharides
LT :	Lymphocyte T
LTB4 :	LeucoTriènes B4
MAPK :	Mitogen Activated Protein Kinase ou protéine kinase activée par les facteurs mitogènes
MBHA :	4-Méthyl-BenzHydrylAmine
MEK :	MAPK/Erk Kinase
MIF :	Macrophage migration Inhibitory Factor ou facteur d'inhibition de la migration des macrophages
MIPα :	Macrophage Inflammatory Protein ou protéine inflammatoire sécrétée par les macrophages
MM:	Masse Moléculaire
MMP :	MetalloProtéinase Matricielle
MO-1 (Mac-1) :	intégrine αM-β2 (CD11b:CD18)
MPO :	MyéloPerOxydase
MUG :	4-MethylUmbelliferyl-*B-D-Glucuronide Dihydrate
NADP :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NADPH :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
ND:	Non Déterminé
NFeBR :	Neutrophil iron Binding Reactivity ou réactivité de la liaison du fer
NF-κb :	Facteur Nucléaire kappa B
NGAL :	Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin
NK :	Natural Killer
NRAMP :	Natural Resistance-Associated Macrophage Protein
NSF :	N-ethylmaleimise-Sensitive Fusion protein
OMP-140 :	Outer Membrane Protein ou protéine de la membrane externe (P-Sélectine)
ORL	Oto Rhino Laryngologie
PA :	Acide Phosphatidique
PAF :	Platelet Activating Factor ou facteur d'activation des plaquettes
PAK :	P21 Activated Kinase ou kinase activée par p21
PARP:	Poly ADP Ribose Polymerase
PBS:	Phosphate Buffered Saline ou tampon phosphate salin
PBS-tween :	tampon PBS contenant du tween
PC:	PhosphatidylCholine
PDGF :	Platelet Derived Growth Factor ou facteur de croissance des plaquettes
PDK :	Phosphatidylinositol Dependent Kinases ou kinase dépendante des phosphatidylinositols
PECAM :	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule ou molécule d'adhésion des cellules endothéliales et des plaquettes
PEG:	PolyEthylene Glycol
Peptide C2:	WPLTHTLRHTIW
Peptide E11:	FPSIHTIRLTQF
Phox :	oxydase de phagocyte
PI3K :	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP2 :	Phosphatidyl-Inositol-4,5-diPhosphate
PIP3 :	Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-triPhosphate
PKA :	Protéine Kinase AMP cyclique dépendante
PKB :	Protéine Kinase B ou Akt
PKC :	Protéine Kinase C
PLA :	PhosphoLipase A
PLC :	PhosphoLipase C
PLD :	PhosphoLipase D
PMA :	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PR3:	PRotéinase 3

PRR :	P rolin R ich R egion ou région riche en proline
PX :	phox domain
-R :	Récepteur
R.I.:	Indice de Réfraction
RAIDD:	Rip-Associated ICE homologous with Death Domain
Rapport N/C :	rapport NucléoCytoplasmique
RE :	Réticulum Endoplasmique
RIP:	Receptor Interacting Protein ou protéine interagissant avec les récepteurs
ROS:	Reactive Oxygene Species (cf. FRO)
SAA:	Sérum Amyloïde A
SCF :	Stem Cell Factor ou ligand du recepteur c-kit
SDF-1 :	Stromal cell-Derived Factor-1 ou facteur dérivé des cellules stromales -1
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-Page :	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes
SERCA :	Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ou pompe calcique ATP dépendante du réticulum sarco-endoplasmique
SIDA:	Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
SLea :	sialyl - Lewis a
SLex :	sialyl - Lewis x
SNAP :	Soluble NSF-Attachment Proteins ou protéine de liaison à NSF
SNARE :	Soluble NSF Attachment Protein REceptors ou récepteur des protéines de liaison à NSF
SOC :	Store Operated calcium Channel ou canaux calciques capacitifs
SOD :	SuperOxyde Dismutase
SPG-28 :	Specific Granule Protein of 28 kDa
SPPS :	Synthèse Peptidique en Phase Solide
SVF :	Sérum de Veau Fœtal
T :	Témoin
TMB :	3.3.5.5'-Tetra Methyl Benzidine
TNFR :	Récepteur au TNF α
TNFα :	Tumor Necrosis Factor ou facteur alpha de nécrose des tumeurs
TRADD :	TNFR1-Associated Death Domain protein ou protéine associée au domaine de mort des récepteurs au TNF
U.A. :	Unités Arbitraires
uPA :	Urokinase-type Plasminogen Activator
UV :	Ultra Violet
VAMP :	Vesicle Associated Membrane Protein ou protéine membranaire des vésicules
VCAM-1 :	Vascular Cell Adhesion Molecule -1 ou molécules d'adhésion des cellules vasculaires - 1
VLA-4:	Very Late Antigen-4
WK :	H-WKYMVm-NH ₂

Introduction

The first part of the paper discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. This is essential for ensuring the integrity of the financial statements and for providing a clear audit trail. The second part of the paper focuses on the various methods used to calculate the cost of goods sold, including the first-in, first-out (FIFO) method, the last-in, first-out (LIFO) method, and the weighted average cost method. Each method has its own advantages and disadvantages, and the choice of method can have a significant impact on the reported profit.

In addition, the paper examines the impact of inflation on the cost of goods sold. During periods of high inflation, the LIFO method tends to result in lower reported profits because it uses the most recent, and therefore most expensive, costs. Conversely, the FIFO method results in higher reported profits because it uses the oldest, and therefore least expensive, costs. The weighted average cost method provides a middle ground, as it averages the costs over the period.

Finally, the paper discusses the importance of proper inventory management. This includes maintaining accurate inventory records, conducting regular physical counts, and using appropriate inventory valuation methods. Proper inventory management is crucial for ensuring that the cost of goods sold is accurately reflected in the financial statements.

Un organisme est en permanence en contact avec des éléments de l'environnement susceptibles de l'agresser. L'organisme se défend contre ces agressions grâce à son système immunitaire qui assure la détection et la destruction permanente des éléments étrangers, c'est-à-dire appartenant au non-soi. Evidentes lorsqu'il s'agit de l'agression de l'organisme humain par une bactérie, les frontières entre soi et non-soi le deviennent moins lorsqu'on évoque les maladies auto-immunes, au cours desquelles le système immunitaire du patient détruit ses propres tissus.

Il existe différents types de réponses à une stimulation antigénique donc différents types d'immunité (figure 1) :

- l'immunité naturelle : elle regroupe les défenses naturelles externes (peau, mucus, ...) et la phagocytose non spécifique facilitée par l'intervention de protéines telles que les protéines de la phase aiguë (protéine C-réactive) et les opsonines. La peau, les muqueuses et les sécrétions glandulaires sont des protections naturelles contre les agresseurs. Si ces barrières sont insuffisantes ou altérées par une coupure par exemple, il peut y avoir contamination, c'est-à-dire pénétration d'un agent étranger. L'organisme va alors déclencher son système de défense non spécifique. Le traumatisme initial (la blessure) et les bactéries injectées sont responsables de l'apparition de substances vasoactives (histamine, PAF-acéther, leucotriènes) qui vont être à l'origine de la réaction inflammatoire locale. La vasodilatation locale assure l'exsudation plasmatique et la traversée des polynucléaires (notamment des neutrophiles attirés par chimiotactisme), apportant ainsi au niveau du foyer infectieux les facteurs humoraux et cellulaires de l'immunité non spécifique.

- l'immunité spécifique ou immunité acquise : c'est un mécanisme de défense plus lent, mais plus efficace, qui nécessite la reconnaissance spécifique de l'agresseur. Il regroupe l'immunité cellulaire ("les agents de combat" sont des cellules spécialisées) et l'immunité humorale (les effecteurs sont des molécules, les anticorps). La réponse immunitaire spécifique permet la lutte de l'organisme contre un agresseur identifié. Cette identification se fait par la reconnaissance de molécules portées ou produites par l'agent étranger, les antigènes. La réaction est possible grâce à des molécules spécifiques de chaque antigène: les anticorps qui sont capables de se fixer sur un antigène afin de le neutraliser soit directement par action du complément (cascade d'activation d'enzymes qui aboutit à la lyse des bactéries), soit en facilitant la phagocytose par les neutrophiles, les macrophages, les monocytes ou la cytolysse par les cellules tueuses (cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps).

L'ensemble des organes qui produisent les leucocytes et participent aux réactions immunitaires de l'organisme (moelle osseuse, thymus, ganglions lymphatiques, rate, plaques de Peyer et amygdales chez les Mammifères) et les différents types de leucocytes (cellules phagocytaires et lymphocytes) constituent le système immunitaire.

Les lymphocytes B (fabriqués dans la moelle osseuse) produisent les anticorps. Parmi les lymphocytes T (fabriqués dans le thymus), on distingue ceux qui aident les lymphocytes B dans leur production d'anticorps (les LT helper $CD4^+$) et ceux qui détruisent les cellules porteuses d'antigène (les LT cytotoxiques $CD8^+$).

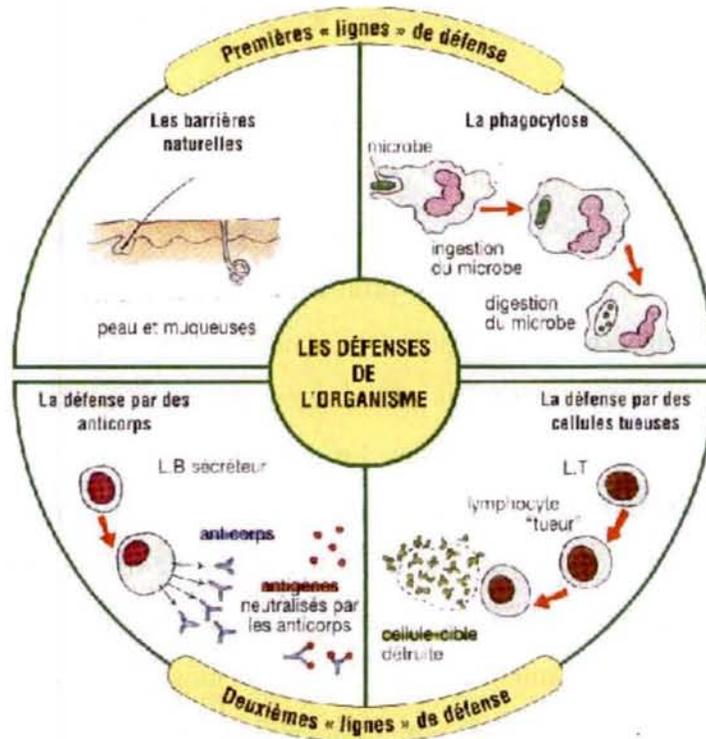


Figure 1: Présentation schématique des différentes lignes de défense dont dispose un organisme (Baudevin *et al.*, 1999).

En définitive, qu'elle soit spécifique ou non spécifique, l'immunité fait intervenir des cellules (immunité à médiation cellulaire) et des molécules en solution dans les liquides biologiques (immunité humorale). C'est cet ensemble qui constitue le système immunitaire.

Le polynucléaire neutrophile.

Les polynucléaires sont des cellules à noyau polylobé appartenant à la lignée granuleuse (d'où l'appellation granulocytes) c'est-à-dire possédant de nombreuses granulations dans leur cytoplasme. Selon l'aspect cytologique de leurs granulations spécifiques, on distingue les polynucléaires neutrophiles, les polynucléaires éosinophiles et les polynucléaires basophiles. Leurs fonctions dans les réactions immunitaires et inflammatoires sont très différentes. Nous n'envisagerons ici que le rôle des neutrophiles.

Les polynucléaires neutrophiles jouent un rôle essentiel dans la défense de l'hôte contre les agents infectieux et participent aux phénomènes inflammatoires lorsque leurs réponses sont exagérées et/ou inappropriées (Witko-Sarsat *et al.*, 2000).

Fabriqués dans la moelle osseuse, le neutrophile passe dans le sang circulant où son temps de séjour est très bref (quelques heures) ; il meurt ou gagne les tissus à la rencontre de micro-organismes pathogènes (Babior et Golde, 2001). La survie tissulaire, difficile à mesurer de façon précise, est d'environ 1 à 2 jours ; le neutrophile sénescence est ensuite phagocyté et détruit par les macrophages.

Le fonctionnement des neutrophiles peut schématiquement être divisé en quatre grandes étapes :

- 1) le déplacement des neutrophiles vers la cible (un micro-organisme par exemple) ;
- 2) l'adhérence à la cible ;
- 3) la phagocytose ;
- 4) la production de produits toxiques : radicaux libres et dérivés oxygénés, enzymes protéolytiques et protéines cationiques sont responsables de la destruction du micro-organisme envahisseur aussi bien que des tissus de l'organisme lui-même (Ali *et al.*, 1997).

I-Origine et devenir du neutrophile.

Les cellules intervenant dans les réactions immunitaires sont dérivées du tissu hématopoïétique de la moelle osseuse. Alors que chez l'enfant, la totalité des tissus osseux est hématopoïétique, chez l'adulte la distribution de la moelle hématopoïétique se limite aux os plats et aux extrémités renflées des os longs, les épiphyses (Germain *et al.*, 1981b). Elle est constituée d'un réseau de fibrilles vascularisées par des sinus sanguins. Elle contient des cellules adipeuses et du tissu hématopoïétique (moelle rouge) dans lequel se trouvent les cellules souches hématopoïétiques totipotentes.

Les cellules souches hématopoïétiques totipotentes se différencient en progéniteurs "déterminés", à l'origine de toutes les cellules sanguines (figure 2). Sous le contrôle des signaux extracellulaires, les cellules souches pluripotentes se transformeront :

- en progéniteurs de la lignée myéloïde, aboutissant à la formation des globules rouges, plaquettes, polynucléaires, monocytes / macrophages et cellules dendritiques
- ou en progéniteurs de la lignée lymphoïde, aboutissant à la formation des lymphocytes B et T.

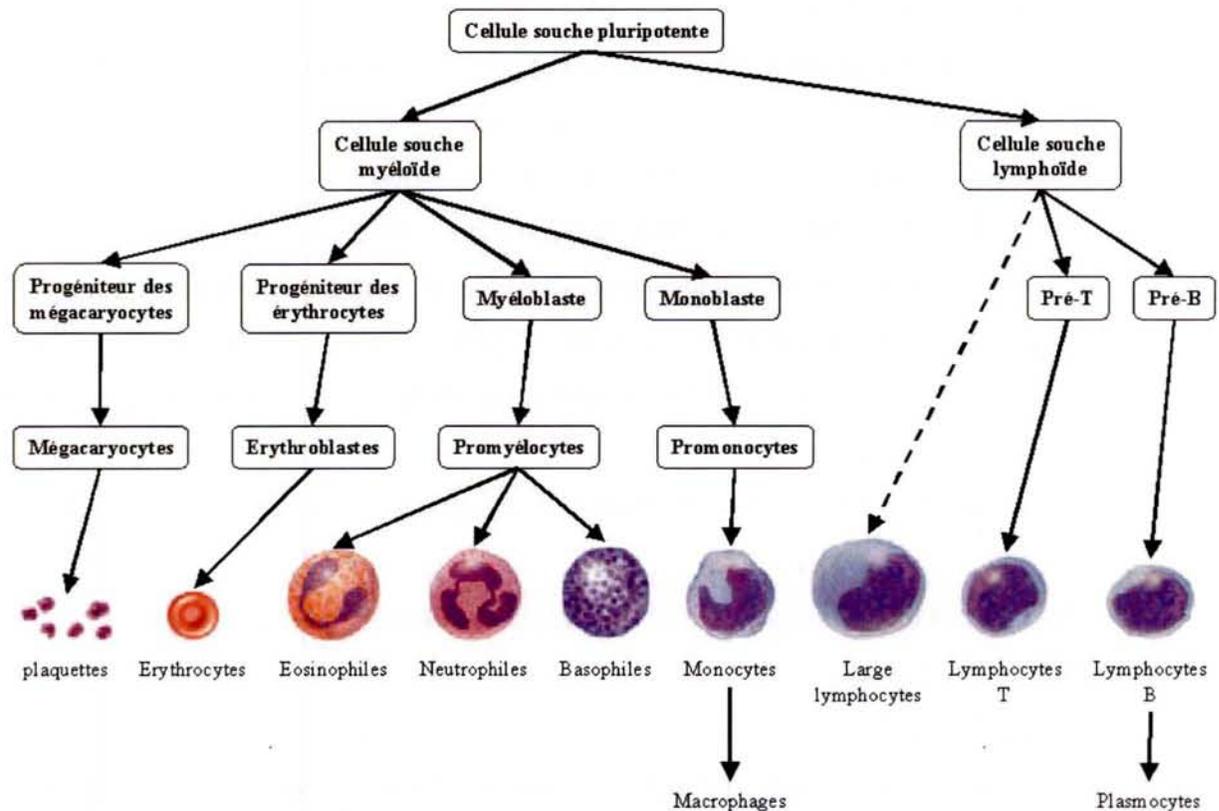


Figure 2 : Le développement des cellules sanguines se déroule dans la moelle osseuse. Toutes ces cellules résultent de la différenciation de cellules souches totipotentes, qui ont une capacité de renouvellement, ou se divisent en divers types de cellules plus mûres. Seules les caractéristiques morphologiques des cellules matures sanguines sont représentées (Edwards, 1994).

Les neutrophiles dérivent de la lignée myéloïde. Ces cellules souches de cette lignée donnent naissance aux progéniteurs des granulocytes et des monocytes/macrophages, étape suivie de la formation du progéniteur direct des polynucléaires.

Leur différenciation est contrôlée par un ensemble de cytokines, de facteurs de croissance et de contacts membranaires qui agissent de façon coordonnée sur leur prolifération et leur maturation (Edwards, 1994).

La répartition de ces diverses cellules dans la moelle osseuse est résumée ci-dessous (tableau 1).

Cellule jeune indifférenciée	1 %	Lignée granuleuse composée de	72 %
Lignée granuleuse	72 %	Myéloblaste	1 %
Lignée érythrocytaire	16 %	Promyélocyte	2 %
Lymphocyte	8 %	Myélocyte neutrophile	16 %
Monocyte	2 %	Métamyélocyte neutrophile	16 %
Plasmocyte	1 %	Polynucléaire neutrophile	32 %
Mégacaryocyte	< 1 %	Métamyélocyte éosinophile	2 %
		Polynucléaire éosinophile	2 %

Tableau 1 : Myélogramme humain (adulte) réalisé à partir d'une ponction de la moelle au niveau du sternum (Coeur, 1999).

Dans la lignée myéloïde, les cellules myéloïdes progénitrices CFU-G se transforment en myéloblaste puis en promyélocyte et en myélocyte. Cette phase dite mitotique, qui dure environ 7 jours, est caractérisée par l'apparition successive des granulations azurophiles (ou primaires) puis des granulations spécifiques (ou secondaires) qui définissent le type du polynucléaire. Elle est suivie par une phase non répliquative, dite post-mitotique qui dure environ 6 jours au cours de cette phase, le myélocyte se transforme en métamyélocyte puis en polynucléaire mûr, caractérisé par un noyau polylobé (figure 3). Les polynucléaires mûrs restent de 0 à 5 jours dans la moelle où ils constituent le secteur de réserve médullaire.

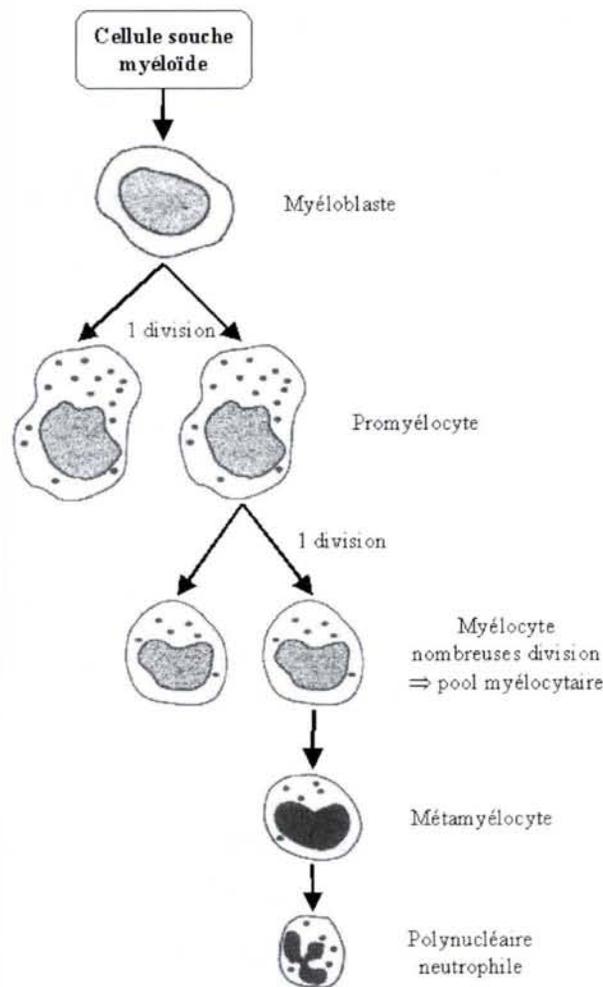


Figure 3 : Caractéristiques morphologiques du développement du neutrophile et de ces précurseurs (Coeur, 1999).

La granulopoïèse neutrophile se traduit par une diminution du diamètre des cellules (25 à 15 μm) et du rapport nucléocytoplasmique (0,8 à 0,4), la condensation de la chromatine (et du noyau), la perte du nucléole et l'apparition des granulations (tableau 2).

	Myéloblaste	Promyélocyte	Myélocyte	Métamyélocyte
Taille (μm)	20-25	20-25	15	15
Rapport N/C	0,8	0,6	0,5	0,4
Forme du noyau	\pm arrondi	ovale	ovale	incurvé
Chromatine	très fine rougeâtre	fine plus foncée	condensée violette	condensée violette
Nucléole	2 à 5	\pm	0	0
Cytoplasme	bleu ciel	bleu pale	incolore	incolore
Granulation	rare (rouge)	nombreuse (rouge et beige)	nombreuse (beige)	nombreuse (beige)
RE, ribosome et mitochondrie	+++	+++	++	+

Tableau 2 : Aspect cytologique du neutrophile au cours de son développement intramédullaire (Coeur, 1999). Coloration May-Grunwald-Giemsa.

La moelle produit environ $0,85$ à $1,6 \times 10^9$ neutrophiles par kg de poids corporel et par jour dans les circonstances normales (Klebanoff et Clark, 1978). Cette production peut augmenter si des circonstances pathologiques l'exigent, en particulier au cours d'un état infectieux.

Les neutrophiles sanguins se répartissent en deux secteurs à peu près équivalents un secteur circulant, accessible à la numération sanguine ($1\ 800$ à $7\ 000$ / μ l), et un secteur marginé (environ 50 % du pool total), adhérant à l'endothélium au niveau des veinules post-capillaires. Sous l'influence de différents stimuli, le neutrophile à l'état de repos dans le sang circulant, adhère à la paroi vasculaire, se glisse entre les cellules endothéliales et migre vers les tissus (Edwards, 1994).

II-Morphologie du neutrophile mature

Les leucocytes polynucléaires ont été découverts par Paul Ehrlich quand les techniques de fixation et de coloration ont permis d'identifier le noyau lobé et les granules qui ont donné leur nom à ces cellules et ont permis leur classification en tant que basophile, éosinophile, et neutrophile. Les différents types de granulation du neutrophile ont été mis en évidence par leur capacité à fixer des colorants (Ehrlich et Lazarus, 1956).

II-1-Aspects basiques de la granulogénèse

Les granules apparaissent à l'étape de la maturation du neutrophile, étape marquée par la transition de myéloblaste à promyélocyte (Bainton et Farquhar, 1966; Bainton *et al.*, 1971). Dès lors, la synthèse des protéines granulaires se poursuivra jusqu'à l'étape finale de la maturation (Borregaard *et al.*, 1995).

Les premiers granules (primaires) apparaissent à l'étape de promyélocyte ; ils contiennent de la myéloperoxydase et s'appellent azurophilique car ils présentent une sensibilité pour le colorant azuré. Plus tard dans la maturation de neutrophile (à l'étape de métamyélocyte), les granules spécifiques (secondaires) apparaissent. Ils contiennent, entre autres protéines, la collagénase, la lactoferrine, et la gélatinase. Les granules de gélatinase (tertiaires) ressemblent aux granules spécifiques mais présentent une concentration plus élevée de gélatinase.

Il est probable que l'empaquetage des protéines dans leurs granules ne relève pas d'un système complexe de signaux dépendant de nombreuses et différentes protéines. En effet, Le

Cabec *et al.* ont démontré que la localisation des protéines granulaires dépendait de la synchronisation ontogénique. Par exemple, quand l'ADN pour la protéine NGAL, normalement présente dans les granules secondaires des métamyélocytes, est transfectée dans une lignée de cellules HL-60 au stade promyélocyte, la protéine NGAL est alors exprimée dans les granules primaires (Le Cabec *et al.*, 1996).

II-2-Classification des granules de neutrophiles

Les granules peuvent être classifiés en fonction de leur taille, de leur morphologie ou de leur contenu en protéine. Les travaux de Borregaard considèrent toutefois que la classification des granules est arbitraire (Faurischou et Borregaard, 2003). La formation des granules est continue, depuis les granules primaires jusqu'aux granules tertiaires. Ces divers granules partagent quelques protéines (ex. : lysozyme), tandis que d'autres protéines sont des marqueurs spécifiques d'un sous-ensemble particulier (ex. : β -glucuronidase, lactoferrine ou gélatinase).

Il est maintenant bien établi que la différence principale entre ces différents sous-ensembles de granule concerne l'ordre de sécrétion, aussi bien *in-vitro* qu'*in-vivo*. En effet, de nombreux auteurs ont ainsi démontré que les granules primaires étaient mobilisés les derniers, après les granules secondaires ; les granules tertiaires étant sécrétés les premiers. Cette hiérarchie s'applique aussi bien pour des neutrophiles sanguins que pour des neutrophiles provenant d'exsudat de fenêtre cutanée, stimulés par divers agonistes (Borregaard et Cowland, 1997).

Dans chaque sous-ensemble de granules, un certain nombre de protéines ont pu être identifiées par la microscopie électronique, par fractionnement sous cellulaire ou lors de leur mobilisation en prenant pour hypothèse que deux protéines sécrétées en même temps, étaient localisées dans le même type de granules. Ces granules renferment de nombreuses protéines impliquées dans la lutte contre les micro-organismes et la dégradation de la matrice extracellulaire lors du déplacement des neutrophiles vers le site d'inflammation ou lors du renouvellement de cette matrice (tableau 3).

Granulations azurophiles	Granulations spécifiques	Granulations tertiaires	Vésicules sécrétoires
Membrane (nombreux récepteurs)			
CD63 CD68 Presenilin-1 Stomatine V-type H ⁺ -ATPase	Antigène NB1 CR3 (CD11b/CD18) CD15 CD66 CD67 Cytochrome b ₅₅₈ fMLF-R Fibronectine-R Sous unités prot. G α Laminine-R Leukolysine Protéine de 19 kDa Protéine de 155 kDa Rap1, Rap2 SCAMP SNAP-23, -25 Stomatine Thrombospondine-R TNF-R uPA-R VAMP-2 Vitronectine-R	CR3 (CD11b/CD18) Cytochrome b ₅₅₈ DAG deacetylating Ez fMLF-R Leukolysine NRAMP-1 SCAMP SNAP-23, -25 uPA-R VAMP-2 V-type H ⁺ -ATPase	CR1 CR3 (CD11b/CD18) CD10 CD13 CD14 CD16 CD15 CD45 C1q-R Cytochrome b ₅₅₈ DAF fMLF-R Leukolysine Phosphatase alcaline VAMP-2 V-type H ⁺ -ATPase
Matrice			
β -glycérophosphatase Acide-mucopolysaccharide α_1 -antitrypsine α -mannosidase Azurocidine BPI β -glycerophosphatase β -glucuronidase Cathepsines B, D et G Défensines Elastase Lysosyme Myéloperoxydase N-acétyl- β -glucosaminidase Protéinase 3 Sialidase Ubiquitin-protein	β 2 microglobuline Collagénase CRISP-3 (SGP-28) Gélatinase h-CAP-18 Histaminase Héparanase Lactoferrine Lysosyme NGAL uPA Sialidase Transcobalamine	Acétyltransférase β 2 microglobuline CRISP-3 (SGP-28) Gélatinase Lysosyme	Protéine du plasma

Tableau 3 : Principaux constituants des granules du neutrophile (Fauschou et Borregaard, 2003).

- Les granulations primaires ou azurophiles constituent le tiers des granulations d'un neutrophile (environ 1500 granulations/neutrophile). Ce sont des organites de petite taille (0,5 à 0,8 μm), de forme allongée qui apparaissent très denses en microscopie électronique.

- Les granulations secondaires ou spécifiques (peroxydase négative) sont des organites sphériques de taille inférieure à celle des granulations azurophiles (environ 0,2 μm) ou en forme de bâtonnet (0,1 x 1 μm), apparaissant claires en microscopie électronique.

- Les granulations tertiaires, de petite taille, sont plus hétérogènes que les deux précédentes.

- Les vésicules sécrétoires : Le fait que la $\beta 2$ -intégrine Mac-1 ($\alpha\text{m}\beta 2$, CD11b/CD18) soit incorporé à la membrane plasmique sans que l'on observe de sécrétion d'autres protéines granulaires, a permis de mettre en évidence la présence d'un autre sous-type de granules : les vésicules sécrétoires. Les vésicules sécrétoires sont importantes car leur membrane est particulièrement riche en récepteurs. De plus, ces vésicules ne semblent contenir que des molécules d'origine plasmatiques tel que l'albumine. L'équipe de Borregaard en a donc conclu que ces vésicules seraient d'origine endocytaire (Faurischou et Borregaard, 2003). Comme les granules, une fois mobilisées, les vésicules sécrétoires ne sont pas reformées, ni *in-vitro* ni *in-vivo*.

Borregaard et Cowland ont supposé que les vésicules sécrétoires sont mobilisées dès l'étape de rolling, lors du premier contact avec l'endothélium activé, lors de l'interaction des sélectines avec leurs ligands ou par les médiateurs inflammatoires libérés de l'endothélium (Borregaard et Cowland, 1997). Cette hypothèse est en accord avec les travaux de Sengelov qui a pu constater que les vésicules sécrétoires de neutrophiles provenant d'exsudat de fenêtrée cutanée étaient complètement mobilisées (Sengelov *et al.*, 1995).

Sous l'effet de différents stimuli, survient une mobilisation des granulations avec le déversement de certains composants dans le milieu extracellulaire et/ou dans les phagosomes et l'expression de certaines molécules à la surface cellulaire. Cette dégranulation permet une décompartmentalisation rapide des molécules stockées dans les granulations des neutrophiles au repos et leur permet alors d'intervenir dans différents sites de la cellule. L'exocytose du contenu granulaire est une conséquence de la fusion des membranes granulaire et plasmique. Chez le neutrophile, contrairement à d'autres types cellulaires (adipocytes ou neurones), la membrane des granules mobilisés reste dans la membrane plasmique (Shibata *et al.*, 1995; Burgoyne et Morgan, 1995). De cette façon, les protéines membranaires des granules sont alors exposées à la surface de la membrane plasmique et fournissent ainsi à la cellule de nouveaux récepteurs et d'autres protéines (Borregaard et Cowland, 1997).

II-3-Contrôle de l'exocytose des granules

Comme nous en avons fait référence précédemment, les vésicules sécrétoires et les différents types de granules sont mobilisés selon un ordre hiérarchique défini dépendant de mécanismes capables de distinguer les différents sous-ensembles de granule. Cette hiérarchie semble être ajustée sur les différents rôles de ces organelles pendant le voyage du neutrophile, de la circulation vers le foyer inflammatoire. En effet, alors que les granules et les vésicules sécrétoires semblent aléatoirement distribués dans le cytosol du neutrophile circulant, ces organites sont localisés dans le lamellipode du neutrophile activé. Cependant, mobilisation hiérarchique ne signifie pas mobilisation indépendante, c'est-à-dire qu'il ne peut y avoir de mobilisation des granules secondaires sans mobilisation, concomitante mais plus importante, des granules tertiaires. La hiérarchie de mobilisation est due à des différences quantitatives et non pas qualitatives dans la machinerie qui contrôle l'exocytose des différents sous-ensembles de granules : tous les types de granules sont exocytés mais pas en même abondance (Borregaard et Cowland, 1997).

L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire (Ca^{2+}_{intra}) est connue pour induire l'exocytose des granules de stockage dans de nombreuses cellules. Ainsi, l'exocytose des granules primaires requièrent une plus forte augmentation de la concentration intracellulaire calcique que celles des granules secondaires (Nusse *et al.*, 1998). Bien que respectant la hiérarchie de sécrétion, de nombreux auteurs ont observé des différences dans la sensibilité des granules et des vésicules sécrétoires à l'augmentation de la concentration Ca^{2+}_{intra} (Lew *et al.*, 1986; Perez *et al.*, 1987; Sengelov *et al.*, 1993). L'exocytose des granules et des vésicules sécrétoires semblent donc être dépendante de la concentration Ca^{2+}_{intra} . Ainsi, le calcium pourrait ainsi favoriser la dégranulation de neutrophile en régulant l'interaction entre les protéines du système SNAP/SNARE.

Le système SNAP/SNARE repose sur l'hypothèse qu'il existe une interaction spécifique entre les protéines v-SNAREs (présentes sur la membrane des granules et des vésicules sécrétoires) et les protéines t-SNAREs (présentes sur la membrane plasmique, extérieur ou présente autour du phagosome). Selon cette hypothèse, la fusion de ces membranes dépendrait de l'action combinée de facteurs cytosolique : la NSF (N-ethylmaleimise-sensitive fusion protein) qui est une ATPase qui s'associe fermement aux protéines SNAP liées aux SNARE ; des protéines de liaison de NSF : des SNAPs (soluble NSF-attachment proteins) ; et d'autres intervenants comme le calcium intracellulaire (Ca^{2+}_{intra}), la synaptotagmin, et d'autres protéines membranaire (Fauschou et Borregaard, 2003) (figure 4).

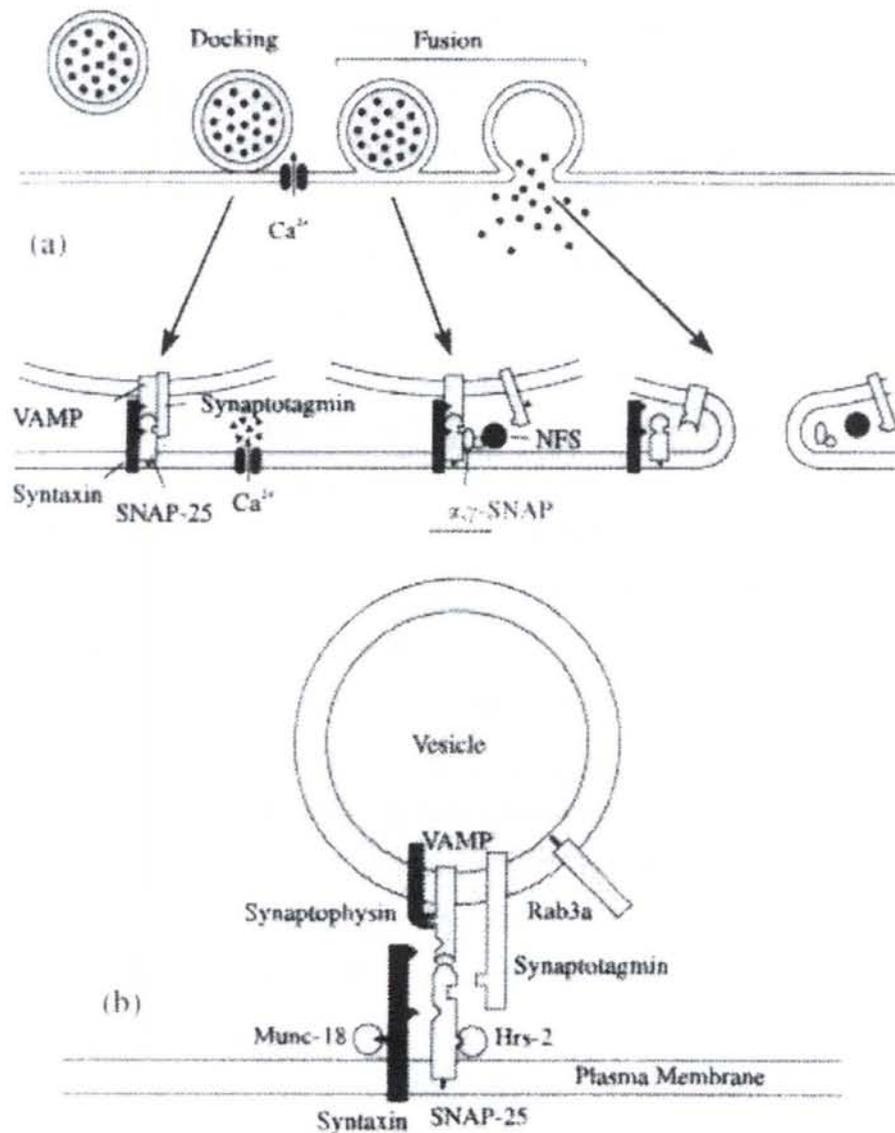


Figure 4: (a) Présentation de l'ordre des événements menant à la fusion des membrane des granules et de la membrane plasmique selon l'hypothèse SNARE. (b) Représentation schématique montrant la localisation et les potentielles interactions protéine - protéine du noyau protéique, impliquées dans la régulation de l'exocytose (Shukla *et al.*, 2000).

Dans les neutrophiles, les protéines t-SNARE (comme la syntaxin-4 et -6) sont présentes exclusivement dans la membrane plasmique, tandis que les protéines v-SNARE : VAMP-2 et la synaptotagmin sont présentes dans la membrane des granules et des vésicules sécrétoires. Ces protéines sont présentes en plus grand nombre dans la membrane des vésicules sécrétoires et des granules tertiaires que dans celles des granules secondaires. La protéine VAMP-2 ne serait pas présente dans la membrane des granules primaires.

Des protéines sensibles au calcium tels que la synaptotagmin ont été proposées pour contrôler l'ensemble/démontage des complexes SNARE (Sollner *et al.*, 1993). Dans l'étape d'amarrage, un complexe SNARE constitué des protéines VAMP, de syntaxine et de SNAP-

25 est formé. Au repos, la synaptotagmin se lie au complexe et fonctionne comme un crochet moléculaire pour contrôler l'étape de fusion. Lors d'une stimulation, l'augmentation soudaine de la concentration calcique intracellulaire active la synaptotagmin qui se dissocie du complexe SNARE, permettant ainsi la fixation des protéines α et γ -SNAP au complexe : l'exocytose est initié. Ces protéines recrute une ATPase : le NSF, qui hydrolyse l'ATP et dissocie de ce fait le complexe SNARE. Cette dissociation mène à la fusion entre la membrane du granule et la membrane plasmique (Shukla *et al.*, 2000).

III-Les fonctions du polynucléaire neutrophile

Les neutrophiles constituent une des premières lignes de défense contre les agents pathogènes. Le neutrophile joue notamment un rôle critique dans la défense de l'organisme contre les infections bactériennes et fongiques. Les étapes conduisant à la destruction d'un micro-organisme par les neutrophiles sont en fait très souvent imbriquées, mais pour plus de clarté elles seront traitées successivement.

Ces étapes font intervenir l'adhérence du neutrophile à la cellule endothéliale et au substratum extracellulaire, le déplacement vers le site infectieux, le contact avec les micro-organismes suivi (ou non) de phagocytose et de bactéricidie par des mécanismes dépendants ou indépendants de l'oxygène.

III-1-Le chimiotactisme: phase de "préactivation"

Programmés pour neutraliser les agressions antigéniques, les neutrophiles patrouillent sans cesse dans l'organisme. Dans les conditions physiologiques, les neutrophiles sont au repos dans le sang circulant. En réponse au signal chimique émis par les molécules étrangères à l'organisme ou par les cellules lésées, la plupart d'entre eux franchissent la barrière de l'endothélium vasculaire (diapédèse leucocytaire) pour se rendre, migrant au travers des tissus, vers le site inflammatoire: c'est le chimiotactisme. On désigne par chimiocinèse la vitesse de déplacement. En réponse à des signaux chimioattractants, le neutrophile se déplace à une vitesse uniforme moyenne de 0,14 $\mu\text{m/s}$ (Vereycken *et al.*, 1995).

Pour se déplacer, le neutrophile doit d'abord adhérer à un support ; *in vivo*, il s'agit de l'endothélium vasculaire, des fibres de collagène et d'autres substances matricielles tissulaires. *In vitro*, les supports utilisés pour étudier la locomotion sont variés : verre ou plastique recouverts ou non d'albumine, de sérum ou de fibronectine, monocouche de cellules en

culture, membranes millipores. Ainsi, l'adhérence à l'endothélium vasculaire constitue la première étape de migration des neutrophiles vers les tissus. Ces interactions entre polynucléaires et cellules endothéliales sont médiées par des récepteurs de surface exprimés sur les deux types cellulaires.

III-1-A-Récepteurs cellulaires impliqués dans l'interaction entre neutrophiles et cellules endothéliales

L'adhérence entre neutrophiles et cellule endothéliale fait intervenir essentiellement les sélectines et les β 2-intégrines.

III-1-A-a-Les sélectines

La famille des sélectines est constituée de trois types de glycoprotéines de membrane qui médient les interactions initiales neutrophiles/cellule endothéliale par liaison à des ligands hydrates de carbone. Leurs architectures moléculaires sont similaires : un domaine lectine terminal, un domaine EGF-like (epidermal growth factor), un nombre variable de courtes séquences consensus répétées, une simple séquence transmembranaire et enfin, un court domaine intracytoplasmique. Les domaines lectine et EGF-like sont essentiels pour permettre la fixation aux ligands hydrates de carbone (Ali *et al.*, 1997).

Alors que la L-sélectine (LAM-1 ou CD62L) est constitutivement exprimé à la surface des neutrophiles, la P-sélectine (OMP-140 ou CD62) et la E-sélectine (ELAM-1 ou CD62E) sont exprimés de façon transitoire à la surface des cellules endothéliales (suite à leur stimulation par des cytokines). Le site actif des sélectines (la lectine) se lie à des structures carbohydrates et en particulier à des oligosaccharides dont le Lewis x (CD 15), le sialyl - Lewis x (SLe^x) et le sialyl-Lewis a (Sle^a) portés par des protéines sur la surface interne des vaisseaux (Lasky *et al.*, 1992; Baumhueter *et al.*, 1993; Burg et Pillinger, 2001).

Des glycoprotéines exprimant l'antigène Lewis x et son dérivé sialylé (SLe^x) sont présentes à la surface des polynucléaires neutrophiles et dans les granulations intracellulaires spécifiques et azurophiles. Au repos, la L-sélectine joue un rôle majeur dans les phénomènes de roulement du neutrophile à la surface de l'endothélium en adhérant à différentes molécules et notamment aux sélectines induites à la surface des cellules endothéliales par différents stimuli provenant du foyer inflammatoire (Gougerot-Pocidallo, 1997).

En plus de leur importance lors des phénomènes d'adhésion cellulaire, les sélectines contribuent à la transduction de signaux extracellulaires. Ainsi, les travaux de Lorant ont pu démontrer que la production de superoxydes et la dégranulation des neutrophiles en réponse à

une stimulation par le PAF ou par des peptides bactériens N-formylés tels que le fMLF sont plus importantes lorsque ces cellules sont étalées sur un support recouvert de P-sélectine (Lorant *et al.*, 1993). De la même façon, d'autres auteurs ont mis en évidence un rôle de "primer" pour la L-sélectine : l'activation de la L-sélectine (à l'aide d'anticorps anti L-sélectine) des neutrophiles préactive la cellule et induit une production accrue d'anions superoxydes en réponse à des chimioattractants (Burg et Pillinger, 2001).

III-1-A-b-Les intégrines

Les $\beta 2$ -intégrines de la surface du neutrophile jouent un rôle capital lors de la diapédèse. L'étude des déficits en protéine d'adhérence a clairement déterminé l'importance des récepteurs $\beta 2$ -intégrines dans la migration des neutrophiles vers les sites infectieux (Brown, 1997).

Ce sont des protéines transmembranaires qui possèdent un domaine intracellulaire capable d'interagir avec le cytosquelette. Une fois activées, elles transmettent un signal intracellulaire qui inciterait le neutrophile à se déformer pour permettre sa transmigration (Ali *et al.*, 1997).

Les $\beta 2$ -intégrines sont des hétérodimères composées d'une chaîne α et d'une chaîne β associées de façon non covalente. Il existe au moins 8 types de chaînes α et 8 types de chaînes β qui se combinent pour former 21 intégrines identifiées dont quatre intervenant dans l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium (Mouy R. et Haddad E., 1996). Chez le neutrophile, la sous-unité α est particulière à chaque molécule de la famille alors que la sous-unité β est commune aux quatre molécules ($\beta 2$:CD18).

Les sous-unités α sont αL (CD11a), αM (CD11b), αX (CD11c) et αD (proche de CD11b ou CD11c) respectivement pour LFA-1, MO-1 (ou Mac-1 ou CR3), p150/95 et αD /CD18 (Ali *et al.*, 1997). Les molécules CD11b et CD11c sont stockées dans la membrane des granulations des neutrophiles, mais aucun site de stockage n'a été identifié pour CD11a.

L'avidité et l'expression de CD11b et CD11c à la surface des neutrophiles augmente à la suite d'une stimulation par différents facteurs incluant les ionophores calciques, les esters de phorbol, les peptides N-formylés, le GM-CSF, le TNF, l'IL-8, le PDGF ou le LTB₄. Cette augmentation d'expression du CD11b et CD11c est liée à une translocation du stock intragranulaire à la surface membranaire (Kolanus et Seed, 1997).

Les membres de cette famille de $\beta 2$ -intégrines permettent l'adhésion ferme des neutrophiles à l'endothélium vasculaire. Ces molécules se lient aux molécules d'adhésion de

la superfamille des immunoglobulines : ICAM-1 à ICAM-3 et VCAM1, exprimées à la surface des cellules endothéliales.

L'expression en surface de ICAM-1 est très faible ; elle est augmentée par les cytokines, alors que l'expression d'ICAM-2 est constitutive et n'est pas augmentée par l'activation de l'endothélium (Staunton *et al.*, 1989). ICAM-1 et ICAM-2 interagissent avec LFA-1 alors que ICAM-3 semble reconnaître α d/CD18 (Ali *et al.*, 1997). La molécule ICAM-1 est également reconnue par Mac-1. D'autres molécules sont également impliquées dans l'adhérence du neutrophile à la cellule endothéliale : c'est le cas de PECAM1/CD31 (Platelet/endothelial cell adhesion molecule) et de son ligand α v β 3. Exprimées à la fois par les leucocytes et à la jonction des cellules endothéliales, ce couple s'est avéré essentiel pour la migration des leucocytes entre les cellules endothéliales étroitement liées (Muller *et al.*, 1993; Piali *et al.*, 1995).

III-1-B-Physiologie de l'adhérence du neutrophile à la cellule endothéliale

Le processus d'émigration des neutrophiles implique une série d'événements régulés de façon très précise qui peut être divisée en trois étapes successives :

- le roulement ou rolling, dépendant des molécules d'adhésion de types sélectines ;
- l'adhérence forte, dépendante des intégrines des neutrophiles et de leurs récepteurs endothéliaux ;
- la transmigration.

III-1-B-a-Le roulement ou rolling

Au cours d'un état inflammatoire, débute une première phase de préactivation des cellules endothéliales. L'endothélium se métamorphose à proximité du foyer d'infection, des molécules d'adhérence de types sélectines sont exprimées à la surface des cellules endothéliales sous l'action d'agents produits par les cellules du tissu endommagé. Ces médiateurs de l'inflammation sont la thrombine, l'histamine et les cytokines "d'alarme" telles que l'interleukine 1, le TNF α et l'endotoxine (Moser *et al.*, 1989). Ceux-ci augmentent l'expression des E et P-sélectines à la surface des cellules endothéliales.

Au cours de cette phase, l'adhérence du neutrophile à la cellule endothéliale fait également intervenir la L-sélectine. L'adhérence est alors de faible sensibilité conduisant, de ce fait, à des phases successives d'attachement puis de détachement du neutrophile à la cellule

endothéliale. Ce phénomène aboutit au roulement ou "rolling" du neutrophile le long de l'endothélium (figure 5).

Le freinage des neutrophiles augmente la fréquence et la durée de leurs contacts avec l'endothélium. Ainsi sont-ils davantage exposés aux petites molécules chimiotactiques qui activent des molécules d'adhérence particulières sur les leucocytes : les intégrines.

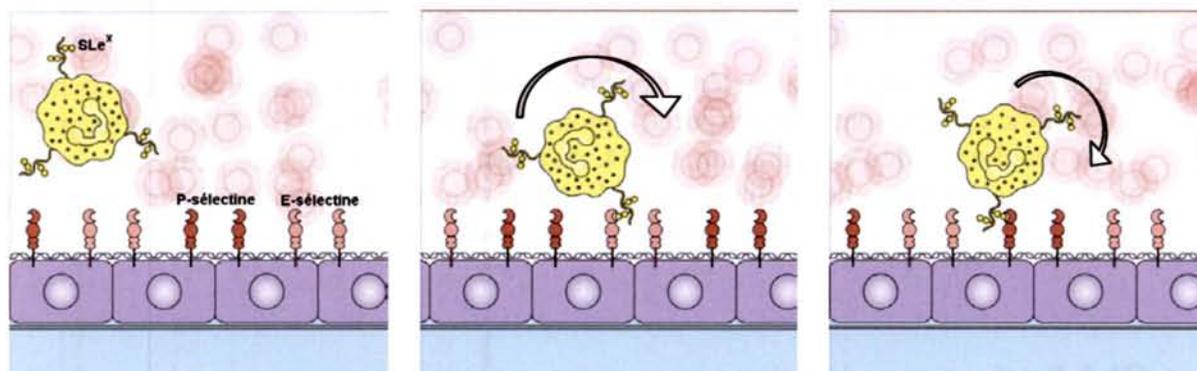


Figure 5 : Le Rolling. Les médiateurs de l'inflammation induisent la production de molécules d'adhérence (les E et P sélectines) à la surface des cellules endothéliales. Ces sélectines sont reconnues par des motifs sucrés (SLe^x) arborés par des protéines de surface des neutrophiles. Les liaisons sont de faibles intensités mais elles ralentissent la progression des neutrophiles. Les cellules commencent alors à rouler le long de l'endothélium vasculaire (Janeway *et al.*, 2001).

III-1-B-b-L'adhérence forte

Débutent alors une phase dépendante des $\beta 2$ -intégrines et notamment de la molécule CD11b/CD18. L'activation simultanée des neutrophiles par différents médiateurs tels que des chimioattractants (C5a, LTB4, fMLF), des cytokines (IL-8, GM-CSF, TNF α), par le PAF membranaire et par la E-sélectine entraîne, d'une part une augmentation rapide et transitoire de l'affinité des $\beta 2$ -intégrines constitutivement exprimées à la surface du neutrophiles, et d'autre part la translocation des molécules CD11b/CD18 et CD11c/CD18 des sites intracellulaires vers la membrane cellulaire.

Une fois activée, les intégrines peuvent se lier à d'autres molécules d'adhérence (de la famille des immunoglobulines) qui leur font face sur l'endothélium vasculaire (Elices *et al.*, 1990; De Fougerolles *et al.*, 1994). L'adhérence médiée par les $\beta 2$ -intégrines est de forte affinité, les neutrophiles sont alors fermement ancrés à la surface des vaisseaux sanguins (figure 6).

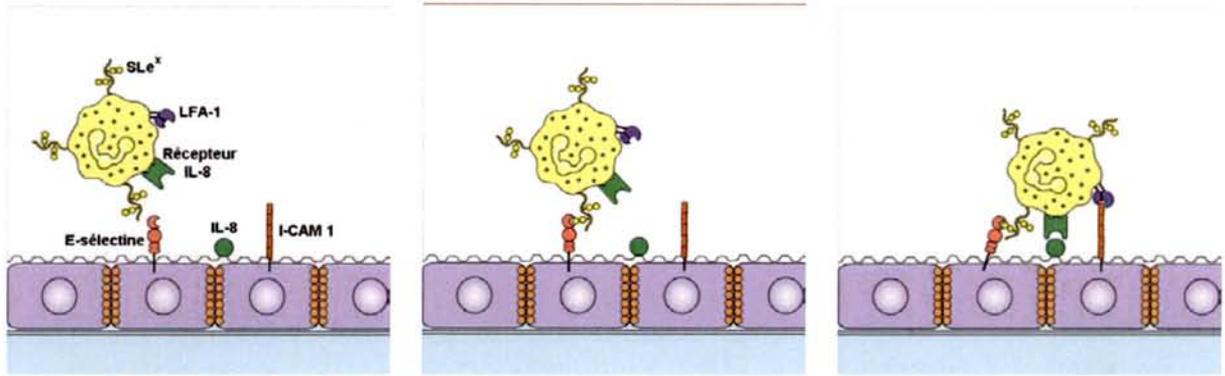


Figure 6 : L'activation. Les molécules de type intégrine situées à la surface des neutrophiles, comme LFA-1, sont activées par une molécule chimiotactique (IL-8) présentée par un protéoglycane de l'endothélium, CD44. Ainsi activée, les intégrines peuvent se lier aux molécules de surface endothéliales (ICAM-1). Les neutrophiles sont alors fermement attachés à l'endothélium (Janeway *et al.*, 2001).

III-1-B-c-La transmigration

Enfin, au cours de la dernière étape, le neutrophile change de forme, s'aplatit alors jusqu'à pouvoir se faufiler entre les cellules endothéliales (figure 7).

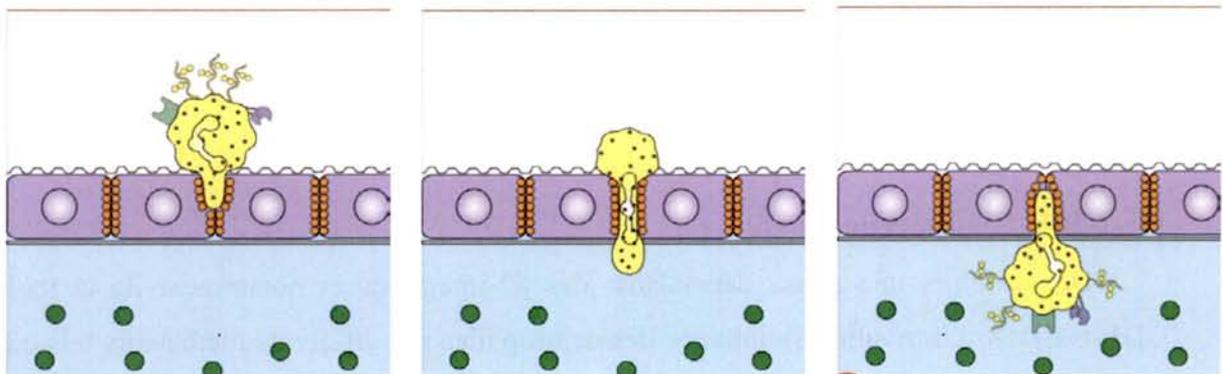


Figure 7 : La migration. La liaison des intégrines induit un remaniement du cytosquelette des neutrophiles. Ceux-ci s'aplatissent et se faufilent entre les cellules de la paroi vasculaire pour gagner le site infectieux (Janeway *et al.*, 2001).

La traversée de la paroi assurée par les intégrines, communément appelé transmigration ou extravasation, est sans retour. Les leucocytes sont piégés dans la matrice extracellulaire et ne peuvent plus revenir sur leur pas.

III-1-B-d-Le franchissement de l'endothélium au cours de la diapédèse

Il est maintenant bien établi que la diapédèse exige l'adhérence du neutrophile à la surface de l'endothélium vasculaire et que la migration à travers l'endothélium et la membrane

basale dépend de ces interactions spécifiques (Butcher, 1991). De plus, il semble que des molécules présentes à la jonction latérale des cellules endothéliales jouent un rôle critique dans la transmigration des neutrophiles cependant les mécanismes de ces événements restent indéterminés.

Parce que les dérivés oxygénés les plus toxiques ont une durée de vie éphémère, Weiss a proposé que ces réactifs jouent un rôle indirect dans la dégradation de la matrice extracellulaire, en inactivant les inhibiteurs de protéases plasmatiques telles que la α -1 anti-protéase (Weiss, 1989). Cependant les travaux de Campbell n'ont pas permis de mettre en évidence un tel rôle (Campbell et Campbell, 1988). Ces auteurs ont supposé qu'il existerait soit un système d'exclusion local des anti-protéases (dans la surface de contact entre le neutrophile et les cellules endothéliales) soit que la concentration de protéases exocytée serait plus importante que la concentration en anti-protéases plasmatiques.

De nombreuses recherches ont alors été menées sur l'importance des protéases dans le phénomène de dégradation de la matrice extracellulaire permettant la migration transendothéliale du neutrophile.

Certains travaux indiquent un possible rôle des protéases du neutrophile lors de la transmigration (Allport *et al.*, 2002). Cependant, comme pour les dérivés oxygénés, le rôle précis des protéases du neutrophile dans la migration à travers l'endothélium demeure controversé.

Les travaux de Smedley ont démontré que la destruction de l'endothélium dépendait en grande partie de l'élastase et ne semble impliquer ni les anions superoxydes, ni la catalase (Smedly *et al.*, 1986). Cependant chez des souris génétiquement modifiées, les recherches de Allport ont mis en évidence que ni l'élastase, ni la MMP-9 (gélatinase B) n'étaient essentielles lors de la migration transendothéliale du neutrophile. Bien que le rôle de ces protéases n'ait pas été clairement établi lors de la migration transendothéliale, il est impossible d'exclure totalement le rôle de ces protéases dans la migration, ni de reléguer leur importance à la dégradation des bactéries ou des corps étrangers (Allport *et al.*, 2002).

Les mécanismes de la migration transendothéliale des neutrophiles, *in vivo*, semblent nombreux et complexes. Ils impliqueraient non seulement le leucocyte mais également l'endothélium. En effet, lors de la migration transendothéliale, les travaux de Feng ont mis en évidence une diminution de l'épaisseur de l'endothélium suite à une stimulation fMLF. Ceux de Duncan et de Del Maschio ont montré l'importance des molécules PECAM-1 et des intégrines β 2 (Burg et Pillinger, 2001). La transmigration exigerait donc une participation active de l'endothélium, ce qui diminuerait l'importance du rôle des protéases des neutrophiles. Cette hypothèse est étayée par les recherches de Huber and Weiss (Huber et

Weiss, 1989). Leur recherche est basée sur une étude morphologique et biochimique de la membrane basale *in vitro*. Ils ont ainsi pu démontrer que cette dernière change au cours de la diapédèse du neutrophile. Les modifications morphologiques de la membrane sont transitoires et ne sont pas dues aux effets des enzymes. Ils ont également mis en évidence que l'endothélium et la membrane se réparent rapidement par un mécanisme qui dépend uniquement de l'endothélium.

III-1-B-e-Le franchissement de l'endothélium au cours de la diabase

Même si le rôle individuel de ces protéases n'a pu être clairement mis en évidence lors de la migration transendothéliale, de nombreux auteurs ont démontré leur importance lors de la mobilisation (Levesque *et al.*, 2002). La mobilisation, également appelée diabase ou libération médullaire, est la libération des cellules matures (HPC: cellules précurseur hématopoïétiques) à partir des réserves de la moelle osseuse vers le sang circulant. Cette libération se fait par un passage trans-endothélial des cellules à travers la paroi des sinusoides médullaires.

La libération de ces cellules est augmentée sous l'action de divers facteurs tels que le G-CSF, le SDF-1, l'IL-3, le SCF (ligand du récepteur c-kit), l'IL-8, le ligand Flt3, le ligand du récepteur c-mpl, le MIP-1 α ou la chemokine Gro- β (Levesque *et al.*, 2003).

Beaucoup d'équipes ont présumé que la conservation des HPC dans les organes hématopoïétiques est contrôlée par des interactions "adhésives" (Verfaillie, 1998; Vermeulen *et al.*, 1998; Frenette *et al.*, 1998). Les expériences menées chez des souris transgéniques ont notamment démontré l'importance de l'interaction entre $\alpha 4\beta 1$ et VCAM-1 dans la rétention des HPC dans les organes hématopoïétiques. $\alpha 4\beta 1$ ou VLA-4 (Very Late Antigen 4) est une $\beta 1$ -intégrine exprimée à la surface des HPC. Son récepteur est la molécule d'adhésion VCAM-1/CD106, constitutivement exprimé par les cellules stromales de la moelle osseuse (Arroyo *et al.*, 2000).

La mobilisation des HPC vers le sang serait due à la rupture de ces interactions "adhésives" entre $\alpha 4\beta 1$ et VCAM-1 suite au clivage protéolytique de VCAM-1 par des protéases telles que l'élastase, la cathepsine G ou le MMP-9, libérée par les neutrophiles de la moelle suite à la stimulation G-CSF (Heissig *et al.*, 2002; Pelus *et al.*, 2004). Parce que les travaux de Levesque ont montré que suite à une stimulation G-CSF, l'expression de VCAM-1 n'est réduite que dans la moelle osseuse mais pas dans la rate, ni dans les vaisseaux sanguins

(Levesque *et al.*, 2001), ces auteurs n'excluent pas la possibilité que d'autres protéases jouent un rôle dans cette mobilisation en clivant VCAM-1 ou d'autres molécules d'adhésion.

L'absence de clivage de VCAM-1 en dehors de la moelle osseuse peut être due à la présence de grande quantité de α 2-macroglobulin et d' α 1-antitrypsin dans le sang qui inhibent les protéases libérées par les neutrophiles tels que l'élastase et la cathepsine G. Inversement, dans la moelle, la concentration de ces inhibiteurs de protéases n'est pas suffisante pour empêcher le clivage VCAM-1 par la grande quantité d'enzyme active libérée par les neutrophiles (Levesque *et al.*, 2001).

L'équipe de Levesque ont également démontré que deux sérines protéases, l'élastase et la cathepsine G libérées par les neutrophiles de moelle osseuse suite à une stimulation G-CSF clivait le récepteur aux chemokines CXCR4, le récepteur c-kit à la surface des HPC mais aussi le ligand de CXCR4 (SDF-1/CXCL12) exprimé constitutivement à la surface des cellules stromales de la moelle osseuse (Levesque *et al.*, 2003).

La rupture des interactions "adhésives" entre VCAM-1 et VLA-4 ou entre CXCR4 et SDF-1 est suffisante pour induire la mobilisation des HPC. Levesque *et al.* supposent donc qu'une des étapes importantes de la mobilisation des HPC soit la protéolyse de VCAM-1, SDF-1, CXCR4, c-kit. Cet événement serait dû à la dégranulation de protéases par les neutrophiles de la moelle osseuse en réponse à l'administration de cytokines (Levesque *et al.*, 2003).

Le rôle du G-CSF dans la mobilisation reste néanmoins très discuté. Parce que les observations de Levesque (Levesque *et al.*, 2001; Levesque *et al.*, 2002) et Lord (Lord *et al.*, 1991) ont été réalisées après l'injection de G-CSF, d'autres auteurs ont émis l'hypothèse que les résultats obtenus étaient dus à une action indirecte du G-CSF (Betsuyaku *et al.*, 1999; Basu *et al.*, 2002). Cette hypothèse a été confirmée par les travaux de Xu *et al.* qui ont montré que les neutrophiles n'étaient pas directement activés par le G-CSF mais par des cytokines "intermédiaires" tels que le TNF α . Des souris déficientes en récepteur G-CSF restent néanmoins capables de mobiliser leurs neutrophiles suite à une stimulation par le G-CSF. Semerad proposent donc une activation indirecte de ces cellules (Semerad *et al.*, 2002). De multiples mécanismes pourraient donc être responsables de la mobilisation des HPC.

Ces souris transgéniques, déficientes en G-CSF ou en son récepteur, présentent une granulopoïèse défectueuse et une neutropénie médullaire et sanguine chronique. Les travaux de Basu ont ainsi pu démontrer que le G-CSF est un facteur important pour la survie de progéniteur myéloïde et des cellules de la lignée neutrophiles. Au cours de la granulopoïèse, le G-CSF aurait donc un double rôle: en absence d'infection, il agirait principalement comme

un facteur de survie ; lors d'une infection par un organisme pathogène, il agirait à la fois comme facteur de survie et comme stimulateur prolifératif (Basu *et al.*, 2002). Les protéases mises en jeu lors du clivage des molécules d'adhésion ont également été remises en cause : des souris déficientes en élastase et en cathepsine G restent capables de mobiliser leurs HPC suite à une stimulation par le G-CSF (Levesque *et al.*, 2004).

Bien que les mécanismes qui permettent la mobilisation des neutrophiles semblent bien définis, la diabase reste un phénomène incomplètement compris et très controversé.

III-1-B-f-Physiologie du déplacement

En présence d'un chimioattractant, le neutrophile subit des modifications de forme (polarisation). La cellule émet alors une large expansion cytoplasmique ou lamellipode à l'avant, et une protubérance postérieure ou uropode ; ainsi, le neutrophile acquiert une polarité cellulaire de type tête queue accompagnée d'une redistribution des différentes structures cytoplasmiques et migre vers une concentration croissante de chimioattractant.

Les récepteurs du chimioattractant sur les neutrophiles polarisés se trouvent principalement au niveau de la partie antérieure (frontale). Les récepteurs du C5a, du PAF, du LTB₄, des peptides N-formylés et des chemokines sont des récepteurs à 7 segments transmembranaires de la famille des récepteurs β -adrénergiques ; ils sont liés à une protéine G hétérotrimérique qui est un des premiers éléments de transduction du signal vers le système moteur du neutrophile (cf. § récepteurs des chimioattractants).

Le système moteur du neutrophile est constitué d'actine dont le degré de polymérisation conditionne la fluidité cellulaire. L'actine est l'une des protéines les plus abondantes des polynucléaires neutrophiles (5 - 10 % des protéines totales). Elle se trouve sous forme globulaire (actine G) dans la cellule au repos ; au cours d'une stimulation, elle s'assemble en longs filaments (actine F). Cet assemblage s'effectue en deux étapes : la nucléation (liaison de 3 à 4 monomères) puis l'élongation en longs filaments. L'une des extrémités s'accroît alors que l'autre subit un raccourcissement. Certaines protéines sont impliquées dans la croissance ou la rupture du filament : la profiline, l'acumentine et la gelsoline. Au niveau du lamellipode, d'autres protéines sont présentes comme la protéine liant l'actine et la myosine qui joue un rôle important dans la contractilité cellulaire. Les éléments moteurs du déplacement (actine F, myosine, protéine liant l'actine) sont localisés de façon prédominante au niveau frontal de la cellule. Durant la migration, les neutrophiles adhèrent au niveau de la région frontale, mais aussi du corps cellulaire et parfois de l'uropode (Gougerot-Pocidallo, 1997).

III-1-C-Facteurs inducteurs du déplacement

Les chimioattractants ou chimiotaxines sont des facteurs directement actifs sur la cellule, c'est-à-dire ne nécessitant pas de transformation préalable ; ils sont à différencier des chimiotaxinogènes qui n'agissent pas directement sur la cellule, mais induisent la formation de chimiotaxines par autotransformation ou par action sur une autre molécule. Les chimiotaxines et les chimiotaxinogènes sont de nature endogène ou exogène. La plupart des chimioattractants physiologiques sont chimiotactiques et chimiocinétiques positifs, ce qui induit un déplacement orienté et accéléré vers la cible. Il faut souligner un effet d'amplification lié à la migration des neutrophiles sur le site inflammatoire, les neutrophiles stimulés produisant eux-mêmes des chimioattractants. Les principaux chimioattractants sont répertoriés ci-après (Gougerot-Pocidalò, 1997).

Dérivés des protéines bactériennes:

Le 1^{er} peptide bactérien caractérisé dans le surnageant bactérien et démontré pour être chimioattractant sur les neutrophiles fut le tripeptide N-formyl-méthionyl-leucine-phénylalanine (fMLF). Son récepteur fut mis en évidence à la surface des neutrophiles. Cependant les mitochondries sont également capables de synthétiser de tels peptides. Ainsi, il est possible que les mitochondries des cellules lésées puissent attirer les neutrophiles sur le site inflammatoire en sécrétant ce type de peptide N-formylé (Ali *et al.*, 1997).

Protéines dérivées du complément:

Le C5a est formé par clivage de la molécule C5 soit après activation de la voie classique, par formation de complexe immun ou de la voie alterne du système du complément mais également par l'action des protéases des macrophages et/ou des tissus endommagés (Ali *et al.*, 1997).

Produits cellulaires après stimulation.

Le PAF.

Les dérivés de l'acide arachidonique tel que le LTB₄.

Les cytokines (chemokines) tels que l'IL-8, l'IL-6, le G-CSF, le TNF α ...

Toutes les molécules chimioattractantes précédemment citées induisent, à faibles doses, une réorganisation du cytosquelette, un changement de forme de la cellule, l'émission de pseudopodes et la chimiotaxie (Snyderman et Uhing, 1992). En induisant une réponse

chimiotactique du neutrophile, ces molécules induisent parallèlement une préactivation cellulaire (§ IV-2-a).

Il faut toutefois noter que tous les peptides bactériens n'induisent pas tous une préactivation cellulaire (§ IV-2-b). Ainsi, les sphingolipides de *bacteroides fragilis* sont capables d'induire des modifications morphologiques (dues au chimiotactisme et à la phagocytose), mais également d'inhiber l'activation de la NADPH-oxydase des neutrophiles (Kato M. *et al.*, 2002). Les bactéries, bien qu'ingérées par les neutrophiles, restent donc viables.

A fortes doses, beaucoup de ces chimioattractants ne se contentent plus d'attirer et de préactiver les neutrophiles. Elles sont alors capables d'induire des réponses bactéricides telles que la production d'anions superoxydes ou la dégranulation (Snyderman et Uhing, 1992).

III-2-La phagocytose

Arrivé au contact de sa cible le neutrophile va essayer de l'englober.

III-2-A-La reconnaissance et l'adhérence à la cible

Cette étape est sous la dépendance de nombreux facteurs extracellulaires et cellulaires. Cette adhérence est plus ou moins facilitée par des récepteurs présents à la surface des neutrophiles pour différentes structures, présentes sur la cible ou formant un lien entre la cible et le neutrophile.

La phagocytose dépend du contact direct du neutrophile avec des bactéries ou d'autres cibles. Ce contact est facilité par les opsonines dont il existe deux grandes catégories : les immunoglobulines et/ou les molécules C3b du système du complément (Vidarsson et van de Winkel, 1998).

- Les immunoglobulines : ce sont des opsonines thermostables et spécifiques. Les classes IgG1 et IgG3 semblent préférentiellement se fixer au neutrophile. Les immunoglobulines se fixent de façon spécifique sur des antigènes de surface des micro-organismes par leur site anticorps. La portion Fc de l'immunoglobuline est reconnue par les récepteurs Fc du neutrophile. Au repos, le neutrophile exprime les récepteurs Fc γ de type II (CD32) et III (CD16) qui lient les IgG1 et IgG3. Le Fc γ RI de forte affinité pour les IgG n'apparaît à la surface du neutrophile qu'après activation des β -2 intégrines ou suite à une stimulation par l'interféron γ . La fixation des particules opsonisées par une immunoglobuline sur son récepteur, déclenche une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à la

phosphorylation des régions cytoplasmiques de ce récepteur par des tyrosines kinases puis à l'activation du récepteur ITAM (immunoreceptor tyrosine based activation motif) et à la phagocytose. Cette cascade de signalisation conduit à la phosphorylation de Syk ainsi qu'à l'activation de la PI3-kinase, de rac et de la phospholipase C. Cette dernière active la PKC et induit la libération de calcium des réserves calciques intracellulaires. Syk est une tyrosine kinase intracellulaire essentielle pour la transduction des signaux du récepteur FcRII aboutissant à la phagocytose (Burg et Pillinger, 2001).

Les récepteurs FcγRIII ne possède pas de région transmembranaire pourtant l'activation de ce récepteur induit la polymérisation de l'actine, événement pré requis dans les phénomènes de phagocytose. D'autre part, l'activation de ce récepteur aboutit à la génération de dérivés oxygénés et à la libération des granules des neutrophiles (Nagaji, 1999; Boros *et al.*, 1991). Ce mécanisme aurait pour conséquence d'augmenter l'avidité et l'efficacité des récepteurs FCγRII (Burg et Pillinger, 2001).

- Les protéines du complément dérivées du C3 : elles proviennent de l'activation du complément, soit par la voie classique médiée par la liaison initiale d'anticorps IgG ou IgM sur la cible, soit par la voie alterne activée en particulier par les surfaces des micro-organismes ou par les endotoxines des bactéries gram négatif. Cette activation génère des fractions C3b, C3bi qui ont pour récepteurs CR1, CR3 (CD11b/CD18) et CR4.

Des Rho-GTPases différentes seraient impliquées dans les cascades de signalisation des récepteurs aux immunoglobulines et aux fragments C3b du complément. Caron and Hall ont ainsi mis en évidence que la phagocytose via les immunoglobulines dépendrait d'une rac-GTPase, mais qu'une rho-GTPase interviendrait dans la transmission des signaux issus de la fixation de C3b (Caron et Hall, 1998). De la même façon, ces auteurs ont montré que, contrairement au fragment C3b, la fixation des immunoglobulines sur leur récepteur générerait la production d'anions superoxydes, mettant ainsi en évidence des cascades de signalisation différentes de ces deux GTPases impliquées dans le phénomène de la phagocytose.

D'autres molécules peuvent également établir des liens entre le neutrophile et la cible microbienne, notamment certains facteurs sériques (α 1 globuline, Protéine C Réactive, α 2 glycoprotéine et fibronectine) et la tuftsine, un térapeptide d'origine splénique (Gougerot-Pocidallo, 1997).

III-2-B-L'englobement

Les travaux de Kaplan ont pu mettre en évidence une différence morphologique dans ce phénomène de phagocytose selon le mode d'opsonisation de la particule (Kaplan, 1977). En effet, lors d'une phagocytose médiée par la fixation par des immunoglobulines, des pseudopodes cellulaires englobent la particule, puis les extrémités des pseudopodes se rejoignent et la fusion membranaire enferme la particule dans une vacuole (figure 8).

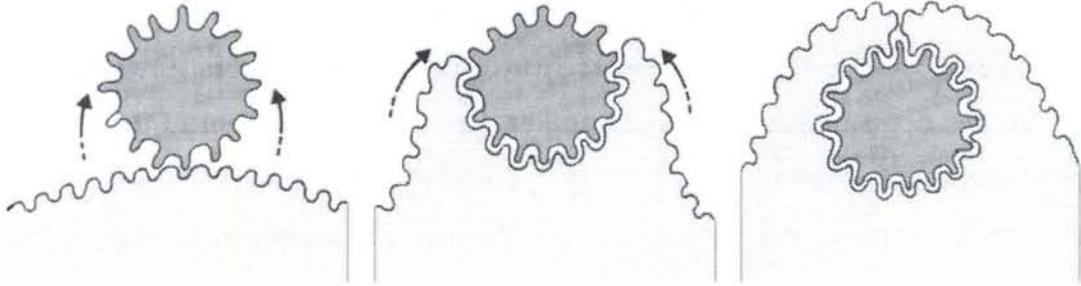


Figure 8 : Aspect morphologique de la phagocytose médiée par les immunoglobulines (Germain *et al.*, 1981a).

Lorsqu'il s'agit d'une opsonisation par la molécule C3b, il n'y a pas d'émission de pseudopodes cellulaires mais plutôt un enfoncement de la membrane (figure 9).

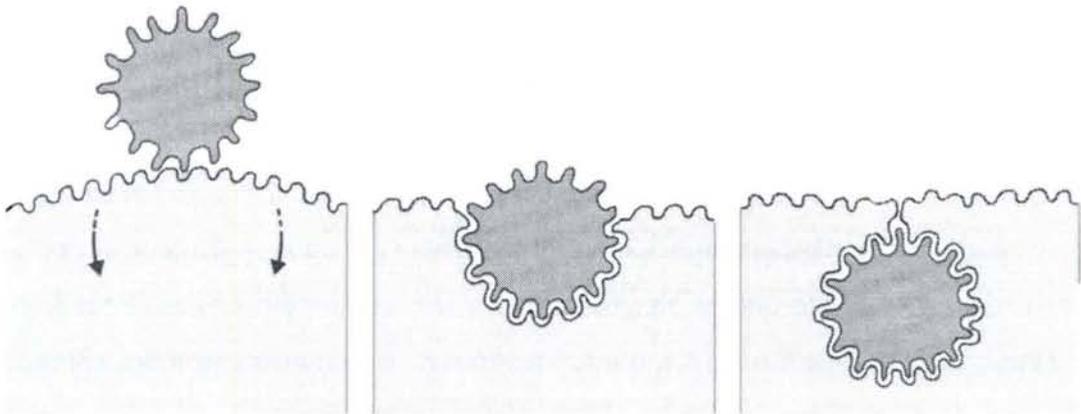


Figure 9 : Aspect morphologique de la phagocytose médiée par les molécules C3b du complément (Germain *et al.*, 1981a).

Ces modèles supposent que la particule soit complètement recouverte par les opsonines. Ce processus d'adhérence circonférentielle est qualifié de "Zipper model" ; schématiquement, il correspond au principe de fermeture éclair.

Si les particules possèdent des ligands sur une partie de leur surface seulement, ou bien en cas de particules trop volumineuses, la phagocytose complète n'est pas effectuée. Le neutrophile va déverser ses substances lytiques directement à la surface de la cible. La formation d'un phagosome n'est pas instantanée puisque les canaux le reliant à l'extérieur sont

observables en microscopie électronique et qu'une dégranulation à l'intérieur et à l'extérieur continue pendant un certain temps après la formation du phagosome (Gougerot-Pocidalò, 1997).

Le mécanisme de la phagocytose est similaire à celui de la chimiotaxie, puisqu'il implique également fluidité, extensibilité et contractilité du cytoplasme du polynucléaire. Les éléments cellulaires qui y participent sont donc les mêmes (actine, myosine, protéine liant l'actine...).

III-3-La bactéricidie

Le neutrophile possède deux mécanismes essentiels pour détruire les micro-organismes. Le premier mécanisme est lié à l'action d'un ensemble de peptides et de protéines bactéricides; le deuxième repose sur l'utilisation de l'oxygène du milieu sous l'influence d'un système enzymatique, la NADPH oxydase. Ces deux mécanismes ont lieu simultanément.

III-3-A-Le système bactéricide non dépendant de l'oxygène

Ce système fait intervenir deux grands mécanismes : d'une part le déversement du contenu granulaire, d'autre part, l'augmentation de l'expression de certaines protéines (comme les récepteurs et les intégrines) au niveau de la membrane cytoplasmique du neutrophile.

Les granules de neutrophiles contiennent une multitude de composants, mais seulement certains ont pu être isolés et caractérisés. Certains d'entre eux ont des activités antimicrobiennes directes, c'est-à-dire que les composants épurés sont capables de tuer les agents microbiens *in vitro*. Cependant, d'autres composants ne sont pas directement antimicrobiens, et il se peut que ceux-ci (tel que les hydrolases acides qui dégradent des hydrates de carbone, les protéines et les acides nucléiques) interviennent dans la digestion des organismes tués, plutôt que dans leur destruction. D'autres protéines granulaires ne possèdent pas de fonctions catalytiques mais sont extrêmement antimicrobiennes (par exemple les défensines, la BPI), tandis que d'autres encore peuvent être bactériostatiques (c'est-à-dire empêchent la croissance microbienne) (Edwards, 1994).

Les enzymes contenues dans les granules des neutrophiles sont la pierre angulaire de l'immunité innée. Ces granules sont capables de fusionner non seulement avec la membrane plasmique mais aussi la vacuole phagocytaire.

III-3-A-a-Les enzymes

Hydrolases acides, protéases, glycosidases, etc ..., contribuent à la dégradation des micro-organismes. Le fonctionnement des hydrolases acides est favorisé par la diminution du pH dû à la présence, dans la membrane, d'une ATPase à protons et des canaux H^+ . Citons brièvement quelques exemples :

La β -glucuronidase :

La β -glucuronidase est une hydrolase acide capable de déstabiliser la capsule bactérienne en dégradant l'acide hyaluronique qu'elle contient. C'est une macromolécule polysaccharidique appartenant à la famille des glycosaminoglycanes. Il résulte de la polymérisation d'unités de disaccharides formées par l'union d'acide glucuronique et de N-acétylglucosamine (Poly (β -acide-D-glucuronique $-[1\rightarrow3]-\beta$ -N-acétyl-D-glucosamine- $[1\rightarrow4]$).

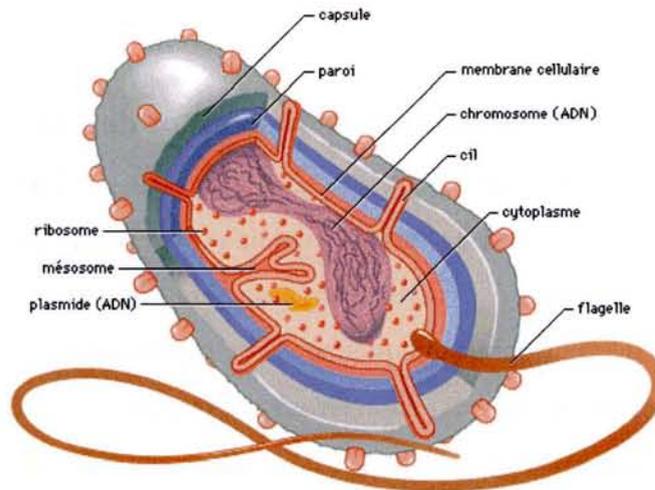


Figure 10: Structure d'une bactérie.

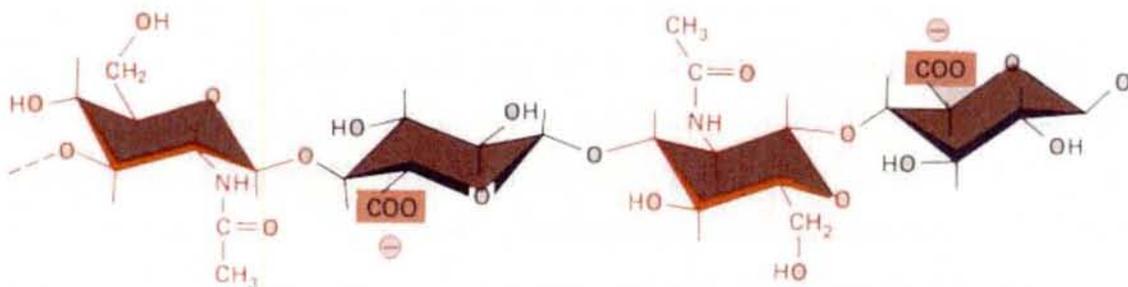


Figure 11: Motif disaccharidique de l'acide hyaluronique qui consiste en une très longue chaîne de plusieurs milliers de résidus glucidiques.

La PR3 (protéinase-3).

La protéinase 3 (PR3) est présente dans les granules primaires et dans les vésicules sécrétoires où elle représente un pool plus rapidement mobilisable. Associée à la membrane, elle est bioactive et peu sensible à l'inhibiteur de protéinase α -1 (Burg et Pillinger, 2001).

Coeshott *et al.* ont montré que cette protéine permettait le clivage sous forme soluble, donc l'activation, du TNF- α et IL-1 β dans des cellules THP-1 préalablement stimulées par des LPS (Coeshott *et al.*, 1999). La PR3 semblerait donc jouer un important rôle dans l'amplification de la réponse inflammatoire.

L'élastase.

L'élastase est une sérine - protéase efficace connue pour son potentiel destructeur chez les patients présentant une insuffisance en inhibiteur de la protéinase α -1. Cependant, son rôle physiologique dans la défense immunitaire a été récemment démontré. L'élastase est capable de dégrader une protéine externe de membrane qui est fortement conservée parmi les bactéries gram négatives : la protéine OmpA. Des souris transgéniques, déficientes en élastase, bien que capable de combattre les bactéries Gram positives, ne présentent aucune résistance contre les bactéries Gram négatives et meurent rapidement (Burg et Pillinger, 2001).

La PLA2 (phospholipase 2).

PLA2 est une protéine des granules primaires qui présente une activité bactéricide très efficace contre *Staphylococcus aureus*. Son activité anti-microbienne est due à la l'hydrolyse des phospholipides de la paroi bactérienne. Comme les défensines, elle agit en synergie avec la BPI (Burg et Pillinger, 2001).

Les MMP (métalloprotéase).

Les métalloprotéinases sont des enzymes dépendantes du calcium. Elles fonctionnent à pH neutre et sont libérées sous formes de proenzymes inactives. Le rôle de ces protéines dans la migration des neutrophiles à l'endothélium reste discuté (cf. § migration endothéliale).

La collagénase (MMP-8) montre une forte préférence pour le collagène à l'état natif, non dénaturé. Son activité enzymatique dépend de son oxydation par le HOCl ; in vitro, l'activité de la collagénase est inhibée par la catalase (qui décompose le H₂O₂) et par l'azide (qui inhibe l'activité de la myéloperoxydase, responsable de la production d'HOCl). Les neutrophiles de patients atteints de granulomatose chronique (CGD, cf. § Dysfonctionnement du neutrophile) sont incapables d'activer leur collagénase.

La gélatinase (MMP-9) dégrade les collagènes de types IV et V. L'activation de la pro-gélatinase se produit par des mécanismes oxydatifs et non oxydatifs, les neutrophiles de patients atteints de granulomatose chronique sont donc capables de produire une gélatinase fonctionnelle. Récemment, certains travaux ont démontré que la gélatinase été capable de tronquer plusieurs chemokines, notamment IL-8, les rendant ainsi biologiquement plus active (Burg et Pillinger, 2001).

III-3-A-b-Le lysozyme, ou muraminidase

Le lysozyme est une enzyme de 14,4 kDa capable d'hydrolyser la liaison β 1-4 glycosidique reliant la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuramique du muropeptide constituant des parois bactériennes. Le lysozyme à lui seul, n'a pas d'action bactéricide ; il amorce la dégradation de la paroi de l'agent pathogène et ouvre une brèche qui permet l'attaque par d'autres enzymes de dégradation ; il agirait ainsi en synergie avec les protéases et d'autres enzymes de dégradation.

III-3-A-c-Les protéines cationiques à action antibiotique

Les défensines.

Les défensines sont des peptides de 29 à 34 acides aminés constituant 5 à 7 % des protéines des neutrophiles et 30 à 50 % des protéines des granulations azurophiles. Ce sont donc les principaux composants des granules primaires ; elles peuvent former des canaux membranaires dans des bicouches lipidiques artificielles ainsi que dans des bactéries, modifiant leur perméabilité membranaire, les rendant ainsi plus sensible aux autres protéases. Les défensines sont présentes dans les vacuoles phagocytaires à une concentration d'approximativement 1 mg/ml mais leur activité cytotoxique est inversement liée à la concentration en sels produits par les différents microbes. Les défensines agissent en synergie avec la BPI contre les bactéries Gram négatives (Burg et Pillinger, 2001).

La BPI (protéine de perméabilisation de la membrane bactérienne).

La BPI est cytotoxique pour beaucoup de bactéries Gram négatives a des concentrations de l'ordre du nanomolaire. Cette protéine présente deux fonctions : d'une part, sa fixation perméabilise la membrane bactérienne ; d'autre part, elle permet le rapprochement de la bactérie et du neutrophile, facilitant ainsi sa phagocytose. Son domaine de N-terminal se lie

aux LPS de la membrane bactérienne alors que son extrémité C-terminal se fixe aux neutrophiles (Burg et Pillinger, 2001).

La lactoferrine

La lactoferrine est présente dans les granules secondaires (Borregaard *et al.*, 1993) et semble être également constitutivement exprimée sur la membrane des neutrophiles (Deriy *et al.*, 2000).

La lactoferrine exerce deux fonctions bactériostatiques :

- par sa capacité à séquestrer le fer, elle affecte le métabolisme, la croissance et le développement d'un éventail d'agents infectieux (Ali *et al.*, 1997; Weinberg ED, 1995).
- en endommageant la membrane externe des bactéries Gram négatives, elle induit la libération de LPS (Ellison, III et Giehl, 1991; Yamauchi *et al.*, 1993).

La structure de la lactoferrine a été établie par les études cristallographiques d'Anderson (Anderson *et al.*, 1989). Elle est constituée d'une chaîne simple de polypeptide repliée à ses extrémités en deux lobes contenant un site de fixation de Fe³⁺.

Sa concentration sanguine est normalement très basse (< 1 µg/ml) et provient probablement de la sécrétion des granules secondaires des neutrophiles, car sa concentration augmente au cours d'une infection ou d'une réaction inflammatoire. Paradoxalement, la lactoferrine peut se lier à l'endotoxine bactérienne (LPS), un médiateur important des réponses inflammatoires dans des infections bactériennes. Ainsi bloqués, les LPS ne rentreraient plus en interaction avec les cellules du système immunitaire et n'induiraient donc plus la sécrétion de cytokines inflammatoires. Peut-être faut-il donc considérer la lactoferrine comme un régulateur polyvalent (Brock, 2002).

III-3-B-La bactéricidie dépendante de l'oxygène : le complexe NADPH-oxydase

Lorsqu'ils sont stimulés, les neutrophiles produisent de façon extrêmement rapide des molécules dérivées de l'oxygène encore appelées formes réactives de l'oxygène (FRO) qui exercent une activité bactéricide et fongicide. Ce phénomène est appelé explosion oxydative du neutrophile. Il s'accompagne d'une augmentation de la consommation d'oxygène avec augmentation de la consommation de glucose et de son catabolisme par la voie des hexoses

monophosphates. Cette voie métabolique de l'oxygène est insensible au cyanure, et donc indépendante de la chaîne respiratoire (Gougerot-Pocidalò, 1997).

L'oxygène consommé par les neutrophiles est converti enzymatiquement en anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) par une réduction monovalente en utilisant le NADPH cellulaire provenant de la voie des hexoses monophosphates qui sert de donneur d'électrons. Cette réaction est catalysée par un complexe enzymatique appelé NADPH-oxydase.

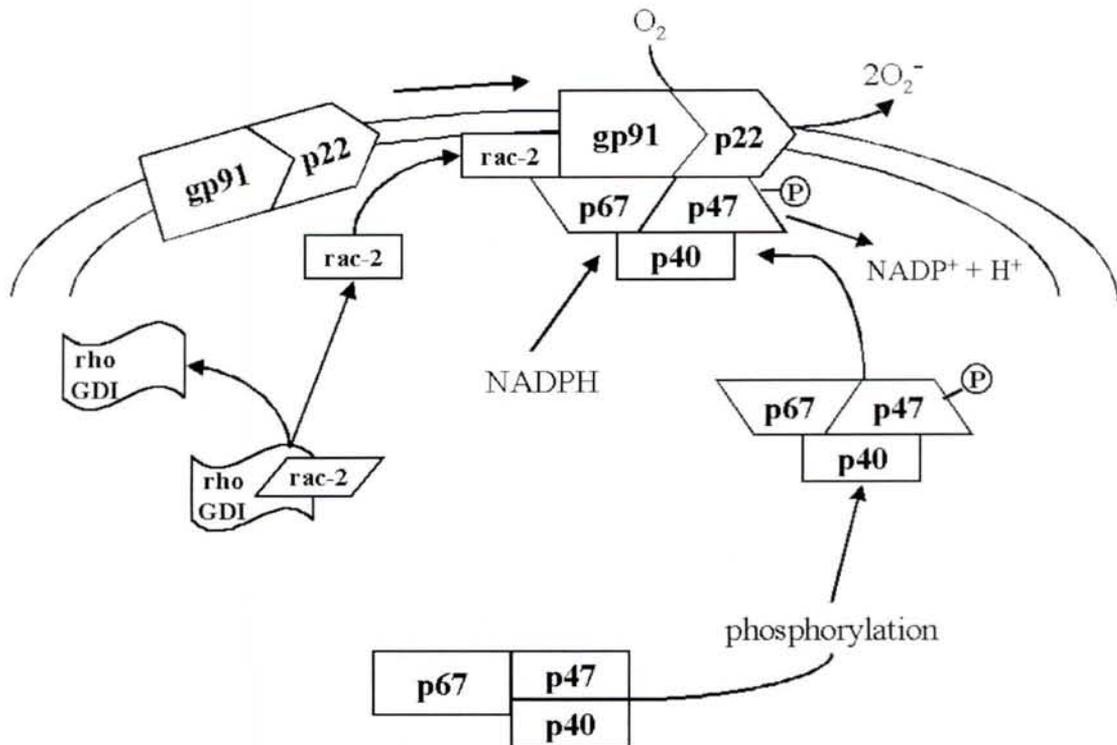


Figure 12 : La NADPH-oxydase. La stimulation de neutrophile par des facteurs chemoattractants et divers autres facteurs a comme conséquence la translocation des protéines cytoplasmiques vers la membrane plasmique et la formation du complexe NADPH-oxydase, qui transfère des électrons à partir de groupements NADPH vers l'O2 pour produire de l'O2·.

Dans la défense contre les micro-organismes, les neutrophiles produisent les métabolites potentiellement dangereux à partir de l'oxygène. Pour contrôler la production de ces métabolites, l'enzyme qui produit le dérivé $O_2^{\cdot-}$ (la NADPH-oxydase) est assemblée seulement lors de l'activation de ces cellules. Ce complexe est dû à l'association d'au moins six composants:

- les protéines $p22^{phox}$ et $gp91^{phox}$ sont les composants membranaires qui constituent le cytochrome b_{558} ;

- les protéines p47^{phox} (pour oxydase de phagocyte), p67^{phox} et p40^{phox}, sont présents sous forme de complexe cytosolique dans le neutrophile au repos comme rac-2.

La translocation des composants cytoplasmiques vers la membrane et leur association avec le cytochrome b₅₅₈ rendent le complexe fonctionnel ; le cytochrome transfère alors des électrons à partir de groupement NADPH, à l'O₂ pour créer l'O₂⁻: $2 O_2 + NADPH \rightarrow 2 O_2^- + NADP^+ H^+$.

L'utilisation des systèmes "hors cellule" a permis aux chercheurs d'étudier les différents rôles de ces protéines dans l'activation du complexe NADPH-oxydase pour déterminer non seulement quelles protéines sont importantes pour la production d'O₂⁻, mais également comment ces protéines interagissent entre elles.

Le cytochrome b₅₅₈

Le cytochrome b₅₅₈, ainsi nommé pour son pic en absorbance à 558 nm, est une flavohémoprotéine liée à la membrane. Approximativement 85% du cytochrome est présent dans les membranes des granules secondaires, tertiaires et des vésicules sécrétoires; le reste est localisé dans la membrane plasmique. Les composants p22^{phox} et gp91^{phox} du cytochrome agissent étroitement l'un sur l'autre et sont séparables uniquement par dénaturation. Les deux hèmes de gp91^{phox} stabilisent le dimère. Le groupe de flavine est important pour le transport d'électron vers O₂⁻ (Quinn et Gauss, 2004).

p47^{phox}

p47^{phox} est essentiel au fonctionnement de la NADPH-oxydase. Son rôle principal semble se situer au niveau de la fixation de p67^{phox} à la membrane. Après son activation, p47^{phox} interagit avec le cytosquelette et se déplace ensuite vers la membrane plasmique où il s'associe au cyt b558. La base de ces interactions est un domaine SH3 de p47^{phox} qui, dans la cellule de repos, interagit intramoléculairement au niveau de sa séquence riche en proline (PRR : prolin rich region). Suite à une stimulation; ce domaine SH3 devient accessible pour l'interaction avec la région riche en proline (PRR) de p22^{phox} (Burg et Pillinger, 2001).

Il est maintenant évident que la phosphorylation de p47^{phox} est indispensable pour sa translocation vers la membrane plasmique et pour la production d'anions superoxydes. Clark *et al.* ont démontré que la protéine kinase C (PKC) était responsable de la phosphorylation p47^{phox} et que l'inhibition de cette kinase ne permettait plus l'association de p47^{phox} avec le cytosquelette et la production d'anion superoxydes (Clark *et al.*, 1990).

De plus, Park *et al.* ont prouvé que l'addition de p47^{phox} phosphorylée dans un système sans cellule, comprenant uniquement des membranes de cellules et les composants p67^{phox}, rac-2, et GTP était suffisante pour activer le système NADPH-oxydase (Park *et al.*, 1997). p47^{phox} a beaucoup de sites de phosphorylation (8 ou 9), mais un seul (S379) semble nécessaire pour l'activation du complexe NADPH-oxydase (Faust *et al.*, 1995). Quelques kinases, par exemple, PKA et MAPK, phosphorylent avec succès le groupement p47^{phox} à des emplacements alternatifs mais n'ont aucun effet positif sur la production de superoxydes.

Pourtant, il semblerait qu'*in vitro*, la p47^{phox} ne soit pas indispensable à l'activation de la NADPH-oxydase (Freeman *et al.*, 1996). En effet, dans un système recombinant en absence de p47^{phox} mais avec des concentrations élevées en p67^{phox} et rac-2, la NADPH-oxydase est active. La p47^{phox} agit donc comme une protéine adaptatrice en augmentant de 50 à 100 fois la liaison des deux autres sous unités cytosoliques (p67^{phox} et p40^{phox}).

P67^{phox} et rac-2.

Alors que la phosphorylation de p47^{phox} a été beaucoup étudiée, peu de choses sont connues sur celle de p67^{phox}. Il a été ainsi démontré que p67^{phox} était phosphorylée par la PKC et qu'il reste complexé avec p47^{phox} après phosphorylation et que p67^{phox} possède un domaine d'activation indispensable pour l'activation du complexe NADPH-oxydase. En effet, des expériences de mutagenèse dirigée dans ce domaine (région 199-210) abrogent la production d'O₂⁻ mais pas la liaison de p67^{phox} à p47^{phox} et à rac. Ces auteurs ont donc émis l'hypothèse que ce domaine d'activation de p67^{phox} serait responsable du transfert des électrons au travers du cytochrome b₅₅₈ (Burg et Pillinger, 2001). Contrairement à la p47^{phox}, p67^{phox} est absolument nécessaire au complexe NADPH-oxydase (Babior, 1999).

Rac-2 est également une protéine importante dans l'activation de la NADPH-oxydase. La fixation de GTP active cette protéine, lui permettant ainsi de se détacher du complexe cytosolique rho-GDI/rac-2 et d'interagir avec p67^{phox}. La région N-terminal de p67^{phox} est constituée de 4 motifs répétés (quatre TPR, tétratricopeptide en hélice alpha). Ces structures semblent non seulement indispensables pour la fixation de rac-2 mais également pour l'activation du complexe NADPH-oxydase (Burg et Pillinger, 2001).

D'autre part, parce que la translocation de rac-2 n'est pas corrélée avec l'activité de la NADPH-oxydase, ceci laisserait supposer que Rac-2 ne serait impliqué que dans la stabilisation de p67^{phox}. Pourtant, une kinase (PAK : p21 activated kinase) se lie spécifiquement à rac sous forme activée (donc liée au GTP) et que cette kinase semble phosphoryler spécifiquement p47^{phox} (Burg et Pillinger, 2001). Cette constatation suggère

donc un possible autre rôle de rac-2 dans la fonction oxydative : un transporteur capable d'activer la PAK.

Récemment, Ambruso *et al.* ont mis en évidence un syndrome d'immunodéficience humain lié à la mutation de rac-2, rendant cette dernière non fonctionnelle (Ambruso *et al.*, 2000). Les neutrophiles de ce patient, incapables de répondre à un signal chimioattractant, ne présentaient plus ni d'activité NADPH-oxydase ni de sécrétion des granules primaires. Cette observation démontre l'importance de rac-2 dans de multiples domaines de la réponse microbicide du neutrophile et non pas seulement dans la régulation de l'activité de la NADPH-oxydase. Cette essentielle fonction de rac-2 dans la production d'anions superoxydes mais aussi dans l'exocytose des granules a également pu être démontrée chez des neutrophiles de souris déficientes pour cette protéine (Kim et Dinauer, 2001; Abdel-Latif *et al.*, 2004).

Métabolites oxydants :

L'anion superoxydes (O_2°) est le premier produit issu de l'activité de la NADPH-oxydase. Il va subir de nouvelles transformations enzymatiques et/ou non enzymatiques aboutissant à la production des Formes Réactives de l'Oxygène (FRO) radicalaires (OH°) ou non radicalaires. En plus des FRO, l'anion superoxyde est aussi directement ou indirectement à l'origine des oxydants chlorés qui comprennent l'acide hypochloreux (HOCl) produit par la myéloperoxydase et les Formes Réactives de l'Azote (FRN) notamment le peroxydinitrite ($ONOO^-$) formé à partir de l'anion superoxyde et du monoxyde d'azote, radical produit par la NO-synthase du neutrophile à partir d'arginine, d'oxygène et de NADPH. L'activité de la NO-synthase est induite suite à la stimulation des neutrophiles (Delbosc *et al.*, 2001).

L'anion superoxyde est rapidement converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par une enzyme, la superoxyde dismutase. Le H_2O_2 peut être ensuite réduit en O_2 et en eau par la catalase. Il peut également être dissocié en radical hydroxyle OH° et en ion hydroxyde OH^- par la réaction de Fenton en oxydant l'ion ferreux Fe^{2+} en ion ferrique Fe^{3+} . Le peroxyde d'hydrogène peut aussi être transformé en hypochlorite HOCl grâce à la myéloperoxydase libérée par les granules primaires des neutrophiles (Fontecave et Pierre, 1991).

Le radical hydroxyle (OH°) est le plus puissant oxydant à un électron connu. Il est surtout produit au cours de la réaction d'Haber Weiss dans un environnement contenant du fer. Tout comme l'acide hypochloreux, il est une source de lésions moléculaires et cellulaires importante (Delbosc *et al.*, 2001).

HOCl est capable d'oxyder diverses molécules dont les protéines, les lipides, les glucides et le matériel génétique. Cet hypochlorite peut réagir avec une amine primaire RNH_2 pour former une chloramine $RNHCl$ capable d'inactiver rapidement l' α -1 antiprotéinase, un

inhibiteur plasmatique des sérines protéinases, permettant ainsi l'action des protéases correspondantes et l'activation des proformes de la collagénase et de la gélatinase (Burg et Pillinger, 2001). HOCl peut également réagir avec les ions superoxydes et générer des ions hypochloreux. Cette réaction aboutit à la formation de chlore moléculaire (Hazen *et al.*, 1996), un gaz aussi bactéricide que l'eau oxygénée, l'anion superoxyde ou le monoxyde d'azote.

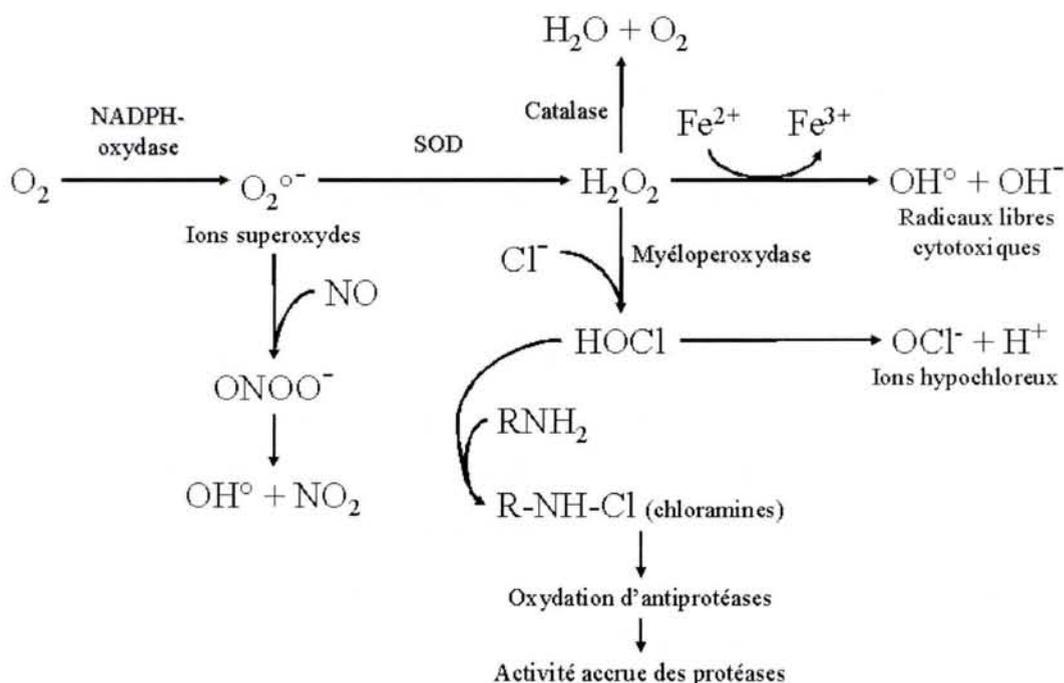


Figure 13 : Métabolismes des Formes réactives de l'oxygène (Delbosc *et al.*, 2001).

Finalement, la capacité des neutrophiles à produire de grandes quantités d'oxydants contribue au même titre que les protéines bactéricides granulaires à la capacité destructive de ces cellules.

Néanmoins, il est remarquable que, au contraire de la cellule endothéliale, la membrane des neutrophiles semble être protégée contre les effets locaux de ces composés fortement toxiques. Même s'il est communément admis que ces cellules se protègent des effets toxiques de ces substances oxydantes grâce à des systèmes antioxydants tels que la SOD, la catalase ou des composés réducteurs comme le glutathion, les mécanismes sous-jacents de cette vulnérabilité sélective méritent d'être étudiés plus intensément (Haslett *et al.*, 1989b).

D'autant plus que des travaux récents tendent à démontrer que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit dans l'espace extracellulaire agirait tel un second messenger entre les cellules avoisinantes (Reth, 2002).

Jusqu'ici, le seul rôle connu de l'explosion oxydative était de tuer les bactéries englouties grâce aux dérivés oxygénés produits. Cependant, de récentes études tendent à suggérer que les dérivés oxygénés seuls, seraient incapables de tuer les micro-organismes et que les protéases jouent un rôle plus important en tant qu'agents antibactériens (Reeves *et al.*, 2002; Ahluwalia *et al.*, 2004). Le pouvoir bactéricide des FRO se limiterait à être un substrat pour des enzymes tels que la MPO, à activer les protéases telles que la collagénase ou la gélatinase et à maintenir un pH permettant l'activité de ces protéases. Il est donc possible que l'explosion oxydative ne soit pas le principal dispositif d'élimination mais plutôt un mécanisme capable d'activer les macrophages et les lymphocytes voisins.

IV-Elimination du site d'infection ou résorption de l'inflammation

Afin d'exercer son activité anti-infectieuse tout en évitant la survenue de lésions tissulaires secondaires, le neutrophile doit être soumis à une régulation fine et précise. La résorption normale de l'inflammation nécessite l'arrêt de l'influx de polynucléaires au site infectieux mais aussi l'élimination des cellules immunitaires encore présentes sans induire de lésions tissulaires ni relancer la réponse inflammatoire (Wyllie *et al.*, 1980).

Pour la plupart des cellules de notre organisme, l'apoptose peut être la simple conséquence d'un retrait de stimulus adéquat, par exemple le tarissement d'un facteur de croissance ou la perte du récepteur correspondant. Il s'ensuivra une mort passive "par négligence". Mais il existe également un second mécanisme régulateur actif, induit par une activation optimale, l'AICD (activation induced cell death). Ces 2 formes d'apoptose, active et passive, sont sous tendues par des mécanismes moléculaires distincts. Dans l'AICD, c'est l'engagement de récepteurs membranaires tels que Fas qui déclenche la machinerie apoptotique préformée. Dans la mort par négligence, l'événement central se situe au niveau de la mitochondrie et se trouve contrôlé par les protéines de la famille Bcl-2.

Ces deux formes d'apoptose ont été mises en évidence dans de nombreux types cellulaires, y compris dans les neutrophiles (Akgul et Edwards, 2003).

IV-1-Apoptose, mort cellulaire programmée

La morphogénèse, la croissance et l'homéostasie d'un organisme complexe sont régies par un équilibre subtil entre trois processus fondamentaux que sont la division des cellules, leur différenciation et leur élimination.

D'origine grecque le terme "apoptose" du mot "apoptein" dont l'étymologie évoque la chute des feuilles désigne une mort douce et inéluctable. Il s'agit d'une forme de mort cellulaire parfaitement organisée à laquelle la cellule elle-même prend part en activant, sous contrôle génétique, des mécanismes conduisant à sa propre destruction. La mort cellulaire physiologique, la mort cellulaire programmée et le suicide cellulaire sont les autres terminologies attribuées à l'apoptose. Elle s'oppose à la mort nécrotique qui suppose une destruction d'origine exogène produisant une rupture membranaire et la dispersion du contenu cellulaire dans l'environnement (exemple d'une agression cellulaire par des toxines microbiennes générant des trous dans la membrane). Ce suicide cellulaire est sous tendu par un programme génétique que la cellule utilisera par défaut à moins de recevoir les signaux appropriés de survie issus de son environnement.

Toutefois, si ce processus fondamentalement programmé peut apparaître spontanément ou en réponse à des stimuli physiologiques, il peut aussi être la conséquence d'une agression ou d'un dérèglement accidentel de l'homéostasie cellulaire. Un nombre de plus en plus important de pathologies invalidantes, telle que la maladie d'Alzheimer, le SIDA mais aussi les accidents hypoxiques/ischémiques impliquent une stimulation inappropriée de l'apoptose. En contre partie, une inactivation des processus apoptotiques a pour conséquence une prolifération tissulaire incontrôlée ou la survenue de lésions tissulaires lors de réponse immunitaire non maîtrisée (Thompson, 1995).

IV-1-A-Distinction entre Nécrose et Apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire active, requérant de l'énergie, qu'on oppose habituellement à la mort cellulaire par nécrose (mort accidentelle) sur des critères morphologiques et biochimiques (Kerr *et al.*, 1972). Cependant, les deux types de processus mortel, apoptose (mort cellulaire programmée) et nécrose (mort cellulaire accidentelle) peuvent se produire simultanément dans des tissus ou des cultures de cellules exposées à un même stimulus. Souvent, l'intensité du stimulus initial détermine le choix entre apoptose et nécrose, ce qui rend la frontière entre ces deux types de mort cellulaire parfois difficile à concevoir.

De ce fait, tandis que des événements précoces peuvent être communs aux deux types de mort cellulaire, un système de contrôle doit être nécessaire pour engager la cellule dans l'une ou l'autre voie. Polla *et al.* suggèrent que le choix cellulaire entre les deux types de mort cellulaire se ferait au niveau mitochondrial (Polla *et al.*, 1998). Les auteurs suggèrent que la mitochondrie pourrait être le carrefour décisionnel entre nécrose et apoptose et joueraient de

ce fait un rôle déterminant dans les processus inflammatoires, dans la mesure où le type de mort cellulaire en détermine l'évolution. L'inflammation est amplifiée par la nécrose, elle est limitée par l'apoptose car si la nécrose ressemble à une explosion, l'apoptose s'apparente plutôt à une implosion.

IV-1-A-a-Caractéristiques de la Nécrose

La nécrose est une mort cellulaire pathologique qui intervient dans les cas extrêmes d'agression cellulaire. Il s'agit d'un processus passif et accidentel qui ne nécessite pas la participation active de la cellule. Elle est causée par des événements traumatiques et/ou toxiques et se distingue de l'apoptose par les modifications structurales qu'elle engendre ainsi que par l'absence de composante génétique.

Les caractéristiques morphologiques de la nécrose impliquent, en raison de la perte de régulation des mouvements ioniques, la dilatation du réticulum endoplasmique, l'augmentation du volume mitochondrial et le gonflement cellulaire. Ceci conduit à la rupture osmotique de la membrane, avec lyse cellulaire et libération du contenu de la cellule présentant des propriétés toxiques pour les cellules voisines. Il se produit une fragmentation aléatoire du noyau puis, le fantôme cellulaire rétrécit et sa densité augmente (Kerr *et al.*, 1974).

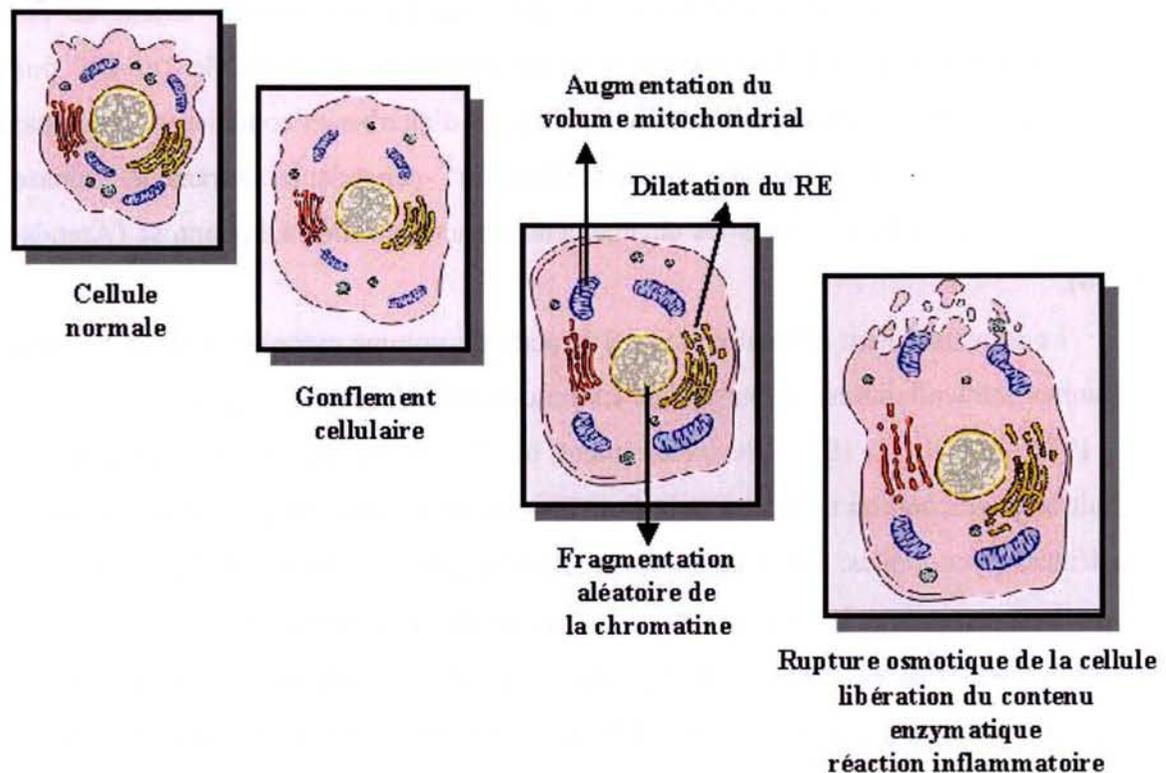


Figure 14 : Caractéristiques morphologiques de la nécrose.

IV-1-A-b-Caractéristiques morphologiques de l'apoptose

Dans l'apoptose, et contrairement à la nécrose, il n'y a pas de gonflement d'organites, ni de réaction inflammatoire. Les mécanismes impliquent une série d'étapes morphologiques cellulaires distinctes.

La mort apoptotique est constituée d'un ensemble de processus de digestions internes affectant d'abord le cytoplasme, la mitochondrie puis le noyau. En premier lieu, la cellule affectée perd tout contact avec son environnement immédiat. La dégradation du cytosquelette fait perdre à la cellule sa polarité, la détache de ses voisines, l'arrondit et diminue son volume. Bien que rapidement altérée dans sa composition, la membrane cellulaire est conservée intacte tout au long du processus. De nombreuses protubérances apparaissent à sa surface conférant un aspect "bouillonnant" à l'observation microscopique.

A un stade ultérieur, irréversible, le noyau va être également atteint. Il devient pycnotique en particulier du fait de la dégradation des lamines, protéines de la face interne de la membrane nucléaire. La chromatine nucléaire se condense et est attaquée par diverses endonucléases ce qui aboutit à une fragmentation de l'ADN nucléaire qui constitue un critère, bien que non absolu, de reconnaissance de l'apoptose dans différents modèles (MacManus *et al.*, 1993). Le clivage de l'ADN double brin est observé au niveau des régions "linker" entre les nucléosomes. Il génère de grands fragments d'ADN ou des multiples des unités nucléosomiques (fragments d'ADN de 200 paires de bases enroulées autour de protéines histones et non-histones). En conséquence, des fragments multiples de 180-200 paires de bases peuvent être séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et conduisent à une image dite "en échelle". Les enzymes comme l'endonucléase Ca^{2+} -dépendante, la transglutaminase et les protéases sont impliquées dans les changements structuraux liés à l'apoptose (Arends *et al.*, 1990).

Le rétrécissement cellulaire est dû à la perte du volume cytoplasmique et la plupart des organites intracellulaires, en particulier les mitochondries, restent longtemps intacts (Kerr *et al.*, 1972; Kerr *et al.*, 1974). Secondairement, on observe une rétraction de la membrane qui induit la fragmentation cellulaire et la formation de corps apoptotiques contenant des résidus nucléaires pycnotiques. Le phénomène se signale, par l'exposition de lipides et de sucres normalement situés à la face interne, à l'attention des phagocytes qui endocytent avec une efficacité remarquable soit la cellule entière soit des fragments de celle-ci mais restant toujours limités par une membrane. L'intégrité membranaire, la rapidité de l'élimination cellulaire font que l'apoptose, même massive, n'induit aucune réaction inflammatoire contrairement à ce qui peut se produire dans un phénomène nécrotique, où les différents

compartiments cellulaires se rompant, déversent leur contenu enzymatique au sein même des tissus.

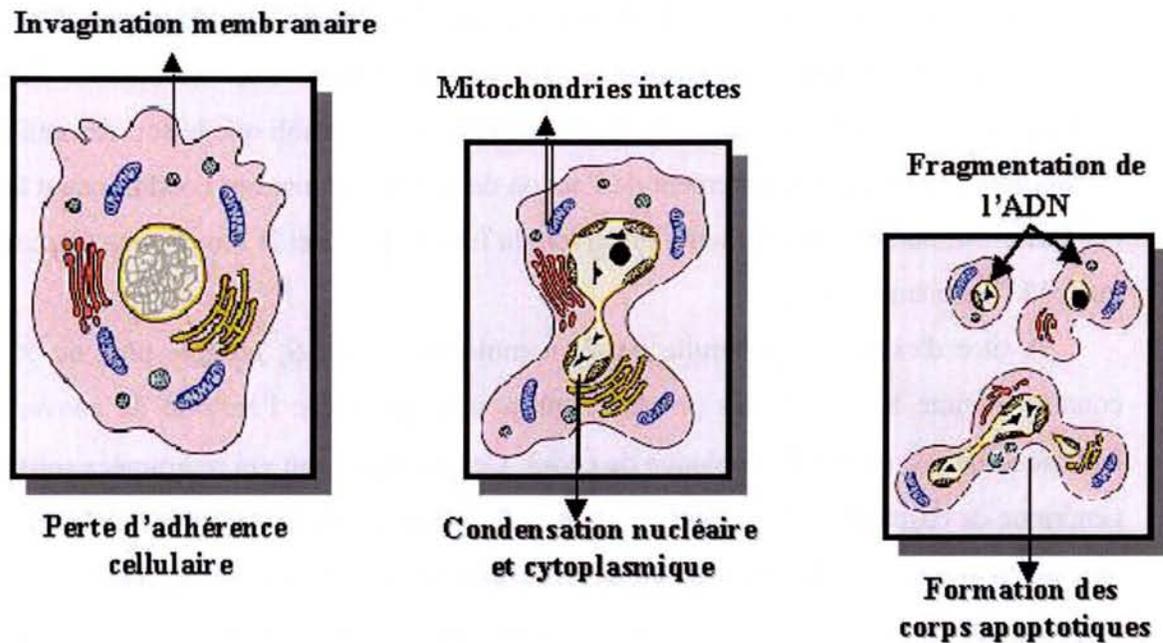


Figure 15 : Caractéristiques morphologiques de l'apoptose.

IV-1-A-c-Identification de gènes fondamentaux impliqués dans l'apoptose.

Grâce à l'étude de l'embryogenèse d'un petit nématode, *Caenorhabditis elegans*, ont été identifiés des gènes fondamentaux dont l'expression gouverne les différentes étapes de l'apoptose. Au cours de la maturation de *C. elegans*, 131 cellules parmi les 1090 produites au cours de la neurogenèse disparaissent par un processus ayant toutes les caractéristiques de l'apoptose et en relation avec l'intervention d'au moins 14 gènes identifiés (Labouesse, 1994). Parmi ceux-ci, trois gènes clés sont impliqués dans la survie (*ced-9*) ou la mort (*ced-3* et *ced-4*) des cellules (Horvitz *et al.*, 1982). C'est la balance d'expression des différents gènes par la cellule à un moment donné de sa vie qui va orienter son devenir.

Le gène *ced-4* module l'activation de *ced-3* à qui revient le rôle ultime dans la mort programmée chez *C. elegans*, par protéolyse des composants cellulaires. Une mutation entraînant une perte d'activité de l'un des deux gènes bloque la mort cellulaire et entraîne la survie des 1090 cellules, ce qui montre que la fonction des deux gènes est requise pour l'accomplissement de la mort cellulaire programmée (Labouesse, 1994). L'expression de *ced-9* est associée à la survie cellulaire et dans les embryons mutants pour ce gène, toutes les cellules meurent. Toutefois, il semble que c'est en l'absence de gènes de survie que les gènes "tueurs" vont être capables d'interrompre la vie d'une cellule.

IV-1-B-Modélisation de l'apoptose

C'est l'existence de fortes homologies structurales et fonctionnelles entre les gènes de *C. elegans* et des gènes de mammifères, ainsi que les mécanismes fondamentaux de l'apoptose hautement conservés au cours de l'évolution et parmi les espèces, qui ont permis d'établir une modélisation des processus apoptotiques. Le schéma général s'est néanmoins enrichi de multiples gènes chez les mammifères. Il est maintenant bien établi que le sort des cellules des mammifères dépend très étroitement de l'action de certaines protéines conditionnant la survie cellulaire. Au nombre de celles-ci s'inscrivent la famille Bcl-2 et la famille des caspases ainsi que p53 (Feldmann, 1999).

A titre d'exemple, la famille bcl-2, homologue de ced-9, compte plus de 15 gènes connus, comme la famille des protéases qui a pour prototype l'enzyme de conversion de l'interleukine 1- β (ICE), l'homologue de ced-3. Ces protéases ont été regroupées sous le nom générique de caspases. "c" pour refléter le mécanisme de protéase à cystéine et "aspase" pour rappeler leur capacité de cliver après un acide aspartique (Mignon *et al.*, 1998). Toutes les caspases ont des sites catalytiques voisins et ces enzymes présentent la propriété de s'auto activer ou d'activer d'autres caspases. Ces particularités suggèrent l'existence d'un fonctionnement en cascade des caspases aboutissant au développement des changements apoptotiques dans le noyau cellulaire. De multiples membres de la famille des caspases pourraient participer au processus d'apoptose déclenché par différents stimuli dans divers types cellulaires.

De plus, de nombreux signaux, intra- ou extracellulaires, comme la privation en facteur de croissance, le stress oxydant, la protéine p53, le TNF α ou encore le ligand physiologique du récepteur Fas, déclenchent les processus apoptotiques. En dépit de la diversité de ces multiples signaux inducteurs, les cellules engagées dans l'apoptose présentent des modifications morphologiques et biochimiques identiques, suggérant l'existence d'un tronc commun à toutes les voies apoptotiques et tous les types cellulaires (Thompson, 1995).

Actuellement, une schématisation en trois phases des processus apoptotiques peut être résumée ainsi : la signalisation qui peut se faire par des voies afférentes à la cellule très diverses, la régulation ou phase de décision confrontant des mécanismes pro et anti-apoptotiques, enfin, la dégradation ou phase d'exécution commune à toutes les formes d'apoptose.

IV-1-B-a-Phase de signalisation

Il existe de multiples voies d'initialisation de l'apoptose regroupées en deux catégories : la signalisation extracellulaire et la signalisation intracellulaire.

IV-1-B-a- α -La signalisation extracellulaire

L'apoptose peut être considérée comme une réponse physiologique à l'influence environnementale véhiculée par des signaux de transduction à la surface cellulaire et activant un programme génétique pour un état anti-prolifératif (Steinhagen, 2004). Deux cas de figure peuvent être rencontrés pour finalement conduire à l'apoptose. Dans la première situation, la mort cellulaire résulte d'un défaut de signaux de survie tel que le tarissement d'une hormone, d'un facteur de croissance ou d'un contact intercellulaire. Tandis que dans la seconde situation elle est liée à la présence de signaux déclencheurs de l'apoptose tels la sollicitation de récepteurs membranaires possédant des "domaines de mort" (tel que Fas ou TNF-R) (Akgul et Edwards, 2003) ou nucléaires (glucocorticoïdes) (Cameron et Feuer, 2001).

Les molécules réceptrices du signal de mise à mort sont les membres de la famille des récepteurs au TNF (TNFRs), Fas (Apo-1/D95), DR3 (Apo-3/TRAMP), DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2) et DR6 (Akgul et Edwards, 2003). Bien que les deux récepteurs au TNF, TNFR1 et TNFR2, ont la capacité d'induire le message apoptotique et l'activation de NF- κ B, c'est le TNFR1 qui est dans la majorité des cas responsable de la transduction de ces signaux (Itoh *et al.*, 1991). Le TNF-R1 et Fas possèdent une séquence intracytoplasmique très homologue nécessaire et suffisante pour la transmission du signal apoptotique, dénommé de ce fait domaine de mort cellulaire ou "death domain" (Nagata, 1997; Ashkenazi et Dixit, 1998).

Fas est exprimé à des niveaux variables sur de très nombreuses cellules (thymus, foie, cœur, poumons, reins, ovaires). Le ligand capable d'activer Fas, FasL n'est exprimé que par les lymphocytes T CD8 activés ainsi que les lymphocytes NK. FasL se présente sous la forme d'homotrimères membranaires capables donc de "cross linker" plusieurs récepteurs Fas. La liaison de FasL au récepteur Fas/APO1 induit l'association des "death domain" (DED) intracytoplasmiques de Fas avec ceux d'une molécule intracytoplasmique, FADD (Fas associated death domain). FADD interagit ensuite avec la procaspase-8 par l'intermédiaire de leurs "death domains" respectifs. L'ensemble Fas/FADD/pro-caspase-8 forme alors un complexe de protéine appelé DISC (death inducing signalling complex) qui induit le déclenchement de la machinerie apoptotique via l'activation des caspases effectrices -3, -6 et -7 (Akgul et Edwards, 2003). Des expériences menées sur des souris transgéniques déficientes

en protéines FADD, ont révélées que FADD est l'un des composants essentiels de la machinerie apoptotique induite par FasL et TNF- α (Ashkenazi et Dixit, 1998).

Dans le cas du récepteur au TNF, une protéine similaire contenant un domaine de mort cellulaire (TRADD, pour TNFR1-associated death domain protein) se lie au TNFR1, puis se lie à FADD et induit par la formation du complexe DISC l'activation de la pro-caspase-8 (Akgul et Edwards, 2003). De plus, TNFR1 possède une autre voie de transduction du signal apoptotique via la protéine RIP (receptor binding protein) qui est une sérine/thréonine kinase qui interagit avec TRADD. La protéine RIP se lie ensuite à la forme précurseur de la Caspase-2 dont elle induit l'activation, par l'intermédiaire de la protéine RAIDD qui contient un DED et un domaine de rerutement des caspases (CARD) (Thome *et al.*, 1998).

L'activation de ces caspases constitue l'étape ultime de la transduction du signal apoptotique. Elle a lieu durant la phase effectrice de l'apoptose et sera développée ultérieurement.

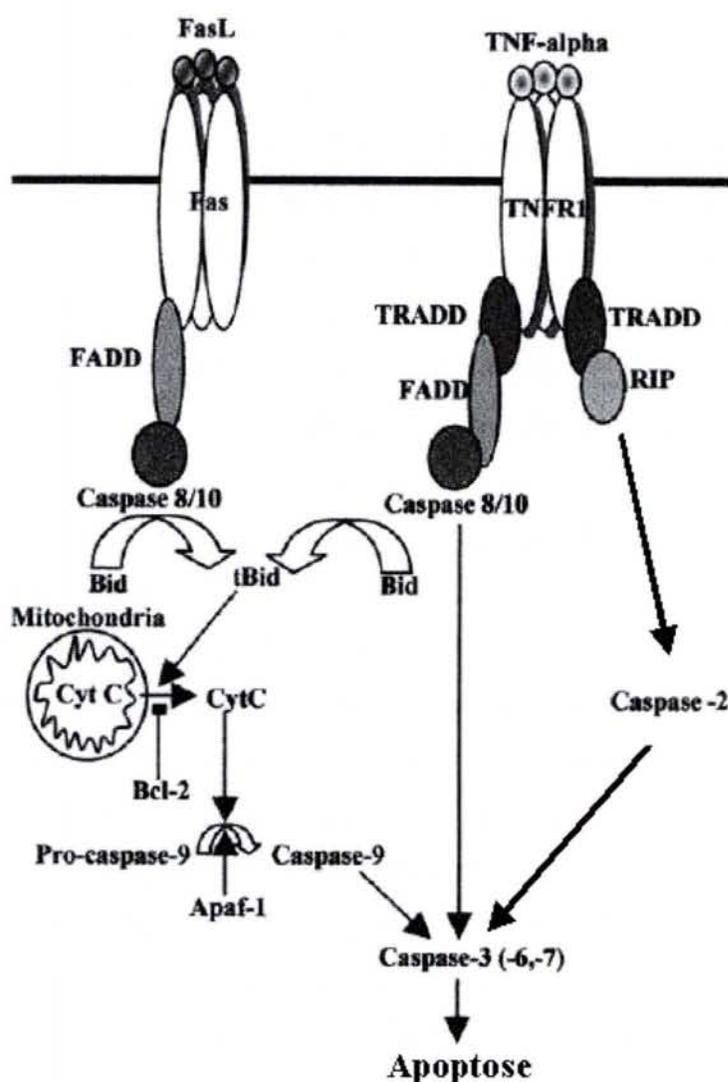


Figure 16 : Voie de mort cellulaire Fas/TNF (Akgul et Edwards, 2003).

IV-1-B-a-β-La signalisation intracellulaire

L'initialisation de la machinerie apoptotique peut également être intracellulaire. Par exemple, une accumulation pathologique de calcium dans le cytoplasme, qu'elle soit d'origine extracellulaire ou intracellulaire, constitue un événement critique pour l'induction des facteurs de transcription directement impliqués dans l'apoptose. Le calcium stimule directement des endonucléases qui sont responsables de dommages structuraux nucléaires et de la dégradation de protéines nécessaires à l'architecture cellulaire. Les enzymes membranaires et cytosoliques dont certaines sont calcium dépendantes, comme la PKC et la CaMCKII (Calcium-calmodulin-dependent Protein Kinase II), sont impliquées dans les phosphorylations protéiques et ont une grande importance dans la transduction des signaux apoptotiques (Carafoli, 2004).

Les ions Ca^{2+} activent également la calmoduline et par voie de conséquence, les processus de phosphorylation qui lui sont associés et les enzymes calmoduline dépendantes (Shohat *et al.*, 2002). Par la perte du potentiel mitochondrial transmembranaire, les mitochondries accélèrent la mort cellulaire en libérant également des ions calcium et des radicaux libres (FRO) dans la cellule.

Les facteurs de transcription tels que Fos, Jun, c-Myc et p53 seraient également impliqués dans l'induction de l'apoptose (Adamczyk *et al.*, 1998). Alors que l'expression des proto-oncogènes c-fos et c-jun n'est stimulée qu'après induction de l'apoptose, celle de c-myc dépend des signaux de prolifération. Ainsi, c-myc a un rôle de régulateur positif de la progression du cycle cellulaire en présence de ces signaux ; dans le cas contraire, il serait un facteur négatif pour la survie des cellules (Evan et Littlewood, 1993).

Lors de dommages survenant au niveau de l'ADN, la protéine p53 est surexprimée afin de permettre l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN mais cette surexpression participe également à l'induction de l'apoptose. En effet, p53 agit comme un activateur transcriptionnel sur de nombreux gènes comme son propre gène ou bax et est aussi capable de réprimer la transcription de gènes tels que Bcl-2 ou c-myc (Oren, 2003).

IV-1-B-b-Phase de contrôle

IV-1-B-b-α-Mécanismes moléculaires de la régulation de l'apoptose

Les signaux de mort cellulaire aboutissent à un premier point de contrôle intracellulaire de l'apoptose assuré par les protéines de la famille Bcl-2. Cette grande famille est composée de molécules à effets anti-apoptotiques comme Bcl2 et Bcl-xL et pro-apoptotiques tels que Bax, Bad et Bid (Antonsson et Martinou, 2000).

Protéines anti-apoptotiques

Bcl-2 et Bcl-xL sont des protéines membranaires du réticulum endoplasmique, du noyau et de la membrane externe mitochondriale. Ces molécules peuvent se dimériser en homodimères ou hétérodimères, par exemple Bcl2-Bax. Tant que prédominent dans la cellule les homodimères anti-apoptotiques ou les hétérodimères contenant un membre anti-apoptotique, le résultat net est la résistance à l'apoptose. Au contraire, si les dimères, par exemple Bax-Bax sont prédominants, la voie apoptotique sera ouverte. En formant des hétérodimères avec les protéines pro-apoptotiques tels que Bax, Bcl-2 et Bcl-xL inhiberaient l'apoptose en contrôlant ainsi d'une part l'ouverture des mégacanaux et la fuite des produits tels que le cytochrome c, d'autre part, lorsque celle ci se produit, en piégeant le complexe APAF-1/Caspase 9 sur la paroi mitochondriale, empêchant ainsi l'activation de la protéase. Un rôle prépondérant a été attribué à l'action inhibitrice de Bcl-2 sur la libération par les mitochondries des APAFs (cytochrome c, Apaf-1 et caspase 9), Bcl-2/Bcl-xL inhibant l'apoptose par la séquestration de ces protéines au niveau de la membrane mitochondriale (Yin, 2000).

Différents travaux suggèrent que l'hétérodimère Bax/Bcl-2 serait un régulateur négatif de la survie cellulaire et que les fonctions de survie et de contrôle de la prolifération ne dépendent pas seulement de l'hétérodimérisation de Bcl-2 (O'Reilly *et al.*, 1996). En effet, Bcl-2 est capable de moduler le transport de p53 du cytoplasme au noyau en coopération avec c-myc et empêche la répression transcriptionnelle de p53 (Froesch *et al.*, 1999). Ceci suggère que Bcl-2 pourrait inhiber l'apoptose en empêchant certains facteurs transcriptionnels d'agir (Miyashita *et al.*, 1997). De plus, Bcl-2 peut inhiber l'activation de différentes caspases responsables de la phase effectrice de l'apoptose, comme ICE, CPP32, MCH2 ou Nedd2. La surexpression de Bcl-2 ne perturbe pas l'expression de ces protéines mais s'oppose à l'apoptose en inhibant le clivage des précurseurs des caspases en leurs formes actives. Il s'agirait donc d'une inhibition post-traductionnelle par interaction directe avec le prodomaine des caspases (Srinivasan *et al.*, 1996).

Toutefois, Bcl-2 pourrait aussi inhiber l'étape effectrice de l'apoptose en inhibant soit directement les caspases actives, soit en protégeant les substrats spécifiques de ces protéines (O'Reilly *et al.*, 1996). De même, il a été montré que Bcl-xL peut inhiber l'activation de la caspase-8 en réponse au signal apoptotique induit par Fas ou par le TNFR1 (Ng et Shore, 1998).

Les protéines de stress (HSP)

Les protéines de stress ou HSPs (Heat Shock Proteins) forment une famille qui exerce des fonctions essentielles à la survie cellulaire à la suite d'un stress, qu'il soit physique (hyperthermie), chimique (chute du pH) ou métabolique (radicaux libres oxygénés). Les HSPs agissent comme des molécules chaperons; elles lient les peptides ou protéines en cours de synthèse ou à fort risque d'agrégation, et favorisent leur repliement correct ainsi que leur translocation dans leur compartiment subcellulaire définitif. Elles sont donc souvent exprimées sous forme constitutive et indispensable aux fonctions cellulaires normales. De nombreux travaux ont notamment établi le rôle d'HSP 70 et d'HSP 27 dans la régulation de nombreux processus, dont l'apoptose (Garrido *et al.*, 2003).

Le mécanisme de prévention de l'apoptose par les HSPs pourrait être en relation avec la protection contre les molécules oxydantes en ayant pour cibles les mitochondries mais les HSPs peuvent également jouer un rôle inhibiteur de l'apoptose par interaction directe avec les protéines impliquées dans les processus apoptotiques (Mosser *et al.*, 2000).

Protéines pro-apoptotiques

Bax et Bad sont des protéines solubles dans le cytoplasme (Gross *et al.*, 1999). Bax répondrait au signal apoptotique par un changement conformationnel provoquant son homodimérisation et son insertion dans la membrane mitochondriale, ceci résultant en une perturbation des fonctions mitochondriales et la libération de protéines inductrices de l'apoptose tel que le cytochrome c, enclenchant ainsi le processus de mort cellulaire.

Contrairement à Bax, Bcl2 ou Bcl-xL, Bad ne possède pas de liaison d'ancrage membranaire. La protéine Bad exerce son rôle pro-apoptotique en se liant à Bcl-2 et Bcl-xL, pour lesquelles elle possède une affinité plus forte que celle de Bax. Ces dimérisations compétitives inhibent l'activité anti-apoptotique, mais surtout contribuent à dissocier les complexes Bax/Bcl-2 et Bax/Bcl-xL pour favoriser la dimérisation de Bax et son insertion dans la membrane mitochondriale (Yang *et al.*, 1995). Sous forme phosphorylée, Bad ne peut plus se dimériser avec un partenaire anti-apoptotique de type Bcl-xL mais, en revanche, est séquestrée dans le cytoplasme sous la forme d'un complexe avec la protéine 14-3-3 et n'est donc plus disponible pour inhiber le pouvoir anti-apoptotique de Bcl-xL et Bcl-2. A l'inverse, lorsque Bad est déphosphorylée sous l'action de signaux pro-apoptotiques, elle est recrutée à la membrane des mitochondries où elle se dimérise avec un partenaire anti-apoptotique.

Comme Bad, Bid possède la capacité de s'hétérodimériser avec les protéines de survie (comme Bcl-2 et Bcl-xL) et d'inhiber ainsi leurs propriétés anti-apoptotiques. De localisation cytoplasmique, la protéine pro-apoptotique Bid est clivée par la caspase-8 activée via le récepteur à l'antigène Fas ou le TNFR1. Le fragment C-terminal est transloqué au niveau de la mitochondrie où, en interagissant avec Bcl-2 et Bcl-xL, il sera à l'origine de dommages fonctionnels et de la libération du cytochrome c (APAF-2) (McDonnell *et al.*, 1999). Ainsi, Bid relayerait un signal apoptotique de la surface cellulaire à la mitochondrie, activité qui peut-être inhibée par une surexpression de Bcl-2 (Chou *et al.*, 1999).

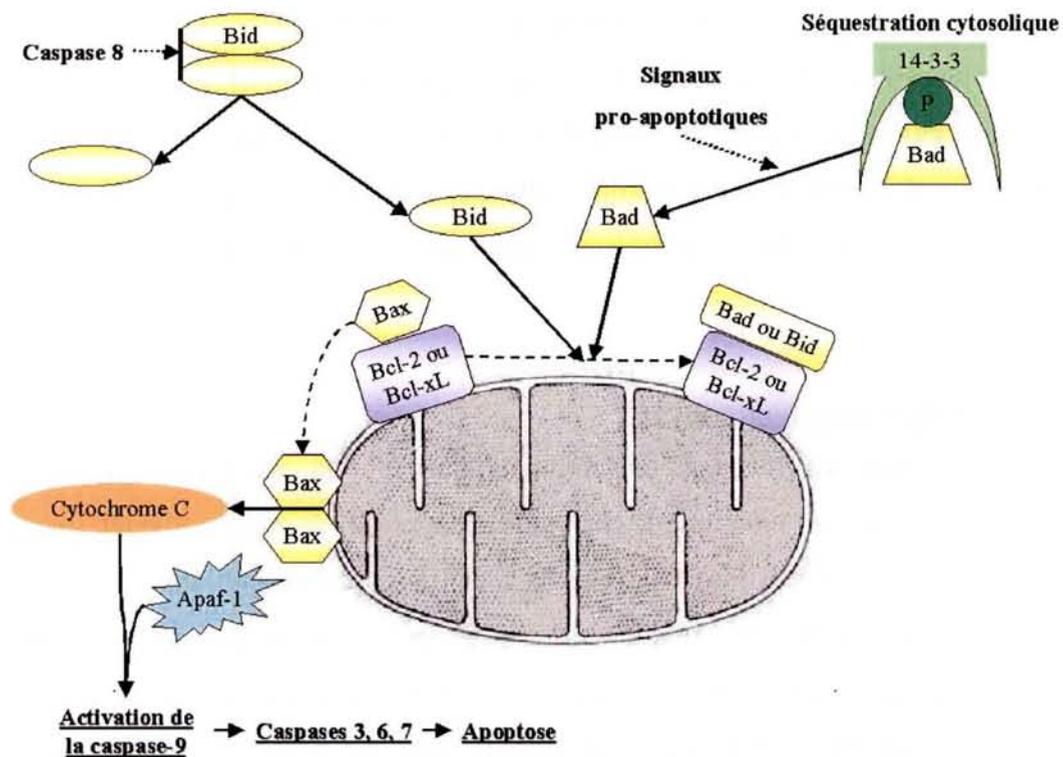


Figure 17 : Mécanismes moléculaires mitochondriaux de la transduction du signal apoptotique menant à l'activation des caspases.

La régulation de cette phase est donc principalement exercée par les protéines de la famille Bcl-2 ancrées dans les membranes, essentiellement mitochondriales. Elles permettent ou non l'entrée vers la phase effectrice de la mort et le point de non-retour.

IV-1-B-b-β-Le rôle des mitochondries

Les cellules d'un tissu ne sont pas également sensibles à un agent apoptogène mais différent selon l'ensemble des signaux issus de leur environnement qu'elles intègrent afin de

décider entre les deux options de vie et de mort. Un organite joue un rôle central dans cette régulation, la mitochondrie (Parone *et al.*, 2002; Degli, 2004).

Les événements affectant les mitochondries représentent une étape précoce impliquée dans le déroulement du processus d'apoptose (Mignotte *et al.*, 1998). Avant même que les cellules ne présentent les manifestations classiques de l'apoptose nucléaire, elles subissent une diminution du potentiel transmembranaire de la mitochondrie. La mitochondrie peut ouvrir dans sa membrane interne des pores de transition de perméabilité laissant échapper des petites molécules et dissipant le potentiel de membrane d'où l'arrêt de la synthèse d'ATP (Halestrap *et al.*, 2002). De nombreux mécanismes semblent pouvoir provoquer l'ouverture de ces canaux comme l'hypoxie, l'absence d'un facteur de croissance, une attaque de la chaîne respiratoire par des radicaux oxygénés comme NO. L'accroissement de perméabilité de la membrane interne permet l'entrée d'eau dans le stroma mitochondrial, hyperosmotique, entraînant le gonflement de la mitochondrie et une altération de la membrane externe suffisante pour libérer des produits apoptotiques de l'espace intermembranaire tels que le cytochrome c (transporteur d'électron soluble, faisant la navette entre les complexes membranaires CoQ-cytochrome c réductase et cytochrome c oxydase) et le facteur AIF.

Physiologiquement les mégapores mitochondriaux sont étroitement régulés, en particulier par des molécules de la famille Bcl2 présentes sur la membrane extérieure de la mitochondrie près des sites de contact membrane externe/membrane interne où les mégapores sont supposés se former.

Le facteur AIF (Apoptosis Inducing Factor) a été identifié et cloné par l'équipe de Guido Kroemer (Susin *et al.*, 1999). AIF est localisé dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Il s'agit d'une molécule possédant une double fonction : oxydoréductase et facteur apoptogène. Afin que cette dernière activité s'exerce, il y a nécessité d'une redistribution subcellulaire : de la mitochondrie vers le cytosol puis vers le noyau. La voie AIF est indépendante des caspases et ne nécessite aucun intermédiaire pour provoquer l'apoptose nucléaire.

APAF-1 (Apoptotic Protease activating Factor est l'équivalent de *Ced 4*) est une protéine dont la partie N-terminale comporte un domaine CARD (caspase-recruitment domain), lui permettant d'interagir avec les caspases qui vont être les "ouvriers" de la phase effectrice de l'apoptose. Dans APAF-1 se trouve un domaine de type WD-40, connu pour participer à des interactions interprotéiques. Ce domaine permettrait l'interaction d'APAF-1 avec APAF-2/cytochrome c et la procaspase-9/APAF-3. Le complexe impliquant les APAFs posséderait donc une activité ATPasique indispensable à la catalyse des caspases (Ferraro *et al.*, 2003). Rien n'indique dans la séquence de APAF-1 que cette molécule ait par elle-même

une activité de protéase. Plus probablement, elle agirait comme une protéine chaperon, capable de conférer aux caspases auxquelles elle se lie et en présence d'ATP, une conformation propice à leur auto activation protéolytique.

Le cytochrome c (APAF-2) libéré par les mitochondries s'associe avec les molécules APAF-1 et procaspase-9 (47 kDa). Ce complexe induit alors le clivage et l'activation de la Caspase-9 qui, par suite, active une des enzymes clés de l'apoptose, la caspase-3/CPP32, l'une des protéases effectrices majeures de l'apoptose (Ferraro *et al.*, 2003).

IV-1-B-c-Phase effectrice de l'apoptose : les caspases

La protéolyse des divers constituants du cytosquelette, de nombreuses enzymes indispensables à l'intégrité cellulaire, de protéines régulatrices comme Bcl2, ainsi que l'activation d'endonucléases, paraît être sous le contrôle sinon exclusif du moins prédominant d'une classe particulière de protéases, les caspases.

Jusqu'ici, 14 caspases ont été identifiées chez les mammifères. Elles sont exprimées sous forme de proenzymes inactives qui seront activées par clivage protéolytique pendant l'apoptose. Beaucoup de caspases participent à la signalisation et à l'exécution de l'apoptose tandis que d'autres sont impliqués dans des mécanismes proinflammatoires (Philchenkov, 2004).

Toutes ces protéases possèdent un site actif catalytique très conservé, composé d'un résidu cystéine inclus dans une séquence peptidique de type QACRG, leur conférant une spécificité de reconnaissance et de clivage au niveau des résidus aspartate (Talanian *et al.*, 1997). Toutes les caspases existent sous forme de proenzymes inactives et nécessitent une maturation sous forme d'une coupure catalytique au niveau des sites contenant ces résidus aspartate libérant 2 sous unités qui s'associent en 1 hétérodimère, l'enzyme active finale étant formée par l'association de 2 dimères.

Les caspases -8 et -10 possèdent deux domaines effecteurs DED (Death Effector Domain) et se trouvent en amont de la cascade d'activation des caspases. Les caspases -1, -2, -4, -5, -9 et -13 possèdent deux domaines de recrutement des caspases (CARD). L'agrégation de ces caspases au niveau de leurs domaines spécifiques avec des molécules adaptatrices ou d'autres caspases provoque leur activation par protéolyse (Chou *et al.*, 1998). Ainsi, la caspase-8 se lie via son domaine DED avec les domaines DED des molécules adaptatrices FADD et TRADD, tandis que la caspase-2 se lie via son site CARD au site CARD des molécules adaptatrices RIP et RAIDD impliquées aussi dans certaines voies Fas et TNF

(Thome *et al.*, 1998). La liaison CARD/CARD se retrouve aussi entre APAF-1 et la Caspase-9 (Cain, 2003).

Les pro-caspase-3, -6 et -7 ont un prodomaine court sans motifs d'interaction protéine/protéine, elles sont donc cytosoliques et directement activées au niveau du site catalytique par les autres protéases; elles agissent tout à fait en aval du signal apoptotique et on les nomme couramment les caspases "effectrices" (Srinivasula *et al.*, 1998).

De part leur structure, il existe donc en fait 2 catégories de caspases :

- les caspases initiatrices, comme les caspases 8 ou 10. Comme Fas, elles possèdent l'aptitude de se lier à des protéines cytoplasmiques qui se lient elles-mêmes à la queue intracytoplasmique de récepteurs membranaires. Ces protéines qui placent les caspases à proximité l'une de l'autre, facilitent leur dimérisation et donc leur auto activation.
- les caspases effectrices, comme la caspase 3. Elles sont directement ou indirectement responsables des lésions cellulaires. Elles sont obligatoirement activées par les précédentes. La cascade d'activation des caspases est inhibée par l'aptitude de certaines d'entre elles à se lier aux protéines Bcl2 ou Bcl-xL.

On considère actuellement qu'il y a deux voies distinctes d'activation des caspases (Chang et Yang, 2000):

- une voie directe via la liaison ligand/récepteur (dépendantes ou TNF) qui va mener à une activation des caspases en cascade, allant des caspases initiatrices (-8 et -10) aux caspases effectrices (caspase-3, -6, -7).
- Une voie indirecte qui nécessite un signal amplificateur à partir de la mitochondrie. La liaison récepteur / ligand provoque une activation directe mais faible des caspase-8 et -10. Celles-ci sont inefficaces à activer directement la cascade des caspases. Elles provoquent alors, entre autre, la déphosphorylation de Bad et le clivage de Bid, l'homodimerisation de Bax et par suite la libération du cytochrome c puis, via l'activation de la pro-caspase-9, la cascade d'activation protéolytique des caspases effectrices.

Une fois la voie des caspases activées, que ce soit de façon directe ou indirecte, il y a alors une action au niveau nucléaire qui va conduire, via des clivages :

- à des activations de la synthèse de cholestérol afin de stabiliser la membrane plasmique, de la fragmentation de l'ADN par l'activation des endonucléases dont les CAD (Caspases Activated Desoxyribonucleases) et les protéinases. La CAD (Caspase Activated Dnase) est l'endonucléase spécifique qui clive l'ADN chromosomique durant l'apoptose. ICAD est

l'inhibiteur endogène de la CAD et il est clivé et désactivé par la caspase-3/ CPP32, entraînant la libération puis la translocation dans le noyau de la CAD active qui va alors dégrader l'ADN (Janicke *et al.*, 1998).

- mais également l'inactivation des enzymes chargées de réparer l'ADN endommagé comme la DNAPK (DNA Dépendent Kinase) et la PARP (Poly ADP Ribose polymérase) afin de ne pas reconstruire ce qui a été détruit ! Il y aura également dégradation des lamines qui aura pour conséquence une déstabilisation de l'architecture nucléaire et donc l'action des endonucléases sera facilitée (Porter *et al.*, 1997).

On pourra alors observer l'apparition des signes morphologiques caractéristiques qui permettent de définir l'apoptose : la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN, la désorganisation nucléaire et enfin la dispersion dans les corps apoptotiques.

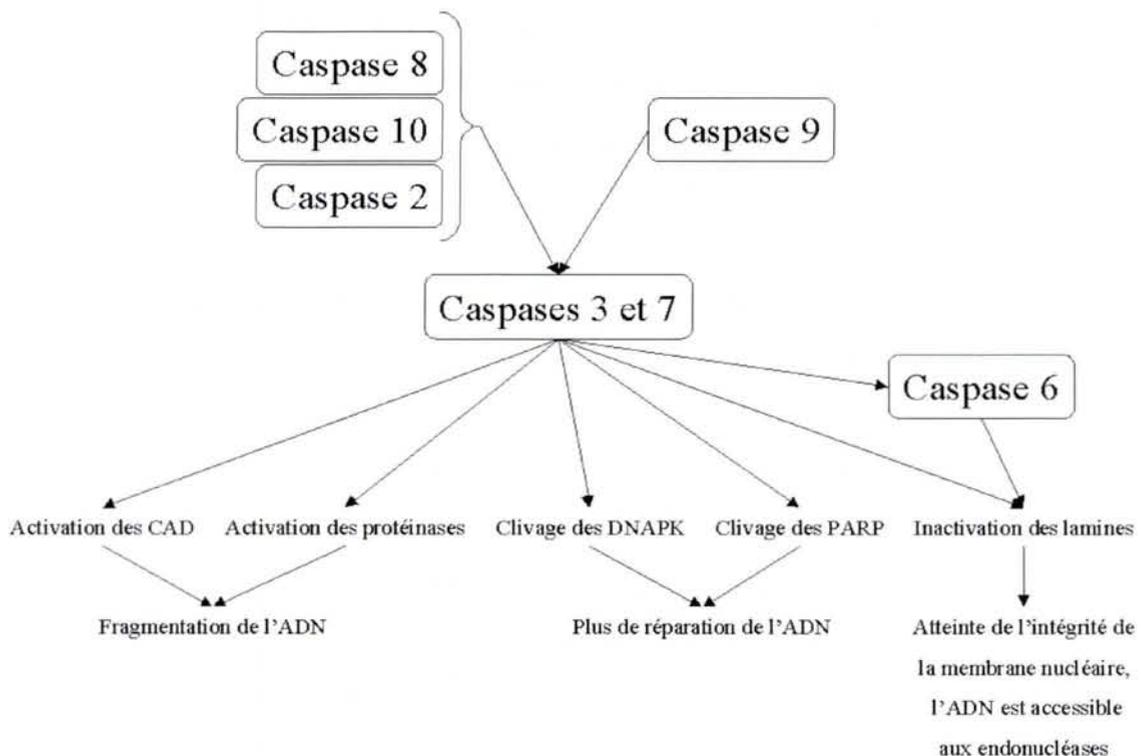


Figure 18 : Phase effectrice de l'apoptose.

IV-2- Neutrophiles et apoptose

Parmi les leucocytes, les neutrophiles sont des cellules qui présentent un temps de vie le plus court. Dans la moelle osseuse, les neutrophiles sont dans un environnement riche en cytokines qui génèrent en eux des signaux de survie. Après avoir quitté la moelle osseuse, les neutrophiles patrouillent dans le flux sanguin (8 à 20 h). L'absence de ces cytokines dans la

circulation sanguine limite la durée de vie des neutrophiles (Webb *et al.*, 2000). C'est pourquoi en absence d'inflammation, les neutrophiles sénescents sont éliminés par apoptose passive au niveau de la moelle osseuse ou du foie selon l'état d'activation de ces cellules (Suratt *et al.*, 2001).

Lors d'une infection, les neutrophiles migrent vers les tissus en direction du site infectieux. Sous l'action des médiateurs locaux inflammatoires, l'apoptose passive des neutrophiles est retardée. Leur temps de demi-vie peut alors être considérablement augmenté, leur mort spontanée passive est ainsi repoussée dès qu'ils entrent dans les tissus infectés ou enflammés. Leur mort sera ultérieurement induite suite à la phagocytose des microbes et à l'activation de leurs mécanismes microbicides (Webb *et al.*, 2000) (figure 19).

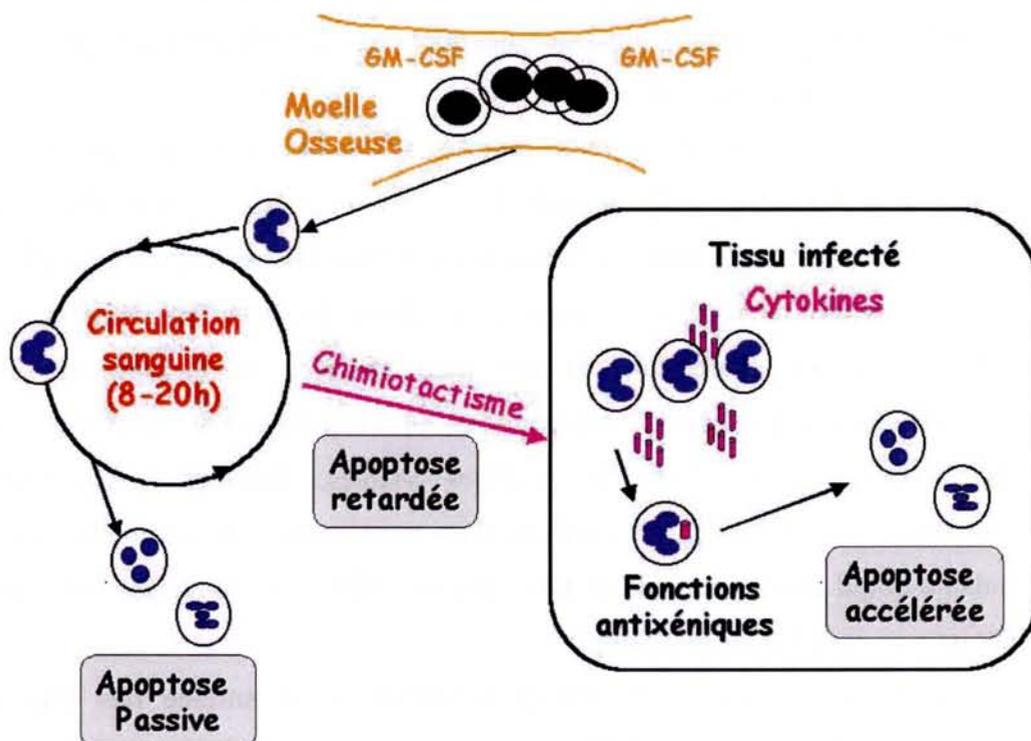


Figure 19: Apoptose passive, retardée et accélérée (Webb *et al.*, 2000).

Cependant la diminution de l'activité chimioattractante fait rapidement (2-4h) cesser la migration de neutrophiles vers le site infectieux (Colditz et Movat, 1984; Haslett *et al.*, 1989a). Les neutrophiles ne retourneront pas dans la circulation sanguine, ils seront éliminés dans les sécrétions des muqueuses ou à l'intérieur même des tissus (Klebanoff et Clark, 1978). L'élimination normale des neutrophiles du site infectieux, chez l'Homme, est liée à un processus apoptotique accéléré qui vraisemblablement limite la fonction proinflammatoire et microbicide et prépare ces cellules pour leur élimination des tissus par le macrophage (Akgul *et al.*, 2001).

IV-2-A-Les neutrophiles meurent par apoptose

Malgré les travaux de Metchnikoff qui avait pu observer que des “macrophages englobaient des microphages (neutrophiles)” (Metchnikoff, 1891), il était communément admis que les neutrophiles infiltrés dans les tissus se détruisaient avant d'être engloutis par des phagocytes et que le déversement de grandes quantités de produits toxiques était inévitable (Hurley, 1983). Cette hypothèse fut remise en cause par les travaux de nombreux auteurs qui ont découvert que les neutrophiles vieillissants du sang périphérique ou présents sur les sites infectieux présentaient une fragmentation de la chromatine ainsi que des changements morphologiques et biochimiques caractéristiques d'une mort cellulaire programmée. Comme dans toutes autres cellules apoptotiques, les neutrophiles présentent en plus de la condensation chromatinienne, une vacuolisation de leur cytoplasme (phénomène non observé chez des neutrophiles circulants jeunes) ainsi que des membranes cellulaires (membrane plasmique, mitochondriales, granulaires, etc....) intactes.

Les neutrophiles perdent leurs propriétés fonctionnelles pendant l'apoptose. Ils présentent aussi des changements moléculaires au niveau de leur surface cellulaire telle que la disparition de certains récepteurs membranaires ou bien l'apparition de nouvelles molécules de surface qui seront reconnues par des récepteurs présents à la surface des phagocytes.

Le changement moléculaire le plus caractéristique lié à l'apoptose est la perte d'asymétrie des phospholipides membranaires et l'exposition du côté extracellulaire de phosphatidylsérine (PS). Dans les cellules viables, l'asymétrie des phospholipides membranaires est maintenue par l'activité d'un translocase, qui serait une ATPase Mg^{2+} -dépendante et qui aurait pour rôle de faire revenir, entre autre, la phosphatidylsérine dans le feuillet interne de la bicouche lipidique.

Cependant, la présence de phosphatidylsérine à la surface des cellules lors de l'activation cellulaire et pendant l'apoptose serait plutôt dû à l'activation d'une enzyme "perturbatrice" de l'asymétrie membranaire qui pourrait déplacer de façon bidirectionnelle les phospholipides des feuillets membranaires et qui serait ainsi responsable de l'expression en surface de la phosphatidylsérine.

L'activité kinase de la PKC δ serait responsable d'une part de l'activation de la translocase mais aussi de l'inactivation de cette enzyme "perturbatrice" (Fadok *et al.*, 2001; Huynh *et al.*, 2002). Or, lors du processus apoptotique, la caspase-3 induit le clivage de la PKC δ . L'activité de cette enzyme "perturbatrice" n'est alors plus régulée et la translocase n'étant plus activée, la phosphatidylsérine est alors exposée de façon permanente à la surface de cellules apoptotiques. L'externalisation de cette molécule facilite la reconnaissance des

neutrophiles apoptotiques par les macrophages via leurs récepteurs PSR et induit leurs phagocytoses (Akgul *et al.*, 2001).

La présence d'autres signaux d'identification d'entrée en apoptose (tel que l'oxydation des phospholipides membranaires ou l'expression d'ICAM-3) à la surface des neutrophiles induirait également la phagocytose de la cellule par le macrophage (Henson *et al.*, 2001).

L'ingestion de la cellule sénescence par les macrophages quand la membrane de ces cellules semble encore structurellement et fonctionnellement intacte permet ainsi d'éviter la libération des contenus granulaires toxiques et de limiter les dommages tissulaires (Savill *et al.*, 1989). Les travaux de Huynh ont démontrés que l'ingestion des cellules apoptotiques, par les macrophages permet de faire cesser plus rapidement l'état inflammatoire. D'une part, la phagocytose des neutrophiles activés ne leur permet plus de sécréter de cytokines pro-inflammatoires. D'autre part, la phagocytose de cellules apoptotiques via la reconnaissance PS/PSR induirait une production de TGF- β 1, qui est une molécule anti-inflammatoire, par le macrophage (Huynh *et al.*, 2002).

IV-2-B-L'apoptose par voie directe

Certains auteurs ont démontré que l'entrée en apoptose du neutrophile humain peut s'effectuer suite à une stimulation par des facteurs extrinsèques, ligands de la famille des récepteurs au TNF et passer par la voie directe (Yamashita *et al.*, 1999; Maianski *et al.*, 2003). Les neutrophiles sont sensibles à l'apoptose induite par le récepteur Fas et l'interaction entre ce récepteur et son ligand (FasL) a longtemps été suggérée pour expliquer l'apoptose passive des neutrophiles (Liles *et al.*, 1996). Les neutrophiles expriment le récepteur Fas mais l'expression de son ligand est discutée (Akgul *et al.*, 2001). Cependant les études de Fecho et de Villunger ont démontré que les neutrophiles de souris déficientes pour ce récepteur, meurent par apoptose passive avec la même fréquence que ceux de souris contrôle (Fecho et Cohen, 1998; Villunger *et al.*, 2000). Ces résultats vont à l'encontre d'un rôle pour le système Fas/FasL dans l'apoptose passive des neutrophiles. D'autant plus que les travaux d'Ottonello ont démontré l'effet chimiotactique et non apoptotique du ligand FasL soluble et que seules les formes membranaires de ce ligand étaient capables d'induire l'apoptose (Ottonello *et al.*, 1999). Le rôle du système Fas/FasL dans l'apoptose accélérée des neutrophiles au cours d'une inflammation est encore très controversé.

L'effet de TNF α sur la durée de vie des neutrophiles semble être également ambigu, les résultats publiés sont parfois contradictoires. Bien que l'effet pro-apoptotique du TNF α sur les

neutrophiles ait été bien documenté, des études prouvant l'effet contraire l'ont été également. Les effets du TNF α sur les neutrophiles semblent dépendre non seulement de la concentration de cette cytokine et de la durée de la stimulation mais aussi de la capacité fonctionnelle initiale des neutrophiles avant l'exposition au TNF α . Il semble donc que ce genre de stimulation puisse influencer seulement les cellules préactivées, mais n'ai aucun effet sur les cellules au repos (Maiani *et al.*, 2004a). Le TNF α aurait donc un rôle dans l'apoptose active, accélérée des neutrophiles.

IV-2-C-L'apoptose par voie mitochondriale

Bien que moins étudiée, la voie apoptotique mitochondriale doit être d'une importance majeure car les neutrophiles tendent vers une mort rapide sans influence externe (spontanément) (Maiani *et al.*, 2004a). Comme dans d'autres types cellulaires, les caspases et les protéines de la famille Bcl-2 occupent une position centrale dans l'apoptose du neutrophile humain (Akgul *et al.*, 2001). Les neutrophiles sont des cellules exceptionnelles par le fait qu'elles sont considérées comme des cellules possédant peu voir pas de mitochondries. Ces cellules employant principalement la glycolyse pour leur approvisionnement en énergie (Borregaard et Herlin, 1982). Newmeyer et Ferguson-Miller ont donc logiquement supposé que si les mitochondries avaient perdu leur importance dans la vie active du neutrophile, peut-être elles avaient-elles préservé un rôle dans la mort de ces cellules (Newmeyer et Ferguson-Miller, 2003).

De nombreuses études in-vitro ont démontré que plusieurs facteurs peuvent accélérer ou retarder l'apoptose des neutrophiles. Les cytokines inflammatoires (IL-1 β , IL-8, TNF- α , G-CSF, etc.), la molécule C5a du complément ainsi que le LPS peuvent prolonger la vie du neutrophile. Il a été également démontré que la stimulation des molécules des surfaces lors de la transmigration permettait de générer des signaux intracellulaires capables de retarder l'apoptose passive de ces cellules lors de leur déplacement vers les tissus (Akgul *et al.*, 2001).

Contrairement aux autres cellules, l'hypoxie retarde l'apoptose passive du neutrophile. D'autre part, les neutrophiles de patients atteints de CGD (déficient en NADPH-oxydase) présentent une plus longue durée de vie. Il semblerait donc que la présence de dérivés oxygénés (exogènes ou produits par le neutrophile) induise l'apoptose de ces cellules. Ce phénomène peut être important dans la fonction de ces cellules au cours de l'inflammation. Lors de leur déplacement vers les tissus, les neutrophiles passent d'un milieu riche vers un milieu pauvre en oxygène ce qui leur permettrait de prolonger leur temps de demi-vie.

Toutefois, lors de leur activation ou après une phagocytose, ces cellules vont sécréter de grandes quantités de métabolites réactifs dérivés de l'oxygène ce qui va alors promouvoir leur apoptose et leur élimination par les autres phagocytes professionnels (Akgul *et al.*, 2001).

La cycloheximide et l'actinomycine D (respectivement inhibiteurs de la traduction et la transcription) accélèrent également l'apoptose du neutrophile. Cette observation, liée au fait que les agents qui retardent l'apoptose spontanée du neutrophile (par ex : cytokines et glucocorticoïdes) stimulent aussi invariablement la biosynthèse de protéine, laisse supposer que la survie du neutrophile nécessite l'expression transitoire de protéine(s) (Akgul *et al.*, 2001).

Comme dans beaucoup d'autre type cellulaire, l'exécution du processus apoptotique dans le neutrophile se propage par les caspases. Les neutrophiles expriment une grande variété de caspases initiatrices et effectrices tels que les caspases-1, -3, -4, -8 et -9 mais aussi un grand nombre de protéines de la famille Bcl-2. Il est maintenant généralement convenu que le neutrophile humain n'exprime pas la protéine anti-apoptotique Bcl-2 mais il exprime constitutivement les protéines pro-apoptotiques Bax, Bid, Bak et Bad (Akgul *et al.*, 2001). Dans les neutrophiles comme dans d'autres types cellulaires, l'action de Bax sur la mitochondrie a été largement documenté (Maiani *et al.*, 2002; Pryde *et al.*, 2000). L'expression constitutive de ces protéines ainsi que l'absence de protéines Bcl-2 semble suffire à expliquer pourquoi les neutrophiles circulants présentent une si courte demi-vie.

Le neutrophile humain exprime cependant l'ARNm de protéines anti-apoptotiques (Mcl-1, A1 et Bcl-xL) mais seule l'expression de la protéine Mcl-1 a pu être mise en évidence. La protéine Mcl-1 est exprimée dans les neutrophiles circulants et son niveau d'expression décroît avec l'apparition des signes apoptotiques (Akgul *et al.*, 2001).

Toutefois, ces résultats doivent être interprétés avec précaution. Le fait que l'on ne puisse pas détecter une protéine (notamment par immunoempreinte) ne signifie pas pour autant que cette même protéine ne soit pas présente dans les neutrophiles. Lors de la préparation des extraits protéiques de neutrophiles, la destruction des membranes (plasmiques et granulaires) libère un énorme potentiel protéolytique qui dégrade de façon non spécifique diverses protéines et ne permet plus leur détection (Maiani *et al.*, 2004a).

Les agents qui induisent un retard de l'apoptose constitutive du neutrophile, permettent en fait d'augmenter ou de maintenir le niveau d'expression de cette protéine dans le cytoplasme des neutrophiles. La survie des neutrophiles en présence de cytokines serait ainsi due à l'augmentation de l'expression d'une protéine anti-apoptotique.

Contrairement aux protéines pro-apoptotiques, l'ARNm et la protéine Mcl-1 ont des durées de vie très courtes (approximativement 2 à 3 h). En absence de néosynthèse de Mcl-1, c'est-à-dire en absence de signaux de survie générés (entre autres) par les cytokines inflammatoires, ce sont les protéines pro-apoptotiques qui prédominent et induisent une mort par apoptose (Akgul *et al.*, 2001). La survie du neutrophile requiert donc une inhibition active de la machinerie apoptotique. L'étude des promoteurs des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et A1 ont révélé que contrairement à A1, l'expression du gène Mcl-1 n'est pas régulée par le facteur de transcription NF- κ B. Des voies de signalisation séparées, impliquant NF- κ B et les MAPKs, semblent donc impliquées dans la régulation de l'expression de ces deux protéines. Ce qui soulève la possibilité que ces voies de signalisation soient indépendamment contrôlées par différents signaux exogènes (Akgul et Edwards, 2003).

Bien que l'on sache depuis de nombreuses années que les cytokines et d'autres agents soient capables de moduler l'apoptose des neutrophiles, les voies de signalisation intracellulaire qui commandent ce processus sont toujours méconnues. Il est clair que lors de ces processus d'apoptose passive ou retardée, les cascades de phosphorylation sont importantes.

Les neutrophiles expriment une variété de PKC, incluant des isoenzymes pro- (ex PKC β) et anti-apoptotiques (ex PKC δ) (Webb *et al.*, 2000). Les PKC dites classique, sont notamment impliquées dans l'activation du neutrophile au cours des réponses immunes (ex PKC β) mais ce sont d'autres isoenzymes qui sont impliquées dans la régulation de l'apoptose du neutrophile. Ainsi les travaux de Pongracz ont mis en évidence une activation constitutive de la PKC δ par la caspase-3 au cours de l'apoptose passive des neutrophiles (Pongracz *et al.*, 1999). Ceux de Rossi ont montré que les agents capables de provoquer une augmentation du niveau d'AMPc, permettent l'activation de la protéine kinase A et de retarder l'apoptose constitutive des neutrophiles (Rossi *et al.*, 1995). Toutefois, les cibles de ces kinases n'ont pas été encore clairement identifiées.

Une autre voie de signalisation intracellulaire, incluant les MAPKs, NF- κ B et Akt, ont été impliqués comme régulateurs d'activité et d'expression des protéines apoptotiques. Il y a trois principaux types de MAPKs dans les cellules mammifères : la protéine kinase p42/44 ou ERK (qui est activé par MEK phosphorylée), la p38 MAPK et c-jun MAPK (qui sont généralement activés par des stress tels que l'irradiation). Bien que ces trois types de MAPK aient été mis en évidence dans les neutrophiles humains, seuls ERK et p38MAPK semblent jouer un rôle dans l'apoptose des neutrophiles. Le rôle de p38MAPK est cependant encore

mal compris : les signaux de mort (tels que l'irradiation) active cette protéine et induise l'apoptose pourtant l'activité de cette protéine est indispensable pour retarder l'apoptose passive du neutrophile lors d'une hypoxie mais elle doit être inhibée lors d'une réponse au LPS (Akgul *et al.*, 2001).

Les signaux de survie, tels que ceux générés par le GM-CSF, transitent par l'activation des protéines kinases Lyn puis ERK mais aussi PI3K et retardent l'apoptose des neutrophiles (Akgul *et al.*, 2001). Cependant, les signaux de survie produits par PI3K peuvent être différents de ceux produits par ERK. La PI3 kinase phosphoryle le phosphatidylinositol en position 3. Ce dérivé contribue à recruter à la membrane la protéine Akt/PKB qui reconnaît les PtdIns 3-P par son domaine pleckstrine et induit l'activation d'une nouvelle famille de protéine kinases, appelées *phosphatidylinositol-dependent kinases* (PDK) (Alessi *et al.*, 1997). Ces enzymes phosphorylent alors Akt/PKB positionnée à la membrane plasmique, parachevant son activation. Akt, également désigné sous le nom de PKB, joue un rôle critique en commandant l'équilibre entre la survie et l'apoptose cellulaire car son activation l'amène alors à phosphoryler ses cibles : NF- κ B, mais aussi Bad et la caspase-9 diminuant de ce fait leurs effets pro-apoptotiques (Klein *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2003). Akt, lorsqu'elle est activée par divers facteurs de croissance et de survie, favorise donc la survie de cellules en empêchant l'apoptose par la phosphorylation de plusieurs cibles pro- ou anti-apoptotiques. Il est, cependant, possible que les facteurs de survie mettent en jeu d'autres kinases qui pourraient intervenir dans la phosphorylation de Bad ou de la caspase-9.

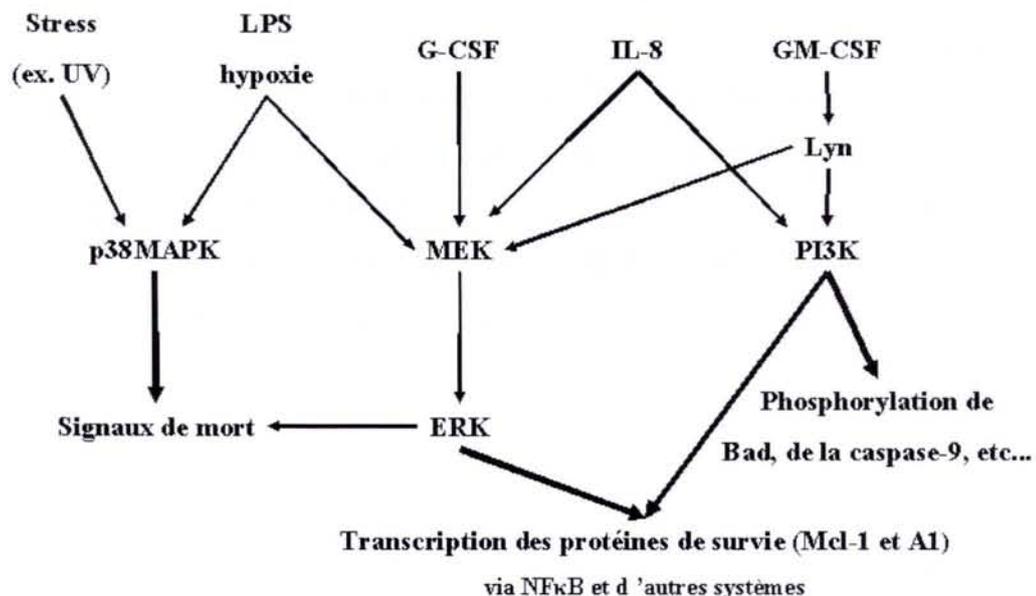


Figure 20 : Possibles rôles des MAPK et de la PI3K dans la régulation de l'apoptose ou de la survie du neutrophile (Akgul *et al.*, 2001)

Dans un processus inflammatoire, la séquence idéale des événements cellulaires serait une migration rapide des neutrophiles vers le site infectieux, une période de contact avec la cellule endothéliale réduite au minimum avec une dégradation de matrice localisée, une réponse des neutrophiles réduite au strict nécessaire au cours de la réponse microbicide et enfin un arrêt immédiat de leur migration ainsi que l'élimination rapide des cellules sénescents intactes. Evidemment, le moindre dérèglement de l'un de ces processus peut conduire à des lésions tissulaires ou à une dégradation excessive de la matrice, amplifiant la réaction inflammatoire et aboutissant à des inflammations chroniques (Haslett *et al.*, 1989b).

V-Les récepteurs membranaires des chimioattractants

Les agents capables de provoquer une réponse bactéricide de la part du neutrophile peuvent être particuliers (bactéries plus ou moins opsonisées, zymosan...) ou solubles (endotoxines, fMLF, C5a, PAF, acide arachidonique...). La liaison du stimulant à un récepteur induit une cascade de signaux transductionnels en particulier de mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation aboutissant à l'activation du neutrophile.

Toute cellule possède un ensemble de protéines membranaires intervenant dans les communications intercellulaires.

Ces molécules de surface assurent une double fonction :

- une fonction de reconnaissance : elles peuvent reconnaître un ligand spécifique (molécule de la matrice extracellulaire, molécule membranaire d'une autre cellule ou médiateur soluble).
- une fonction effectrice : permettre l'adhésion des cellules et/ou délivrer à la cellule reconnue des signaux qui seront captés par des enzymes membranaires ou cytosoliques et parfois, transmis au noyau pour activer ou inhiber l'expression de certains gènes.

Pour assurer ces fonctions de communication, la cellule règle l'expression de ses molécules de surface en fonction des signaux qu'elle reçoit, pour devenir plus sensible ou temporairement réfractaire au signal.

V-1-Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR)

V-1-A-Structure des GPCR

Les chimioattractants et autres agents inflammatoires (fMLF, C5a, IL-8, PAF...) induisent leurs réponses biologiques par la liaison et l'activation de récepteurs de surface des cellules inflammatoires (Ali *et al.*, 1997).

Ces récepteurs appartiennent à une nombreuse famille de récepteurs à sept segments transmembranaires, qui sont couplés à des protéines hétérotrimériques : les protéines G. La liaison des chimioattractants à leurs récepteurs a pour conséquence l'activation de la protéine G, qui agit en tant que "commutateur" moléculaire pour transmettre l'information du récepteur activé aux molécules effectrices en aval.

Ces molécules effectrices peuvent être des canaux ioniques et/ou des enzymes qui produisent des seconds messagers. Les protéines G hétérotrimériques se composent des sous-unités α ($G\alpha$) et $\beta\gamma$ ($G\beta\gamma$). Les neutrophiles expriment un grand nombre de protéines G. Certaines de ces protéines sont sensibles à la toxine pertussique, elles appartiennent à la sous-famille G_i/G_o (Cockcroft, 1992). Dans cette sous-famille, seules les protéines G_{ai2} et G_{ai3} sont exprimés chez le neutrophile (Offermanns et Simon, 1998).

Au repos, les protéines G sont présentes sous forme de complexes hétérotrimériques avec un groupement GDP lié à la sous-unité α . L'activation de récepteur conduit à un changement conformationnel de $G\alpha$, aboutissant à l'échange du groupement GDP par un groupement GTP. Cette interaction impose une dissociation du complexe hétérotrimérique. Il fut longtemps considéré que les sous-unités α libres transduisaient tous les signaux issus des récepteurs activés. Il est maintenant admis que le groupement $G\beta\gamma$ joue un rôle essentiel en intervenant dans plusieurs de ces événements, y compris l'activation de la phospholipase C (PLC) (Ali *et al.*, 1997).

V-1-B-Les récepteurs des peptides N-formylés (FPR)

V-1-B-a-Les récepteurs aux peptides N-formylés humains

Parce que les chemoattractants ont des rôles importants dans la modulation de l'immunité, leurs interactions moléculaires avec des récepteurs et les voies de signalisation cellulaires induites ont suscité beaucoup d'attention. Le récepteur aux peptides N-formylés (FPR1) fut caractérisé biochimiquement en 1976 comme étant un récepteur du peptide fMLF de forte affinité présent à la surface des neutrophiles. Ce récepteur à sept segments

transmembranaires est couplé à une protéine G sensible à la toxine pertussique donc couplé à une protéine G de type Gi (Le *et al.*, 2002).

FPR1 fut cloné en 1990 par l'équipe de Boulay (Boulay *et al.*, 1990). Plus tard, par hybridation génomique, d'autres auteurs ont mis en évidence deux gènes présentant une homologie de séquence avec FPR1. Ces récepteurs furent dénommés : FPRL1 et FPRL2 (FPR-like). FPRL1 fut cloné dans les cellules humaines phagocytaires. Il possède 69 % d'identité (au niveau protéique) avec le FPR. FPRL1 est un récepteur de faible affinité pour le fMLF car son activation, in-vitro, nécessite de forte concentration de ce peptide (de l'ordre du μM) (Le *et al.*, 2002).

Les travaux de Durstin ont montré que FPRL2, quant à lui, s'est révélé incapable de fixer ou de répondre à une stimulation fMLF et que ce récepteur s'exprimait dans les macrophages et les cellules dendritiques mais pas dans les neutrophiles (Durstin *et al.*, 1994).

Dans les neutrophiles, le peptide bactérien fMLF possède donc deux récepteurs : FPR1 et FPRL1. L'analyse structurale et les travaux d'autres auteurs ont cependant révélé que le récepteur FPR1 est capable d'interagir avec un grand nombre de peptides notamment les peptides d'origines bactériennes tels que les peptides N-formylés (le plus connu étant le fMLF) et que ce récepteur était indispensable pour l'activation des neutrophiles lors d'une infection bactérienne. De même, FPRL1 est activé par une grande variété d'agonistes ne présentant entre eux aucune relation structurale apparente. Certains de ces ligands sont d'origine endogène ou produits par des pathogènes, d'autres sont associés avec des maladies humaines telle que la maladie d'Alzheimer et la maladie du prion. Citons brièvement la lipoxine A4, la protéine Hp (2-20) produite par *Helicobacter pylori*, des peptides de l'enveloppe du virus du Sida (HIV-1), la protéine A β 42, la protéine sérique SAA (sérum amyloïde A) ou le peptide Prp (106-126) du Prion (Le *et al.*, 2002).

Enfin, plus récemment une variété d'agonistes (d'origine biologique indéterminée) pour FPRL1 a été mise en évidence. Il s'agit notamment du peptide WKYVM, d'un ligand non peptidien, le Quin-C1 (4-butoxy-N[2-(4-methoxy-phenyl)-4-oxo-1,4-dihydro-2H-quinazolin-3-yl]-benzamide) (Nanamori *et al.*, 2004) ou du Ck β 8-1 (transcrit alternatif de la chemokine Ck β 8) (Elagoz *et al.*, 2004).

Humain		Murin		agoniste	antagoniste
Gène	Protéine	Gène	Protéine		
<i>FPR</i>	FPR1	<i>Fpr1</i>	mFPR1	fMLF HIV-1 enveloppe peptide annexine I (aa1-26) Annexine I (aa9-25)	Boc-MLF Cyclosporine H
<i>FPRL1</i>	FPRL1	<i>Fpr-rs1</i>	Fpr-rs1	Hp(2-20) WKYMVm Quin-C1 LL-37 Ckβ8-1	HEYLPM WRWWWW ou WRW ⁴
		<i>Fpr-rs2</i>	Fpr-rs2	lipoxine A4 uPA-R (aa88-274) Sérum amyloïde A Amyloïde β (aa1-42) Prion (aa 106-126)	Peptide C2 : WPLTHTLRHTIW Peptide E11 : FPSIHTIRLTQF

Tableau 4: Divers agonistes des récepteurs aux peptides N-formylés, humains et de leurs orthologues murins (Le *et al.*, 2002).

La lipoxine A4 fut initialement découvert en tant qu'inhibiteur de la réponse immune (Samuelsson *et al.*, 1987) y compris chez les neutrophiles (Lee *et al.*, 1991). Bien que capable de se fixer à FPRL1 et contrairement au WKYMVm, la lipoxine A4 est incapable d'activer la NADPH-oxydase. Bae suggère donc qu'il pourrait exister une modulation ligand spécifique de l'activation de FPRL1 (Bae *et al.*, 2003a).

Un intérêt tout particulier est maintenant porté sur le récepteur FPRL1 depuis que les travaux de Li ont montrés que, dans les monocytes, l'activation de FPRL1 induisait une désensibilisation des récepteurs à chemokines CXCR4 et CCR5 (Li *et al.*, 2001). Ces derniers agissent comme co-récepteurs du virus HIV1 et leur désensibilisation atténue leur capacité à interagir avec les cofacteurs exprimés sur l'enveloppe de ce virus, limitant de ce fait la fusion des membranes et l'entrée du virus dans le monocyte. D'autre part, dans un but thérapeutique, pour pallier l'activation de FPRL1 par des peptides associés à des maladies humaines, les recherches semblent également se diriger vers la découverte de molécules capables d'inhiber ce récepteur sans induire la désensibilisation des autres récepteurs cellulaires, notamment FPR1. Bae *et al.* ont dernièrement découvert plusieurs peptides, notamment le HEYLPM et le WRWWWW ou WRW⁴ qui inhibe la stimulation des neutrophiles par la protéine Aβ42 (Bae *et al.*, 2003b; Bae *et al.*, 2004). C'est également dans cet objectif que l'équipe de Leroy a mis au point les peptides C2 (WPLTHTLRHTIW) et E11 (FPSIHTIRLTQF) (Poirey *et al.*, 2003).

V-1-B-b-Les récepteurs aux peptides N-formylés murins

A l'aide de sondes nucléiques dérivées des trois récepteurs FPR humains, sept gènes murins distincts ont pu être mis en évidence : *Fpr1* et *Fpr-rs1* à *Fpr-rs7* (Wang et Ye, 2002). Seuls l'ARN de *Fpr1*, de *Fpr-rs1* et de *Fpr-rs2* ont pu être mis en évidence dans les neutrophiles murins. Le gène *Fpr1* code pour un récepteur fonctionnel, mFPR1, orthologue du récepteur FPR1 humain. Ces deux récepteurs sont des récepteurs pour le fMLF et présentent une homologie de séquence protéique de 76%.

Fpr-rs1 et *Fpr-rs2* présentent une plus grande homologie de séquence avec FPRL1 qu'avec FPRL2. Ces deux gènes coderaient donc pour des récepteurs structurellement et fonctionnellement similaire à FRPL1. Parce que sa séquence protéique est identique à 97 % à celle du récepteur de la lipoxine A4 (FPRL1), *Fpr-rs1* serait un récepteur de ce lipide (Takano *et al.*, 1997). Bien que moins affine pour le fMLF que mFPR1, *Fpr-rs2* est un récepteur pour le fMLF. Toutefois, de nombreux auteurs ont pu constater que les récepteurs murins (mFPR1 et *Fpr-rs2*) sont bien moins sensibles au fMLF que les récepteurs humains (Le *et al.*, 2002). Ces récepteurs activent différentes voies de signalisation qui sont intégrés les unes par rapport aux autres et traduites par la cellule en terme de réorganisation du cytosquelette, de sécrétion de leur granules ou de production d'ions superoxyde en fonction du niveau de stimulation.

V-1-B-c-Le peptide WKYMVm

Le peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met (WKYMVm), a été identifié dans une banque aléatoire de peptide comme un agoniste induisant l'activation de la PLC et la formation d'IP3 dans une lignée de cellules B. L'action de la toxine pertussique bloque l'action du WKYMVm, ce peptide interagirait avec un récepteur couplé avec une protéine G de type Gi (Baek *et al.*, 1996). De plus, ce peptide ne stimule que des cellules issues de lignées cellulaires hématopoïétiques. Il est incapable d'activer des cellules non hématopoïétiques telles que les fibroblastes ou les cellules neuronales (Seo *et al.*, 1998).

Un analogue plus puissant de ce peptide est obtenu en remplaçant la L-méthionine, en position C-terminal, par une D-Met. À la différence d'un peptide composé d'acides aminés naturels de type L, un peptide composé d'acides aminés de type D ne serait pas dégradé par les protéases (Seo *et al.*, 1997). La présence d'un acide aminé non naturel, permettrait donc à ce peptide d'augmenter sa stabilité métabolique.

De nombreux auteurs ont précédemment montré que ce peptide est chimiotactique pour les neutrophiles humains, qu'il induit la sécrétion des constituants des granules ainsi que la mobilisation des molécules d'adhérence à la surface cellulaire, et qu'il est également un

activateur efficace de la NADPH-oxydase (Seo *et al.*, 1997; Bae *et al.*, 1999b; Dahlgren *et al.*, 2000).

Parce qu'une co-incubation avec nombre de chemoattractant (IL-8, PAF, C5a, G-CSF, MIP α ou Rantes) n'inhibe pas les réponses microbicides induites par une stimulation WKYMVm, Le *et al.* ont suggéré que le WKYMVm ne partage pas de récepteur avec ces cytokines (Le *et al.*, 1999). Ces auteurs ont également démontré que, seules de fortes doses de fMLF étaient capables d'atténuer la réponse induite par une stimulation par le WKYMVm. Ils ont donc supposé que le WKYMVm partageait un récepteur avec le fMLF. Un récepteur qui serait de faible affinité pour fMLF mais de forte affinité pour WKYMVm. Ainsi, à l'inverse du fMLF, le WKYMVm serait plus affine pour FPRL1 que pour le FPR.

Ces hypothèses ont été confirmées par les travaux de Dahlgren (Dahlgren *et al.*, 2000). Ces auteurs ont montré que, dans les neutrophiles humains, la présence d'antagonistes de FPR ne peut empêcher la réponse cellulaire induite par une stimulation WKYMVm. Dahlgren *et al.* ont également démontré qu'une stimulation WKYMVm ne permettait plus aux neutrophiles de répondre à une stimulation fMLF. Par contre, une stimulation fMLF ne réprime pas les réponses induites par une stimulation WKYMVm. Les travaux de Bylund *et al.* ont corroboré ces résultats dans les neutrophiles murins (Bylund *et al.*, 2003).

Bylund *et al.* proposent qu'un récepteur distinct de FPR1 soit responsable de la majorité de la réponse induite par le WKYMVm dans les neutrophiles murins (Bylund *et al.*, 2003). Parce que le peptide fMLF possède deux récepteurs dans les neutrophiles humains : FPR1 et FPRL1 et parce que les antagonistes de FPR1 sont sans effet sur une stimulation par le WKYMVm, Bylund *et al.* suggèrent que le peptide WKYMVm se lie à au moins deux récepteurs murins, FPR-rs2 avec une affinité élevée et FPR1 avec une affinité plus basse. Cependant, ils ne peuvent pas exclure la participation du récepteur FPR-rs1.

Comme Le *et al.* l'ont démontré pour les neutrophiles humains (Le *et al.*, 1999), Bylund *et al.* prouvent que, pour les neutrophiles murins, le peptide formylé fMLF est un activateur de la NADPH-oxydase beaucoup moins efficace que le WKYMVm (Bylund *et al.*, 2003). De plus, contrairement à ce qui est observé pour les neutrophiles humains (Sugawara *et al.*, 1995), le fMLF est un piètre activateur des neutrophiles murins mais son action peut être amplifiée si ces cellules sont préalablement préactivées à l'aide de LPS ou de cytochalasine B (Bylund *et al.*, 2003).

V-2-Régulation des récepteurs des chimioattractants.

V-2-A-Le priming (préactivation)

Le priming correspond au fait que le prétraitement des neutrophiles avec des concentrations non stimulantes d'agonistes ou de certaines substances pharmacologiques peut augmenter la réponse microbicide à un deuxième agoniste ajouté ultérieurement.

Le primer n'induit pas de fonction microbicide mais il optimise cette réponse. Cependant, les détails moléculaires précis impliqués dans le priming demeurent peu clairs (Ali *et al.*, 1997). Il est probable que ces agents modifient les composants de la voie de signalisation des chemoattractants et induisent ainsi une préactivation des cellules. Cependant, le prétraitement des neutrophiles avec une substance pharmacologique peut aussi diminuer la réponse microbicide à un agoniste ajouté ultérieurement. Ce mécanisme est appelé désactivation ou désensibilisation du neutrophile.

V-2-B-La désensibilisation.

Les phagocytes modulent leurs activités chimiotactiques, cytotoxiques, et microbicides en réponse à un vaste nombre de médiateurs. Les réponses aux chemoattractants sont cependant extrêmement régulées. Un phénomène est observé avec tous les récepteurs couplés à une protéine G : en présence d'une stimulation continue, la réponse s'atténue par un processus appelé désensibilisation.

La désensibilisation homologue est spécifique d'un ligand et d'un récepteur donné, elle se produit sur les récepteurs ayant fixé un ligand. Par contre, la désensibilisation hétérologue se rapporte à un processus par lequel l'activation d'un type de récepteur a pour conséquence la désensibilisation des récepteurs inoccupés et de récepteurs différents. Ces deux types de désensibilisation étant largement documentés pour les récepteurs des chemoattractants. Ainsi, suite à une stimulation par le fMLF, il y a aurait non seulement désensibilisation des récepteurs de ce peptide mais aussi une désensibilisation des récepteurs au PAF et au LTB₄. Par contre, l'inverse n'aurait pas lieu. La phosphorylation des récepteurs semble être un déterminant important de la désensibilisation.

Plusieurs classes des kinases sont impliquées dans la phosphorylation des récepteurs. Des kinases activées par des seconds messagers tel que la protéine kinase A et la protéine kinase C sont responsables, au moins en partie, de la désensibilisation hétérologue. Une famille de kinases collectivement connues sous le nom de GRK (G protein coupled receptor kinase) phosphoryle les récepteurs occupés par leur ligand et serait donc responsable de la

désensibilisation homologue. Plusieurs de ces kinases ont été mises en évidence dans les neutrophiles.

Des études ont montré un autre type de désensibilisation, nommé désensibilisation de classe, dans laquelle les récepteurs de peptides chimioattractants (peptide formylé, C5a et IL-8) sont désensibilisés l'un par l'autre mais pas suite à une stimulation par des antagonistes d'une autre classe tels que les lipides (PAF, LTB4). Parce que les peptides formylés, le C5a et l'IL-8 activent la même voie de signalisation et stimulent les mêmes médiateurs, ils sont susceptibles d'exécuter des fonctions biologiques semblables. La désensibilisation classe spécifique peut donc avoir des conséquences biologiques importantes. Elle empêcherait une réponse cytotoxique trop importante, potentiellement dangereuse, sans pour autant atténuer les réponses induites par un autre stimulus et transitant via d'autres voies de signalisation (Ali *et al.*, 1997).

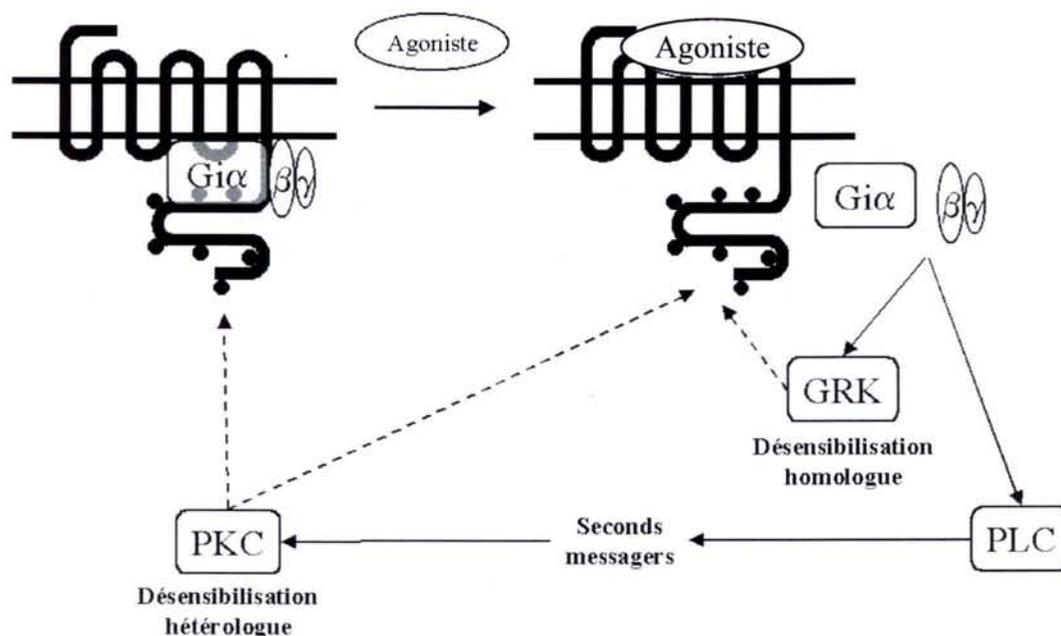


Figure 21 : Régulation des récepteurs de chimioattractant par désensibilisation. Les lignes pleines indiquent l'activation, les lignes cassées indiquent la désensibilisation, les points signalent les sites de phosphorylation du récepteur lors de sa désensibilisation. La phosphorylation des récepteurs par les GRK induit une désensibilisation homologue. Suite à une stimulation par des peptides chimioattractants, tous les récepteurs de chimioattractants subissent une désensibilisation hétérologue via l'activation de la PKC par un second messenger. Les récepteurs de peptides chemoattractants produisent des signaux pour induire une réponse cellulaire et subissent une désensibilisation de classe (Ali *et al.*, 1997).

V-3-Les voies de signalisation intracellulaire des GPCR

Les chemoattractants tels que les peptides N-formylés sont les facteurs principaux de la migration et de l'activation des neutrophiles. La stimulation de ces récepteurs a pour conséquence l'activation de la protéine G qui se traduit par l'activation de la phospholipase C, de la PI3-kinase, de l'adénylate cyclase, etc.

V-3-A-La voie de la phospholipase C.

La PLC catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) pour produire de deux seconds messagers : le diacylglycérol (DAG) et l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃). Le diacylglycérol, en association avec le Ca²⁺, active la protéine kinase C, tandis que l'IP₃ interagit avec un récepteur canal spécifique sur la membrane du réticulum endoplasmique, ce qui permet l'ouverture des canaux et entraîne ainsi la libération de Ca²⁺ contenu dans ces réserves intracellulaires.

Le clonage moléculaire a révélé trois classes de PLC : PLC β , PLC γ et PLC δ , chacune d'entre elles existant sous plusieurs isoformes. Alors que les phospholipases PLC β 1 et PLC β 4 sont activées par la sous-unité α des protéines G de type G_q, les phospholipases PLC β 2 et PLC β 3 sont activées par la sous-unité $\beta\gamma$ des protéines G de type G_i. La phospholipase PLC β 2 est exprimée principalement chez les leucocytes phagocytaires. Elle est activée par des chemoattractants, tel que les peptides formylés, le C5a, et l'IL-8 et indispensable à la réponse microbicide.

Bien que le PAF soit également capable de stimuler la génération d'IP₃ et la mobilisation du Ca²⁺, il semble que ces signaux transitent par l'activation d'une autre protéine G, probablement de la sous-famille G_q, qui emploie G α pour activer une autre PLC que PLC β 2 (Ali *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2000).

V-3-A-a-Les protéines kinases C.

La protéine kinase C (PKC) est une sérine/thréonine kinase. Dans les neutrophiles, au cours de son activation, la PKC migre du cytoplasme vers la membrane plasmique : cette translocation est indispensable pour que l'enzyme acquiert sa compétence catalytique. Pour que ce changement de localisation ait lieu, le calcium et/ou le diacylglycérol interviennent dans le but d'activer la PKC (Bokoch, 1995).

A la suite de son activation, elle est relocalisée vers des compartiments différents présentant les lipides pour lesquels elle présente la plus forte affinité comme la

phosphatidylsérine. C'est seulement au niveau de ces compartiments que la PKC trouvera sa cible: une protéine qui doit être phosphorylée par cette kinase doit être située dans un environnement qui présente une affinité pour la PKC. Il existe donc des systèmes d'ancrage sur chaque compartiment qui assure la spécificité de la réponse.

Les protéines kinases C sont de ce fait impliquée dans différentes fonctions physiologiques de la cellule comme les phénomènes d'apoptose, la conformation de l'actine dans le cytosquelette, la prolifération cellulaire et la différenciation cellulaire ainsi que d'autres fonctions biologiques telles que l'activation de la NADPH-oxydase (Toker, 1998; Dang *et al.*, 2003).

Ces différents effets de la PKC sont surtout dus au fait qu'il existe différentes formes de la PKC. La famille des PKC comprend 11 isoenzymes, bien conservées à travers les espèces. Leurs expressions varient selon le type cellulaire ainsi que leurs fonctions. De même, chaque molécule n'est pas localisée dans les mêmes compartiments cellulaires. Dans les cellules de mammifères, trois classes de PKC ont été mises en évidence: les "conventionnelles" (activables par le DAG, la phosphatidylsérine et le Ca^{2+}), les "originales" (insensibles au Ca^{2+}) et les "atypiques" (calcium dépendante, DAG indépendante et activable par la phosphatidylsérine) (Gomperts *et al.*, 2002). Chaque isoenzyme posséderait des fonctions spécifiques au sein de la cellule (Nishizuka, 1992). Les neutrophiles expriment plusieurs isoenzymes: PKC- α , - β , - δ et ζ (Majumdar *et al.*, 1991; Smallwood et Malawista, 1992; Dang *et al.*, 1994). Les PKC- α et - β sont des enzymes dite "conventionnelle", la PKC- δ est de type "originales" et la PKC- ζ , de type "atypique" (Gschwendt, 1999). Les PKC de type "conventionnel" et "originales" sont également activables par les esters de phorbol tel que le PMA.

L'activation se traduit par une relocalisation de chaque isoforme de la PKC dans des compartiments précis de la cellule. Chaque compartiment est probablement spécifique d'un isoforme précis. A chacun de ces compartiments doit correspondre une ou plusieurs cibles spécifiques, et donc différentes pour chaque isoforme de la PKC. Chaque cible, une fois phosphorylée, entraîne une réponse unique de la cellule. La relocalisation de chaque molécule de PKC semble donc jouer un rôle essentiel dans la spécificité de la réponse cellulaire.

V-3-A-b-L'AMPC et la Protéine Kinase A (PKA).

Lors d'une stimulation par les peptides N-formylés, la concentration d'AMPC s'élève mais les mécanismes responsables de cette augmentation sont encore sujets à débats (Ferretti *et al.*, 2001). Dans le neutrophile, aucun lien direct entre le récepteur au fMLF et l'adénylate

cyclase n'a pu être mis en évidence (Verghese *et al.*, 1985) et l'éventuelle action inhibitrice du fMLF sur l'activité phosphodiesterase de l'AMPc jamais n'a été clairement démontrée (Ferretti *et al.*, 1994). Lors d'une stimulation par les peptides N-formylés, la présence d'inhibiteurs de la PLC (Ferretti *et al.*, 2001) ou de l'adénylate cyclase (Spisani *et al.*, 1996) dans le milieu réactionnel, inhibe l'augmentation de la concentration de ce nucléotide, ce qui suggère que cette enzyme est une cible de la cascade de signalisation de ce peptide.

Simchowicz a précédemment rapporté que le fMLF induit une augmentation passagère des niveaux intracellulaires d'AMPc (Simchowicz *et al.*, 1980). Cette augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc induite par les chimioattractants serait en fait un signal d'arrêt de la réponse microbicide. En effet, en présence de substances capables d'induire une augmentation intracellulaire d'AMPc telle que l'adrénaline, les réponses cellulaires aux facteurs chimiotactiques sont inhibées (O'Dowd *et al.*, 2004). Les travaux de Ahmed ont pu montrer qu'une élévation de la concentration d'AMPc cytosolique inhibe la formation de PIP3 et d'acide arachidonique ce qui suggère une action soit directement de l'AMPc, soit l'action de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) sur la PI3 kinase et la PLA2 (Ahmed *et al.*, 1995). Un rôle anti-inflammatoire de la voie impliquant l'AMPc a ainsi été suggéré (Laudanna *et al.*, 1997).

V-3-B-La voie de la PI3 kinase.

La PI3 kinase est impliquée dans un grand nombre de fonctions et de réponses cellulaires telles que l'adhésion, le chimiotactisme ou la réponse oxydative (Burg et Pillinger, 2001). Cette lipide kinase phosphoryle le PIP2 et génère du PIP3 (Moraes et Downey, 2003).

Le mode d'action du PIP3 est multiple. En effet, certaines protéines cytosoliques, telle que Akt (PKB) ou la PKC sont activées suite à la fixation de PIP3 (Corvera, 2001). Akt est la principale cible de la PI3 kinase. Son activation, par la PI3-kinase, est un constituant des voies d'activation du neutrophile lors de la phagocytose et de la production d'anions superoxydes (Webb *et al.*, 2000).

D'autre part, au cours de la phagocytose, la concentration de PIP3 augmente au niveau de la membrane phagosomal (Vieira *et al.*, 2001; Ellson *et al.*, 2001). Cette constatation laisse penser que le PIP3 serait impliqué dans le déplacement ciblé de la NADPH-oxydase. En effet, pour être fonctionnelle, le complexe de la NADPH-oxydase nécessite la translocation des protéines p47, p67 et p40^{phox} du cytosol vers la membrane plasmique. p40 et de p47^{phox} contiennent des domaines d'homologie (phox domain : PX) qui sont des domaines de liaison aux lipides. C'est cette interaction entre le PIP3 et les domaines PX de p40 et de p67^{phox} qui

attire ces protéines vers la membrane cellulaire (Quinn et Gauss, 2004).

V-3-C-Les protéines G de faibles poids moléculaires : les LMWG.

En plus des protéines G hétérotrimériques, les neutrophiles expriment un certain nombre de protéines G de faible poids moléculaire (LMWG) intervenant dans la cascade de signalisation intracellulaire. Ces protéines peuvent être subdivisées en trois familles principales : ras, rho, et rab. Dans les neutrophiles, Ras est activé par les chemoattractants. Worthen *et al.* supposaient que l'activation de Ras serait directement liée à l'activation de la protéine G et serait indépendante de l'activation de la PLC et de la PKC. Ras active un certain nombre d'autres protéines, y compris la voie des MAP/ERK (MEK) via Raf-1 (Burg et Pillinger, 2001).

Les MAPKs sont des serine/thréonine kinases comprenant les protéines p38, Erk1 et -2, et Jnk. Elles participent aux cascades de signalisation intracellulaire et sont notamment impliquées dans la voie de signalisation non seulement des facteurs de croissance mais aussi dans celle des chimioattractants aboutissant à l'activation du neutrophile. Ces signaux extracellulaires transitent via l'activation par phosphorylation des protéines p38 et/ou p44/42 MAPK (ERK). L'importance de cette voie de signalisation a été démontrée pour les phénomènes d'adhérence, de chimiotactisme et de réponse microbicide (Burg et Pillinger, 2001).

De nombreux auteurs ont établi que l'activation de Ras, et par suite de la voie des MAPK, était sous le contrôle de la PI3-kinase (Knall *et al.*, 1996; Baek *et al.*, 1999). Récemment, les travaux de Mocsai ont démontré une activation de la protéine p38MAPK via les kinases de la famille Src (Mocsai *et al.*, 2000). Pour relier ces deux constatations, Le *et al.* ont émis l'hypothèse que les protéines de la famille Src serait en fait activées via la PI3K (Le *et al.*, 2002). D'autre part, Elzi *et al.* ont mis en évidence l'importance de l'élévation calcique intracellulaire dans l'activation de la p38MAPK (Elzi *et al.*, 2001). D'autres LMWG tels que le rhoA et rac ont été également impliqués dans l'activation des mécanismes d'adhérence, de chimiotactisme et de réponses microbicides telles que la production de dérivés oxygénés par la NADPH-oxydase (Burg et Pillinger, 2001).

V-3-D-Le calcium.

La concentration intracellulaire en calcium libre cytosolique est extrêmement faible ($\leq 10^{-7}$ M) alors qu'elle est élevée dans le liquide extracellulaire (10^{-3} M) et dans le réticulum

endoplasmique. Les pompes SERCA (sarco-endoplasmic réticulum Ca^{2+}) situées dans la membrane du réticulum endoplasmique jouent un rôle important dans le maintien d'une concentration calcique faible dans le cytosol : ces Ca^{2+} -ATPases permettent au réticulum endoplasmique de capter de grosses quantités de calcium du cytosol contre un fort gradient de concentration, même lorsque le niveau de Ca^{2+} dans le cytosol est faible. L'activité des pompes SERCA permet non seulement de pallier la diffusion passive des ions Ca^{2+} des calciosomes vers le cytosol mais aussi de revenir à une faible concentration de calcium cytosolique suite à l'activation de la cellule.

L'activation des récepteurs membranaires aux peptides N-formylés provoque l'activation de la phospholipase C puis la libération du calcium des réservoirs calciques dans le cytosol engendrant ainsi une augmentation rapide de la concentration cytosolique en calcium (Ambruso *et al.*, 1984).

La déplétion des réserves intracellulaires calciques ouvre des canaux calciques dits capacitifs dans la membrane cytoplasmique ce qui provoque un influx calcique soutenu. Le signal induisant l'ouverture de ces canaux est inconnu (Dutta, 2000).

La très forte augmentation de la concentration locale du Ca^{2+} active des protéines intracellulaires sensibles au Ca^{2+} dans la cellule (tel que les PKC par exemple) et est indispensable pour le déclenchement des réponses microbicides (Elzi *et al.*, 2001).

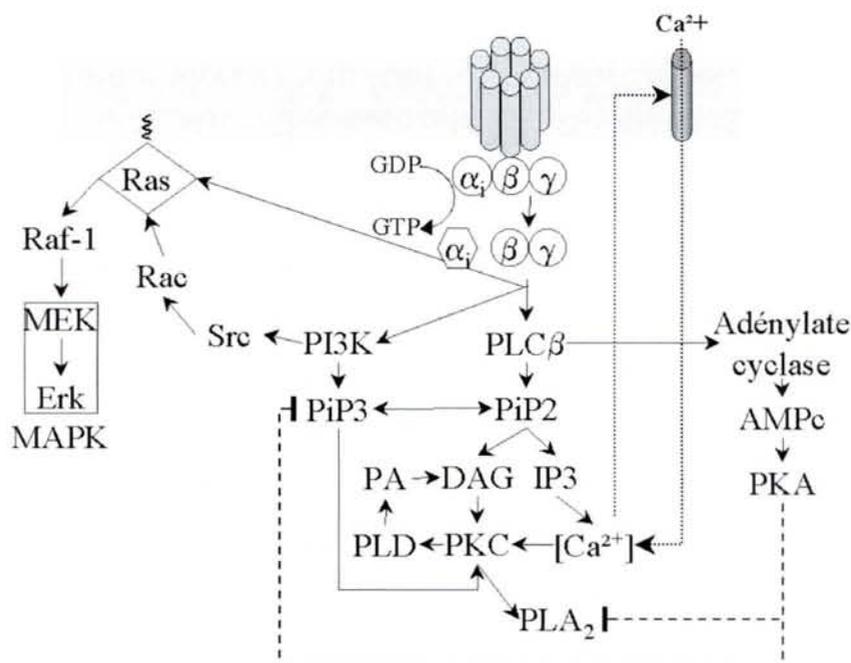


Figure 22 : Voies de signalisation des récepteurs de chimioattractant. Le récepteur est représenté sous forme d'une structure à sept segments transmembranaires couplé à une protéine G hétérotrimérique de type Gi. Les diverses cascades de signalisations ainsi induites aboutissent à la manifestation des réponses microbicides des neutrophiles tels que l'adhérence, le chimiotactisme, la génération de FRO et la sécrétion granulaire (Ali *et al.*, 1997; Burg et Pillinger, 2001; Le *et al.*, 2002).

VI-Dysfonctionnement du neutrophile

Les neutrophiles sont notamment impliqués dans la défense anti-bactérienne. Ils possèdent une variété d'agents biologiques, vraisemblablement pour faciliter leur passage vers les tissus et leur activité microbicide mais ces molécules ont également, paradoxalement, la capacité d'endommager les tissus.

Dans la plupart des cas, la réaction inflammatoire et le déploiement des phagocytes mènent à l'élimination rapide de l'antigène sans induire de lésions tissulaires. Les neutrophiles activés sont ensuite éliminés par apoptose, la production des médiateurs inflammatoires est atténuée et leurs récepteurs désensibilisés. Toutefois, si les antigènes sont difficiles à digérer ou submergent le système immunitaire alors des dommages tissulaires sont susceptibles d'avoir lieu et être la conséquence d'un certain nombre de maladie inflammatoire (Ali *et al.*, 1997). En effet, si l'antigène ne peut pas être ingéré, les neutrophiles libèrent leur contenu lysosomal, de puissantes protéases, et produisent des radicaux toxiques du côté extracellulaire (Weiss, 1989).

Qu'elles soient liées à une absence de neutrophiles, à la déficience ou à l'hyperréactivité de ces cellules, les maladies impliquant les neutrophiles sont beaucoup trop nombreuses pour être ici détaillées. Nous avons choisi de ne citer que les plus connues d'entre elles.

VI-1-Maladies génétiques

L'importance physiologique des neutrophiles se mesure à la gravité des infections qui se développe chez les sujets atteints d'un déficit quantitatif ou qualitatif (déficience de l'une de ces fonctions) de cette cellule.

VI-1-A-Déficit quantitatif : les neutropénies

Il existe de nombreuses variétés de neutropénie parmi lesquelles : la neutropénie congénitale et les neutropénies cycliques.

La neutropénie congénitale, est une agranulocytose génétique infantile. L'incidence annuelle ne dépasse pas 1 cas /300 000 naissances. Le myélogramme montre un blocage isolé de la lignée granulocytaire au stade promyélocyte et le taux de polynucléaires circulants est extrêmement bas. Des mutations du gène de l'élastase, une protéine impliquée dans l'activité protéolytique et anti-bactérienne des polynucléaires, ont été détectées dans un tiers des cas. Ces mutations semblent entraîner un gain de fonction de la protéine et un excès d'apoptose

des polynucléaires, d'où la neutropénie mais le mécanisme exact demeure incertain (Papadaki et Eliopoulos, 2003).

La neutropénie cyclique est caractérisée par une fluctuation régulière des neutrophiles (cycle de 21 à 28 jours). Il s'agit d'une pathologie très rare. La transmission génétique est autosomique dominante et il est surtout remarquable que la mutation responsable de cette anomalie soit située sur le gène de l'élastase comme dans certains syndromes de Kostmann.

Les neutropénies conduisent à des infections constitutionnelles à répétition, de localisation très variable. Les sites les plus fréquents sont cutanéomuqueux, ORL et pulmonaires. Les facteurs de croissance hématopoïétiques, le G-CSF en particulier, ou la transplantation de moelle sont capables de corriger à la fois la neutropénie et la susceptibilité aux infections.

VI-1-B-Déficit qualitatif

Les personnes atteintes de ce type de pathologies ne présentent pas de neutropénies mais une anomalie des fonctions microbicides des neutrophiles tels que la chimiotaxie, la production d'anions superoxydes, un déficit d'une protéine granulaire ou la sécrétion des granules.

LAD (leukocyte adhesion deficiency).

Un déficit en récepteurs $\beta 2$ -intégrines (CD18) ne permet plus aux neutrophiles de migrer vers les sites infectieux (Brown, 1997).

La granulomatose chronique ou CGD (chronic granulomatous disease)

Tous les constituants du complexe NADPH-oxydase sont essentiels pour son bon fonctionnement. Des défauts génétiques des protéines $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p22^{phox}$ et $gp91^{phox}$ sont la cause d'une maladie : la CGD (Chronic Granulomatous Disease). C'est une maladie rare qui concerne 1 cas sur 200 000 (Segal *et al.*, 2000). La majorité de cas sont due à une anomalie sur le chromosome X et engendre une protéine $gp91^{phox}$ anormale (approximativement 70 % des cas). Les autres cas concernent une anomalie autosomal récessive des protéines $p47^{phox}$ (approximativement 30 % des cas), $p22^{phox}$ ou $p67^{phox}$ (2-3%).

Les patients atteints de CGD présentent une production déficiente de dérivés oxygénés. Face à une infection, les réactions inflammatoires sont inefficaces ; l'apparition de nodules lymphatiques suppurants et de granulomes est fréquente ; ils souffrent généralement d'infections bactériennes répétées par des organismes capables de produire de la catalase

(c'est-à-dire capables de détruire l'H₂O₂ produit par les neutrophiles) tels que *Staphylococcus aureus* et *Aspergillus*. Par contre, ils sont capables de répondre à une infection par des organismes produisant de grande quantité d'H₂O₂, comme *Pneumococcus*, car les neutrophiles peuvent utiliser l'H₂O₂ bactérien pour produire les métabolites toxiques.

Les patients présentant la forme récessive liée au chromosome X de la maladie, tendent à développer très précocement ces symptômes ; cette forme clinique est plus grave que les formes récessives autosomales (Winkelstein *et al.*, 2000).

Un déficit en MPO (myéloperoxydase)

Etant donné l'apparente importance de la MPO, il est surprenant de constater que cette pathologie est relativement commune (1 personne sur 2000 à 4000) et médicalement bénigne. Bien que la défense anti-bactérienne ne soit pas affectée (Burg et Pillinger, 2001), l'absence de MPO ne permet plus à l'organisme de se défendre contre les infections fongiques tels que *Candida albicans* ou *Aspergillus* (Aratani *et al.*, 1999; Parry *et al.*, 1981). Une hypothèse pourrait expliquer la raison pour laquelle cette pathologie est en généralement bénigne : bien que la destruction des micro-organismes soit altérée, les neutrophiles restent néanmoins capables d'entrer en apoptose après la phagocytose des particules ; ils sont ensuite, à leur tour, normalement éliminés par les macrophages (Hampton *et al.*, 1998).

L'absence de sécrétion des granules

Le syndrome de Chediak-Higashi est une maladie rare, autosomale récessive, qui affecte les neutrophiles et toutes les cellules renfermant des granules. Cette maladie est due à des mutations d'un gène codant une protéine cytoplasmique impliquée dans le trafic lysosomal : Lyst. Les neutrophiles présentent dans leur cytoplasme, des granules géants résultant de la fusion des granules azurophiles et spécifiques (primaires et secondaires). Les patients développent des infections bactériennes récurrentes, des maladies neurologiques, un albinisme partiel, des dysfonctionnements des plaquettes, et une mort précoce (Burg et Pillinger, 2001).

Les traitements médicaux

Certaines pathologies impliquant un déficit des neutrophiles ne sont pas liées à des dysfonctionnements génétiques des neutrophiles mais à des traitements visant à soigner d'autres troubles.

Ainsi, les patients sous dialyse révèlent une certaine susceptibilité à l'infection bactérienne. Au cours du traitement par dialyse, à savoir l'interaction périodique du sang avec

le circuit extracorporel et la présence d'agents pathogènes dans le dialysat, le système du complément est activé, les molécules chimiotactiques issues de son activation (notamment le C5a) vont activer les neutrophiles et induire la désensibilisation des récepteurs au C5a de ces cellules. Leurs neutrophiles sont ensuite incapables de répondre à une stimulation par le système du complément, ce qui explique que l'infection bactérienne reste la deuxième cause de mortalité des patients dialysés.

De la même façon, la colchicine prescrite pour empêcher les crises de gouttes (hyperuricémie), les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les corticostéroïdes ou les irradiations ionisantes ainsi que certains médicaments contre la malaria, antimicrobien ou antifongiques inhibent par la même la chimiotaxie des neutrophiles (Matzner, 1997).

VI-2-Conditions pathologiques réactionnelles

De nombreuses maladies inflammatoires chroniques sont associées à une hyperactivité des neutrophiles qui contribue à la destruction des tissus. Parmi elles, les maladies pulmonaires (emphysème, mucoviscidose, ...) et les syndromes inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde, rectocolite hémorragique, ...).

VI-2-A-Maladies pulmonaires

La mucoviscidose (CF : cystic fibrosis)

La mucoviscidose est caractérisée par une destruction lente et progressive des voies respiratoires qui conduit à la mort du patient. L'inflammation chronique qui détruit les poumons dans la mucoviscidose est dû en grande partie à l'activation et à l'accumulation des polynucléaires neutrophiles mais les causes de cette inflammation ne sont pas clairement établies.

Cette maladie pourrait être due à une mutation du gène CF qui entraînerait un défaut ou une déficience de la protéine CFTR et conduirait à un changement de la surface des voies respiratoires. Ce changement favorise les infections, notamment avec *Pseudomonas aeruginosa*, qui normalement est non pathogène pour l'Homme. De nombreuses cellules du système immunitaire, notamment des neutrophiles, envahissent les poumons afin de combattre cette infection. Les polynucléaires neutrophiles libèrent des réactifs oxygénés et de nombreuses enzymes (hydrolases, protéases). Ces cellules participent à la destruction des bactéries lors d'une infection mais en cas d'une activation massive des polynucléaires neutrophiles, elles détruisent le tissu pulmonaire. La réaction immunitaire est donc excessive et endommage le tissu pulmonaire. Ceci va favoriser le maintien de l'inflammation et le

développement d'une nouvelle infection. Un cercle vicieux se met en place et mène à une inflammation chronique et à la destruction progressive du poumon (Konstan et Berger, 1997).

De plus, les neutrophiles ont une durée de vie limitée et meurent sur place dans les poumons. Ils se décomposent et libèrent une quantité importante d'ADN qui rend les sécrétions très visqueuses et encombrant les voies respiratoires. En fait, le "crachat" des patients contient beaucoup d'ADN qui est plus d'origine humaine que bactérienne (Smith *et al.*, 1988).

L'emphysème

La dégranulation des neutrophiles dans le milieu extracellulaire pourrait engendrer des dommages tissulaires. Pour limiter ces dommages collatéraux, il existe dans le plasma et les fluides extracellulaires, un puissant inhibiteur de protéases : l' α -1 antiprotéinase.

L'emphysème serait une complication d'une insuffisance de cette protéine. Son absence ne permettrait plus de contrebalancer l'action de l'élastase, sécrétée par les neutrophiles, au niveau des alvéoles pulmonaires. Cette déficience en α -1 antiprotéinase pourrait être induite par la fumée de cigarettes dans les fluides alvéolaires (Janoff, 1985; Cantin et Crystal, 1985). En effet, les neutrophiles et les macrophages répondraient à cette "intrusion" par la production de dérivés oxygénés (Hubbard *et al.*, 1987) qui inactiverait cette protéine en oxydant une méthionine (Clark *et al.*, 1981).

VI-2-B-Syndromes inflammatoires

La polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie chronique, inflammatoire et auto-immune qui affecte principalement les articulations. Les signes de la maladie sont dus à l'inflammation, au gonflement des articulations créant parfois de graves déformations ou à la destruction de celles-ci. Parfois, d'autres organes sont aussi touchés : coeur, poumon, système nerveux, peau. Sa prévalence dans la population caucasienne est généralement estimée à 1%, avec une prédominance féminine (2 à 3 femmes pour 1 homme) (Alarcon, 1995).

L'origine certaine de la maladie reste à ce jour inconnue mais il existe des arguments permettant d'incriminer des facteurs de l'environnement, en particulier certains microorganismes. Dans un contexte génétique particulier, l'agent infectieux, sous la forme d'un antigène serait responsable d'une anomalie de la réponse des neutrophiles qui, très augmentée, conduirait de manière chronologique à une inflammation aiguë puis chronique des articulations. Cette inflammation chronique évolue ensuite par poussées successives qui

conduisent à une destruction de l'articulation. La destruction articulaire semble liée à la présence des polynucléaires synoviaux comme en témoignent les marqueurs de la dégranulation (MMP-8 ou collagénase et β -glucuronidase).

Les maladies intestinales inflammatoires chroniques

Elles comprennent deux pathologies : la colite ulcéreuse chronique (rectocolite hémorragique) et la maladie de Crohn. Le symptôme majeur de la première est une inflammation profonde de la paroi intestinale alors que la maladie de Crohn se caractérise par l'inflammation chronique de toutes les couches de la paroi intestinale et atteint le mésentère et les ganglions lymphatiques régionaux (Riddell R.H., 1999). La cause de ces pathologies demeure à ce jour inconnue.

Les lésions inflammatoires sont la conséquence d'une hyper-activation du système immunitaire intestinal, elle-même due à l'action de facteurs d'environnement inconnus sur un terrain susceptible d'être génétiquement déterminé. Un stress oxydant important est créé par la production d'espèces radicalaires produites par diverses cellules infiltrées dans la muqueuse interstitielle (lamina propria): neutrophiles, éosinophiles, monocytes, macrophages. Cette infiltration de cellules inflammatoires est accompagnée par des lésions de la muqueuse allant jusqu'à des ruptures de la matrice intestinale, des œdèmes, des nécroses de l'épithélium et enfin des ulcères (Riddell R.H., 1999).

Les cancers :

Les radicaux libres produits par les neutrophiles sont tout à fait capables de générer des mutations de l'ADN des cellules et d'induire par la suite, l'apparition de tumeurs bénignes voir malignes (Weitzman *et al.*, 1985; Tamatani *et al.*, 1999). De plus, il est également maintenant bien établi que les inflammations chroniques, notamment la libération des radicaux oxydants, prédisposent à la formation de tumeur (Babior, 2000).

VII-Objectifs des travaux de recherches

Les neutrophiles jouent un rôle important dans la défense anti-infectieuse de l'organisme. Cependant stimulé de façon excessive ou inappropriée, il peut être source de lésions tissulaires. De nombreux mécanismes sont impliqués dans la régulation du fonctionnement des neutrophiles, intervenant en potentialisant ou en limitant ce fonctionnement. Ces mécanismes encore mal connus peuvent être déclenchés par une grande variété de facteurs.

Depuis la création de nombreuses souris transgéniques, on a assisté à un nouvel intérêt pour l'étude de l'immunité naturelle de cet animal. Pour exploiter ce modèle expérimental, il faut d'abord connaître son fonctionnement normal. Il faut également comparer les expériences sur la souris avec nos connaissances sur l'Homme afin d'apprécier à quel point la souris peut servir de modèle et identifier les limites du modèle.

1. Chez l'Homme, le réservoir de neutrophiles de la moelle osseuse est connu, mais sa capacité fonctionnelle n'a pas été étudiée. La première étape du projet consistait à comparer les réponses bactéricides de deux populations de polynucléaires neutrophiles : ceux issus de la moelle osseuse et ceux isolés à partir du sang périphérique. Les cellules de moelle osseuse sont généralement considérées comme immatures. Pourtant, la majorité des études effectuées chez la souris, utilisent des neutrophiles préparés à partir de la moelle osseuse afin de disposer de plus de cellules pour les expérimentations. Il nous a donc fallu dans un premier temps mettre en place des méthodes permettant de purifier ces deux populations cellulaires et d'analyser les différentes fonctions de ces cellules : la production de d'anions superoxydes ainsi que la sécrétion des granules primaires et secondaires. Une des difficultés du sujet vient du fait que l'on ne peut prélever que peu de sang à une souris, les cellules du système immunitaire sont rares et les neutrophiles moins nombreux que chez l'Homme. Il est recommandé de ne pas dépasser 15 à 20 % du volume sanguin soit 350 µl pour une souris de 25g (volume sanguin : 1,8 ml).
2. Le WKYMVm est un peptide non formylé, connu pour activer un récepteur de la famille des "FPRs" et activer les fonctions bactéricides des neutrophiles. Dans un premier temps, nous avons étudié les effets de ce peptide sur les fonctions bactéricides des neutrophiles murins puis nous les avons comparé à ceux observés en présence de fMLF. Les récepteurs et les voies de signalisations du peptide fMLF étant désormais bien définis, l'objectif suivant consistait à identifier quel(s)

récepteur(s) et quelles voies de signalisation étaient mises en jeu par cet hexapeptide.

3. *In vivo* et *in vitro*, les neutrophiles humains meurent spontanément par apoptose et présentent une demi vie de moins de 24h. Cependant, les neutrophiles étudiés aux sites inflammatoires ont une durée de vie beaucoup plus longue. Une grande variété d'agents, agissant par des voies de signalisation multiples et complexes, peut moduler l'apoptose du neutrophile. Ce processus de mort cellulaire est essentiel à la résorption de l'inflammation. Après avoir comparé le temps de demi-vie des deux populations de neutrophiles (sang périphérique / moelle osseuse), nous avons voulu savoir si différentes concentrations de peptides fMLF et WKYMVm, étaient capables d'influencer le temps de demi-vie de ces cellules. Enfin, nous avons comparé les voies de signalisations mises en jeu non seulement par ces deux peptides mais aussi par différentes concentrations de ces peptides.

Certains micro-organismes résistent à la destruction par les phagocytes (notamment les neutrophiles) et sont sources de maladies infectieuses graves. Mieux comprendre la régulation des fonctions bactéricides chez les polynucléaires neutrophiles, c'est mieux comprendre les points faibles de nos défenses immunitaires.

Nos recherches ciblent une meilleure connaissance de la physiologie des neutrophiles de souris avec comme perspectives, à long terme, de pouvoir développer des agents pharmacologiques permettant de réguler leurs activités microbicides dans le cadre de nouvelles thérapies modulatrices de l'activation anti-inflammatoire.

Matériel

&

Méthodes

Dear Sir,

I have the pleasure to inform you that your application for the position of [Job Title] has been reviewed and we are pleased to offer you the position.

The terms and conditions of your employment are set out in the attached letter of appointment. Please sign and return this letter to the HR Department by [Date].

We are delighted to have you join our team and we look forward to your arrival on [Start Date].

Yours faithfully,
[Name of HR Representative]

[Name of Company]
[Address]
[City, State, Zip]

Enclosed for you are [Number] copies of the letter of appointment and [Number] copies of the employee handbook.

If you have any questions, please contact [Name] at [Phone Number] or [Email Address].

I–Purification des neutrophiles

I-1-Modèle animal : la souris consanguine de type C57BL6.

Le modèle de la souris offre deux avantages pour comprendre le rôle des polynucléaires neutrophiles lors d'une infection. Premièrement, il permet d'étudier la réponse immunitaire *in vivo* lors d'une infection contrôlée. Deuxièmement, les souris peuvent être génétiquement modifiées. En effet, les souris transgéniques sont un outil très puissant pour la recherche biomédicale. Pour l'étude des maladies infectieuses, par exemple, elles permettent d'étudier les conséquences d'une perte de fonction d'un gène *in vivo* et *in vitro* dans des cellules isolées de la souris.

Les souris C57BL6 sont les souches les plus utilisées pour la création d'animaux transgéniques (par exemples, la souris knock-out élastase (Burg et Pillinger, 2001) ou la souris knock-out myéloperoxydase (Aratani *et al.*, 1999)).

L'étude des polynucléaires neutrophiles de souris permet de mettre en place des méthodes d'analyses des différentes fonctions bactéricides de ces cellules ceci afin de mieux les caractériser et pouvoir par conséquent les comparer à leurs homologues humains.

D'autre part, le savoir-faire nécessaire à l'étude de ces fonctions ainsi acquis pourrait être transposé à l'étude des fonctions de neutrophiles de souris transgéniques tels que des déficientes en protéines G. En effet, les neutrophiles sont activés par de nombreux médiateurs de l'inflammation, tels que les peptides N-formylés, qui agissent via des récepteurs spécifiques couplés à des protéines G hétérotrimérique de la famille Gi/Go.

I-1-A-Conditions d'élevage.

Les expériences ont été conduites sur des souris femelles C57BL6 (Elevage Depré, Saint Doulchard, France), âgées de 3 à 6 mois et pesant 25 ± 2 g ($n = 106$). Elles ont été élevées dans des conditions de laboratoire conformes aux règles de l'éthique animale c'est-à-dire maintenues dans des conditions de température contrôlée ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), profitant de l'éclairage naturel, et disposant de nourriture et d'eau *ad libitum*.

I-1-B-L'alimentation.

La nourriture est un aliment composé complet (A.04, Usine d'Alimentation Rationnel, Epinay Sur Orge, France) qui se présente sous forme de granulés (tableau 5).

Ingrédients : orge, blé, maïs, soja entier expansé, tourteau de soja 50*, concentré de protéines de poisson, son, levure, premix additif, carbonate de calcium, phosphates bicalciques.	
Constituants analytiques : Protéines brutes : 20% ; Matières grasses brutes : 4,5% ; Cellulose brute : 4% ; Cendres brutes : 5,7%.	Additifs : Vitamine A : 15000 UI/kg ; Vitamine D ₃ : 3000 UI/kg ; Vitamine E : 100 mg/kg ; Cuivre : 25 mg/kg

Tableau 5: Caractéristiques des granules servant à l'alimentation des animaux.

I-2-Isolement de polynucléaires neutrophiles de souris

I-2-A-Préparation de neutrophiles à partir du sang périphérique.

Le sang ($350 \pm 50 \mu\text{l}$ prélevé par animal) est obtenu à partir d'une incision de la veine caudale, préalablement réchauffée à l'aide d'une lampe infrarouge, et collecté dans un tube contenant une solution d'HBSS-EDTA-BSA (HBSS, pH 7,2 ; EDTA 15 mM ; BSA 1 %) (Serrander *et al.*, 2000). Après centrifugation (400 g, 10 min, 4°C), le culot cellulaire est remis en suspension dans 1 ml d'HBSS-EDTA-BSA. La suspension cellulaire est alors délicatement déposée à la surface d'un gradient de Percoll[®] 3 couches (figure 23), gradient de 78 %, 69 %, et 52 % Percoll (cf. § Matériel, produits et appareils), respectivement, dilués dans une solution d'HBSS-EDTA-BSA puis centrifugé (1500 g, 30 min, température ambiante, sans freinage).

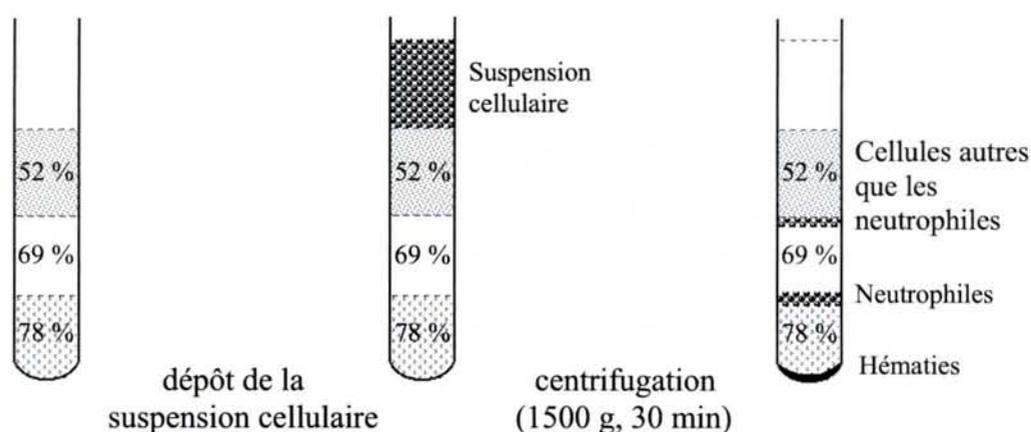


Figure 23: Représentation schématique de la purification d'une suspension cellulaire sur gradient de Percoll 3 couches.

L'indice de réfraction, R.I., de chaque concentration de Percoll a été déterminé à l'aide d'un réfractomètre et la densité (δ) de chaque couche a été calculée en se basant sur les informations du fabricant (figure 24) (52 %, RI 1,347 : $\delta = 1,083 \text{ g/ml}$; 69 %, RI 1,349 : δ

=1,090 g/ml; 78 %, RI 1,350 : $\delta = 1,110$ g/ml). La mesure a été répétée sur 3 préparations de Percoll différentes avec des résultats identiques.

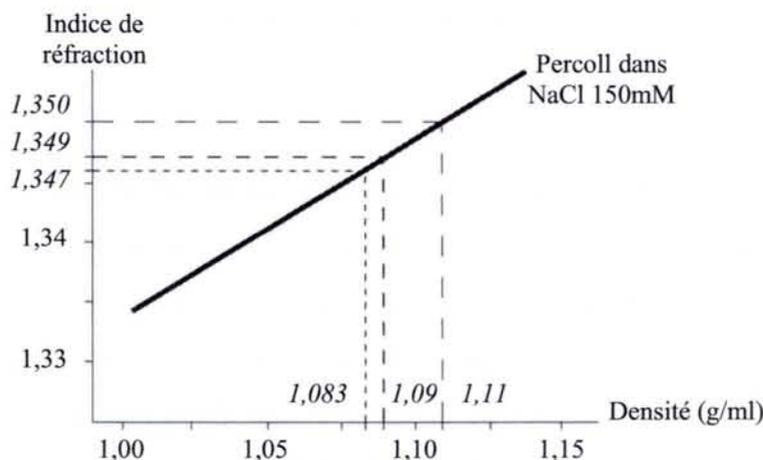


Figure 24: Corrélation linéaire entre l'indice de réfraction et la densité d'une solution de Percoll. Ce dernier sera ajuster à une osmolarité de 340 mOs/kg H₂O à l'aide d'une solution saline (NaCl 150 mM) (source: Amersham Biosciences).

Après avoir finement enlevé les couches cellulaires des phases supérieures, les cellules issues de l'interface 69 % / 78 % ainsi qu'une importante fraction de la phase 78 %, sont soigneusement recueillies dans une tube préalablement adsorbé avec une solution de BSA (BSA 1%, 1 h, 37°C) puis rincés par 3 lavages successifs de 500 μ l de solution tampon HEPES. Il est important que chaque tube susceptible de contenir la suspension de neutrophiles soit préalablement adsorbé par une solution de BSA. En effet, des expériences de chimioluminescence (via la production de radicaux oxygénés par la NADPH-oxydase) ont montré une préactivation des neutrophiles lorsque ceux-ci avaient été recueillis dans un tube non immunoadsorbé.

La phase prélevée est ensuite lavée (HBSS-EDTA-BSA, centrifugation 300 g, 10 min, 4°C), puis les derniers globules rouges sont éliminés de la "fraction neutrophile" par lyse hypotonique (0,5 ml d'eau ultra pure glacée pendant 45 sec puis 0,5 ml de NaCl 1,8 %) suivi d'une centrifugation (300 g, 10 min, 4°C).

Après un dernier lavage dans une solution tampon HEPES, les cellules sont colorées avec la solution de Türks (dilution 1:4) afin d'observer la forme des noyaux. 350 000 \pm 40 000 cellules sont obtenues par saignée, dont 97 \pm 1 % sont des neutrophiles. La suspension de polynucléaires neutrophiles est complétée par un tampon HEPES + glucose (9 mM) afin d'obtenir une concentration cellulaire de 10⁶ cellules/ml et conservée sur de la glace pour être utilisée en moins de 6 h.

La viabilité cellulaire est déterminée par comptage des cellules vivantes et des cellules mortes après coloration des cellules au bleu trypan (dilution 1:1). Les cellules vivantes (viables) n'incorporent pas ce colorant au contraire de cellules mortes. Pour cela, 10 µl de la suspension cellulaire non diluée sont ajoutés à 10 µl de bleu trypan.

I-2-B-Préparation de neutrophiles à partir de la moelle osseuse

Les souris sont sacrifiées par inhalation de dichlorométhane. Les fémurs et les tibias des deux pattes postérieures de l'animal sont soigneusement dégagés de tous tissus mous résiduels. Après avoir délicatement coupé les extrémités distales de ces os longs sur moins de 1 mm, une petite aiguille (26-gauge à biseau épidermal) reliée à une seringue de 1 ml contenant une solution d'HBSS-EDTA BSA est insérée dans l'une des extrémités de l'os (Mocsai *et al.*, 1999). Le contenu des os est extrait en injectant cette solution de telle façon que la suspension puisse couler librement par l'autre extrémité de l'os. La moelle osseuse est récupérée dans un tube Falcon 50, puis plusieurs aspirations - refoulements sont effectués au travers de la seringue surmontée de la même aiguille afin d'obtenir une suspension cellulaire homogène.

Après centrifugation (300 g, 10 min, 4°C), le culot cellulaire est remis en suspension dans 1 ml d'HBSS-EDTA-BSA. Les cellules sont alors purifiées sur un gradient à 3 couches de Percoll exactement comme décrit précédemment (§ I-2-A). Ensuite, une coloration des noyaux à la solution de Türk et une détermination de la viabilité cellulaire par la solution de bleu trypan sont effectuées. $6 \pm 0,6 \times 10^6$ cellules sont recueillies par souris dont $94 \pm 1 \%$ de ces cellules sont morphologiquement semblables à des neutrophiles matures (noyaux en bandes et segmentés).

I-3-Isolement de polynucléaires neutrophiles humains à partir du sang périphérique

Les neutrophiles humains issus du sang périphérique (90 ml) sont obtenus à partir d'un prélèvement dans la veine antécubitale et collecté dans un tube K3E contenant une solution d'EDTA (15%) comme anticoagulant. Le prélèvement a été effectué sur moi-même par une infirmière diplômée d'Etat dans des conditions de sécurité conformes.

Dans un premier temps, les érythrocytes sont séparés des autres cellules sanguines par sédimentation en présence de Dextran 20 % (1:1) à température ambiante. Dans ces

conditions, la majorité des érythrocytes sédimentent en 30 min. Pour séparer les neutrophiles des monocytes, des lymphocytes, et des plaquettes, le surnageant enrichi en leucocytes est prélevé et délicatement déposé à la surface d'un gradient continu d'HISTOPAQUE®-1077 puis centrifugé (1000 g, 20 min, température ambiante, sans freinage). Les globules rouges résiduels présents dans le culot de neutrophiles sont éliminés par lyse hypotonique comme décrit précédemment.

Après un dernier lavage dans une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline), les neutrophiles sont remis en suspension dans 200 µl de PBS additionné de 2 % d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases puis identifiés par coloration des noyaux à la solution de Türks. La suspension de polynucléaires neutrophiles ($1,5 \times 10^8$ cellules) est conservée sur glace et utilisée quelques heures après sa préparation.

I-4-Conservation des fractions cellulaires par cytocentrifugation

Des cellules fraîchement isolées ont été fixées sur des lames de verre par cytocentrifugation (40 g, 5 min, température ambiante) et colorées en suivant les instructions du fabricant basée sur la technique de May Grünwald Giemsa (Kit Hemacolor®). Les lames ont été successivement plongées:

- 5 min dans une solution fixative, rincées à l'eau distillée ;
- 5 min dans un réactif de coloration rouge, rincées à l'eau distillée ;
- 5 min dans un réactif de coloration bleu, rincées à l'eau distillée.

Après séchage, les cellules ainsi fixées et colorées sont conservées sous résine. Pour cela, on dépose sur la lame et les cellules, un film de xylène et une lamelle recouverte de résine.

II-Tests fonctionnels

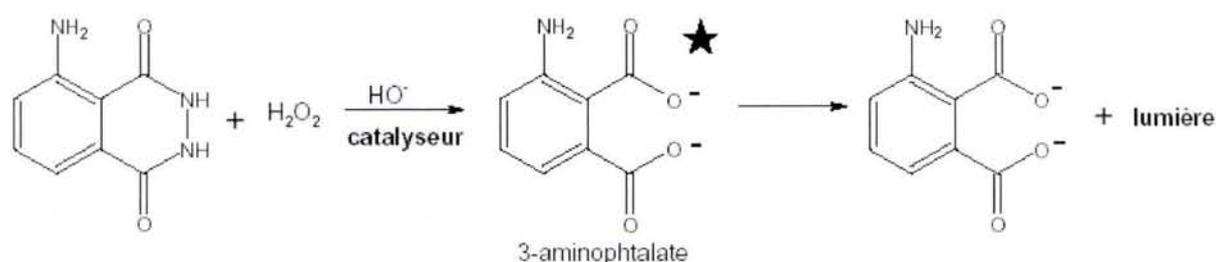
II-1-Détermination de la production d'ions superoxydes par la NADPH oxydase

II-1-A-Principe

Ce test de chimioluminescence fonctionne avec un composé, le luminol. La luminescence du luminol est due à une réaction d'oxydoréduction : les dérivés oxygénés, produits lors de l'activation de la NADPH-oxydase des neutrophiles, oxydent le luminol qui est transformé en un dianion (ion 3-aminophthalate) dans un état excité. Le retour à l'état

fondamental de ce dianion se fait par émission lumineuse. Ces photons lumineux sont quantifiés en RLU (Relative Light Unit) par un luminomètre: le Victor² WALLAC 1420 MULTILABEL COUNTER. La chimioluminescence mesurée est proportionnelle à la quantité de dérivés oxygénés produits. L'appareil est calibré pour effectuer une mesure par puits toutes les 6 sec pendant 5 min.

Pour être optimale, cette réaction nécessiterait toutefois la présence de faibles concentrations de H₂O₂ (produit spontanément à partir de O₂⁻) et la présence de fer qui, comme la plupart des ions métalliques, est un catalyseur de cette réaction (Anderle, 1997).



La HRP, présente dans le milieu réactionnel a pour rôle de transformer l'eau oxygénée (H₂O₂) en O₂ et en H₂O. Elle agirait non seulement comme un catalyseur, grâce a son hème qui contient un ion Fe²⁺/Fe³⁺, mais également comme un régulateur de cette réaction car en présence de trop fortes concentrations de H₂O₂, la réaction du luminol avec les dérivés oxygénés est alors diminuée.

La production de dérivés oxygénés peut être détectée soit du coté extracellulaire, soit du coté intracellulaire puisque le luminol (contrairement à l'isoluminol) peut traverser les membranes biologiques (Bylund *et al.*, 2003).

II-1-B-Protocole

Les puits d'une plaque microtitration blanche Fluoronunc Polysorp sont préalablement adsorbés comme décrit pour les tubes Eppendorfs (§ I-2-A). Les neutrophiles de souris (20000 cellules/puits) sont préincubés (37°C) en présence de 10 µg/ml de Luminol, 5 µg/ml de cytochalasine B (sauf indication contraire), 4 U/ml d'HRP (Horserardish peroxydase) et de milieu tampon HEPES + glucose (9 mM) pour un volume final de 200 µl/puits. La production d'ions superoxydes par la suspension cellulaire contenant le luminol est mesurée par le luminomètre ; elle correspond à l'intégration des photons émis pendant 5 min avant et après l'addition d'agonistes des voies de signalisation ou des canaux calciques.

La chimioluminescence est enregistrée grâce à un programme du luminomètre qui réalise 50 mesures/puits, pour établir une ligne de base. Puis, selon l'expérience réalisée, la production d'ions superoxydes est mesurée en réponse à l'ajout de différentes concentrations d'agoniste déterminées par le protocole. Ces expériences seront effectuées en présence ou non de cytochalasine B ou de différentes concentrations d'inhibiteurs des voies de signalisation cellulaire. Le DMSO (solvant) est utilisé comme témoin à concentration équivalente à celle utilisée pour la dilution de l'agoniste testé.

II-2-Quantification de l'exocytose des granules primaires

II-2-A-Principe

Pour quantifier l'exocytose des granules primaires dans le surnageant de neutrophiles de souris stimulés, nous avons établi une méthode de mesure de l'activité d'une enzyme de ces granules, la β -glucuronidase, via la dégradation d'un substrat qui devient fluorescent après clivage par l'enzyme, le 4-Methylumbelliferyl β -D-glucuronide.

II-2-B-Protocole

Les neutrophiles de souris (20000 cellules/tube) sont préincubés dans des tubes Eppendorf préalablement adsorbés comme décrit précédemment (§ I-2-A), en présence de 5 μ g/ml de cytochalasine B (sauf indication contraire) et de milieu tampon HEPES + glucose (9 mM) pour un volume final de 100 μ l/tube.

Ces préparations sont préincubés 10 min à 37°C avant addition soit de différentes concentrations de fMLF (de 100 nM à 10 μ M) ou de WKYMVm (1 nM à 10 μ M), soit de 1 μ M d'A23187 (ionophore calcique), soit de 200 nM de PMA (activateur de la PKC), ou bien du solvant (DMSO) seul (10 min, 37°C). La sécrétion des granules est ensuite bloquée par un rapide refroidissement des tubes sur de la glace puis en ajoutant 100 μ l de tampon HEPES + glucose (9mM) glacé ; les tubes sont ensuite centrifugés (400 g, 10 min, 4°C).

Des duplicats de 50 μ l du surnageant sont ensuite réalisés afin de déterminer la quantité de β -glucuronidase libérée dans le milieu extracellulaire. Ces aliquotes sont déposés dans deux puits de plaque de microtitration et additionnées de 50 μ l de milieu de réaction (sodium acétate 0,1 M; pH 4,0; Triton X-100 0,02%; 4-Methylumbelliferyl β -D-glucuronide 5 mM). Après 2 h d'incubation à 37°C, la réaction est stoppée par adjonction de 50 μ l d'une solution contenant 0,3 M de glycine/NaOH, pH 10,4, EGTA 10 mM.

La fluorescence émise par la dégradation du substrat 4-Methylumbelliferyl β -D-glucuronide par l'activité de la β -glucuronidase est alors quantifiée à l'aide du lecteur de plaque Victor² à une longueur d'onde d'excitation de 365 nm et une longueur d'onde d'émission de 450 nm.

Après avoir soustrait l'autofluorescence du substrat, l'activité de la β -glucuronidase libérée dans le milieu extracellulaire par les neutrophiles de souris stimulés est exprimée en % d'exocytose. Ce dernier est calculé par rapport à l'activité β -glucuronidase déterminé dans le surnageant de neutrophiles ayant subi une lyse totale à l'aide de Triton X-100 (concentration finale 0,2 %). Le Triton X-100 est un détergent qui déstabilise toutes les membranes, aussi bien plasmiques que granulaires, et permet ainsi la libération du contenu intracytoplasmique et intragranulaire dans le milieu extracellulaire. La totalité des enzymes β -glucuronidase étant libérées dans le milieu réactionnel, son activité est ensuite dosée à l'aide du substrat fluorescent.

On peut ainsi étudier le degré d'exocytose des granules primaires en réponse à l'ajout de différentes concentrations d'agoniste en présence ou non de cytochalasine B ou de différentes concentrations d'inhibiteurs des voies de signalisation cellulaire.

II-3-Estimation de l'exocytose des granules secondaires

II-3-A-Principe

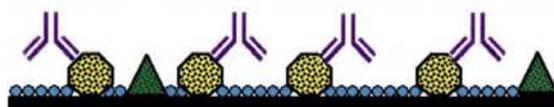
Pour étudier la sécrétion des granules secondaires, nous avons établi une méthode de quantification de la sécrétion de lactoferrine, protéine des granules secondaires dans le surnageant de neutrophiles de souris stimulés, basée sur la technique ELISA.



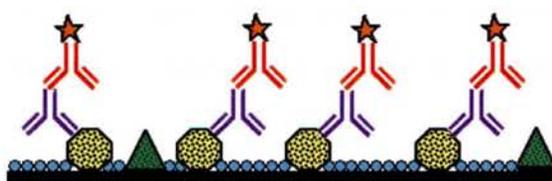
Le surnageant cellulaire est déposé dans les puits d'une plaque de microtitration afin de permettre la fixation des protéines sur le support.



Les sites de fixation non spécifiques sont bloqués par dans une solution de PBS-Tween 1 % additionnée de 2 % BSA



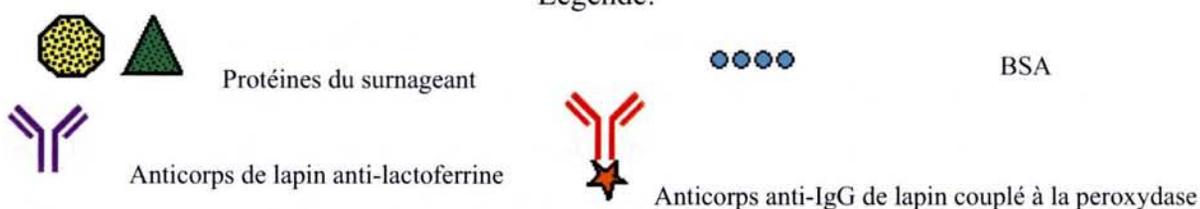
Une solution d'anticorps polyclonaux de lapin anti-lactoferrine est ensuite ajoutée



Une solution d'anticorps polyclonaux de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase et l'addition d'un chromogène (substrat de l'enzyme) permettra la révélation colorimétrique.

Figure 25: Illustration du principe de l'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Légende:



II-3-B-Protocole

Les neutrophiles de souris (20000 ou 50000 cellules/tube) sont préincubés dans des tubes Eppendorf préalablement adsorbés comme décrit précédemment (§ I-2-A), en présence de 5 µg/ml de cytochalasine B (sauf indication contraire) et de milieu tampon HEPES + glucose (9 mM) pour un volume final de 100 µl par tube. Ces préparations sont préincubées 10 min à 37°C avant addition des différents produits à tester ou du solvant (DMSO) seul (10 min, 37°C). La sécrétion est ensuite bloquée par un rapide refroidissement des tubes sur de la glace puis en ajoutant 100 µl de tampon HEPES + glucose (9 mM) glacé ; les tubes sont ensuite centrifugés (400 g, 10 min, 4°C).

Le surnageant (aliquotes 2 x 50 µl) de neutrophiles de souris est dilué deux fois dans un tampon carbonate. Ce volume total de 100 µl de surnageant dilué ainsi que des concentrations connues de lactoferrine humaine (10 pg à 50 ng/puits, diluée dans le même tampon carbonate) sont déposés dans les puits d'une plaque de microtitration Nunc Maxisorp F96 et incubées 3 h dans une étuve à 37°C afin de permettre la fixation des protéines.

Les sites de fixation non spécifiques sont bloqués par une solution de PBS-Tween 1 % additionnée de 2 % BSA pendant une nuit à 4°C. Toutes les manipulations suivantes sont réalisées à température ambiante et séparées par 3 lavages à l'aide de PBS-Tween 1 %. Une solution d'anticorps de lapin anti-lactoferrine (dilution 1/1 000, 1 h) est ensuite ajoutée puis

une solution d'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (dilution 1/10000, 1 h). Ces deux solutions d'anticorps sont diluées dans une solution de PBS-Tween 1 ‰.

La révélation colorimétrique est réalisée à l'aide du système TMB (substrat chromogène de la peroxydase) : après un dernier cycle de 3 lavages à l'aide de PBS-Tween 1 ‰ puis un lavage à l'aide de tampon acétate, 100 µl de tampon TMB sont déposés dans chaque puits (15 min, température ambiante, obscurité). La réaction est ensuite stoppée par l'addition de 50 µl de H₂SO₄ 4N (750 mM H₂SO₄). L'absorbance est déterminée par la lecture à 450 nm à l'aide du lecteur de plaque Victor².

II-3-C-Estimation de la quantité de lactoferrine sécrétée

A partir de l'équation de la sigmoïde obtenue grâce la gamme étalon de lactoferrine humaine et des paramètres établis par le logiciel Origin 6,0 (Microcal Software, USA), et après avoir soustrait les valeurs de bruit de fond du tampon HEPES, la quantité de lactoferrine exocytée par les neutrophiles au cours de l'expérimentation est déterminée. Cependant, les données obtenues sur les échantillons de neutrophiles de souris ne pouvant être exactement quantifiées d'après cette courbe étalon établie sur le dosage de lactoferrine humaine, l'exocytose de lactoferrine des neutrophiles murins a été exprimée par rapport à la quantité de lactoferrine présente dans le surnageant de neutrophiles non stimulés par le solvant (Mocsai *et al.*, 1999).

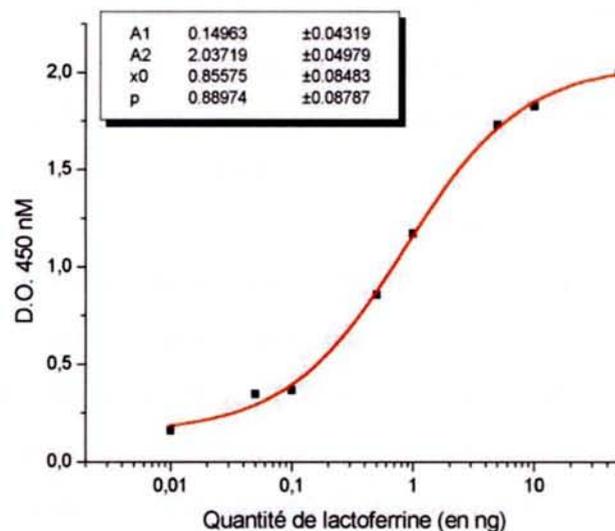


Figure 26 A : Sigmoïde de la gamme étalon de lactoferrine humaine établie par le logiciel Origin 6,0. Cette figure, représentative d'une expérience, est établie à chaque test effectué. Les paramètres fournis par le logiciel (encart supérieur gauche) permettent de déterminer la quantité de lactoferrine libérée par les neutrophiles murins au cours de l'expérience.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2$$

avec y = D.O. 450 nM
 A₁ = valeur initiale soit 0,14963
 A₂ = valeur finale soit 2,03719
 X = quantité de lactoferrine
 X₀ = Ec₅₀ soit 0,85575
 P = pente soit 0,88974

Après transformation mathématique de l'équation, on obtient :

$$x = x_0 \cdot \left(\frac{A_1 - y}{y - A_2}\right)^{1/p}$$

Figure 26 B : A partir de l'équation de la sigmoïde (en haut, à gauche) et des paramètres fournies par le logiciel (en haut, à droite), une transformation mathématique permet de calculer la quantité de lactoferrine libérée (X) par les neutrophiles en fonction de la D.O. 450 nM (y) mesurée dans les puits par le immunoabsorbé.

II-4-Immunoempreinte préalable à l'ELISA.

Aucun anticorps anti-lactoferrine murine n'étant actuellement disponible chez les fournisseurs, nous avons testé la spécificité d'un anticorps anti-lactoferrine humaine par immunoempreinte. Cette détection se fait non seulement dans le surnageant de neutrophiles (humains et murins) stimulés mais aussi dans le surnageant de neutrophiles préalablement lysés. Ceci nous a permis d'une part de s'assurer que les neutrophiles murins contiennent une quantité de lactoferrine détectable mais également de comparer les masses moléculaires des protéines humaines et murines sur gel de polyacrylamide 10 %.

II-4-A-Préparation des extraits protéiques

Les suspensions cellulaires de neutrophiles humains et murins, purifiés selon les protocoles décrits dans les paragraphes précédents, ont été divisées en 2 lots :

- les premiers lots de neutrophiles sont préincubées 10 min à 37°C en présence de cytochalasine B (5 µg/ml) puis les cellules sont stimulées par addition de PMA (200 nM) pendant 30 min. Après centrifugation (400 g, 10 min, 4°C), le surnageant est aliquoté, plongé dans l'azote liquide et conservé à -80°C.

- les seconds lots sont dans un premier temps sédimentés par centrifugation (400 g, 10 min, 4°C). Le milieu est éliminé et le culot est repris par 1,5 ml de tampon de lyse (20 mM Tris, 400 mM KCl, 20 % glycérol, 2 mM DTT) additionné de 2 % d'inhibiteurs de protéases. Après 20 min sur glace, les cellules subissent ensuite trois cycles de congélation à l'azote

liquide / décongélation sur glace. Chaque extrait cellulaire est ensuite centrifugé (400 g, 10 min, 4°C), le surnageant est aliquoté, plongé dans l'azote liquide et conservé à -80°C.

II-4-B-Protocole de dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales est réalisé à l'aide du kit RC-DC Protein Assay (Biorad). Cette analyse est une analyse colorimétrique de quantification de protéines directement dans les mélanges complexes, basée sur le protocole de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Dans un premier temps, une gamme étalon de d'albumine sérique bovine (BSA) allant de 0 à 2 mg / ml est préparée dans de l'eau pour un volume final de 25 µl.

A chaque échantillon (25 µl de solution de BSA témoin ou de lysat cellulaire à quantifier) sont ajoutés 125 µl de réactif I (1 min, température ambiante) puis 125 µl de réactif II. Après homogénéisation, la solution est centrifugée (15 000 g, 5 min). Une fois le surnageant retiré, le précipité est solubilisé dans 127 µl de réactif A' (obtenu en mélangeant 5 µl de réactif S pour 250 µl de réactif A selon les indications du fabricant), passé au vortex et incubé 5 min à température ambiante. 1 ml de réactif B est ensuite ajouté dans chaque échantillon et immédiatement homogénéisé à l'aide d'un vortex.

Après incubation (15 min, température ambiante, obscurité), la DO à 750 nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Une droite de régression représentant la DO_{750} en fonction de la concentration protéique est tracée à partir de la gamme étalon. La concentration protéique des extraits est déterminée à partir de l'équation de la droite de régression linéaire (Lowry *et al.*, 1951).

	Traitement	Concentration en protéines totales en µg/µl	Nombre de cellules	Volume disponible
Neutrophiles murins	Surnageant PMA 200nM	ND	15.10 ⁶	45µl
	Lyse azote	1,20	12.10 ⁶	170µl
Neutrophiles humains	Surnageant PMA 200nM	0,56	25.10 ⁶	210µl
	Lyse azote	2,26	60.10 ⁶	160µl

Tableau 6: Tableau récapitulatif des concentrations en protéines totales et des volumes de surnageant cellulaire obtenus suite aux traitements des deux lots de suspensions cellulaires (murin et humain).

II-4-C-Electrophorèse et transfert sur membrane

Le tampon de Laemmli 4X (250 mM Tris HCl pH 6,8, 8 % SDS, 40 % glycérol, 0,1 % bleu de bromophénol, 20 % β -mercaptoéthanol) est ajouté à chacun des extraits (1/4 volume final). Les protéines sont dénaturées par chauffage pendant 10 min à 95°C avant d'être séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide (10 %) en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Les protéines, alors chargées négativement, migrent selon leurs masses moléculaires respectives.

Des quantités de protéines définies selon un protocole (cf. tableau 7) sont déposées dans les puits. Un mélange de marqueurs de poids moléculaires (Low Molecular Weight Calibration Kit) est également utilisé.

	Marqueur de taille	Lf purifiée	BSA	PMN humains		PMN murins	
Traitement				PMA	Lyse à l'azote	PMA	Lyse à l'azote
Quantité déposée		40ng	500ng	3 μ g	1 μ g	ND	18 μ g
Equivalent en nombre de cellules				0,64x10 ⁶	0,17x10 ⁶	2,53x10 ⁶	1,11x10 ⁶
Volume final	10 μ l	2,77 μ l	6,66 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l

Tableau 7 : Protocole du dépôts des échantillons de protéines déposés dans les puits du gel de polyacrylamide (Lf : Lactoferrine ; * : protéines totales ; ND : non déterminé car trop faible).

La migration s'effectue durant 3 h à 120 V dans un tampon de migration (24,7 mM Tris, 191 mM glycine, 1 % SDS, pH 8) (Minigel Biorad).

A l'issue de la migration, le gel est incubé durant 10 min à température ambiante dans du tampon de transfert (48 mM Tris HCl, 390 mM glycine, 20 % méthanol, pH 9,2). Une membrane de Nitrocellulose Hybond™ N™ et deux feuilles de papier filtre Whatmann 3M découpés à la taille du gel sont également préincubées pendant 10 min dans ce même tampon. Ces éléments sont ensuite superposés entre l'anode et la cathode en prenant soin d'exclure toutes bulles d'air du montage. Un transfert semi-sec est réalisé avec le Transblot® semi-Dry (BioRad) durant 1 h à 15 V. La qualité du transfert est appréciée par une coloration réversible au rouge Ponceau S (0,5 %). Le Rouge Ponceau étant un colorant spécifique des protéines, il permet de révéler toutes les protéines présentes sur la membrane après transfert. Cette dernière est incubée 5 min à température ambiante sous agitation dans 10 ml de solution de Rouge Ponceau. Une fois la solution de Rouge Ponceau éliminée, la membrane est aspergée

d'eau distillée afin de permettre la révélation des bandes caractérisant la présence de protéines.

II-4-D-Application des anticorps et révélation

Pour bloquer les sites de fixation non spécifiques, la membrane est saturée par une solution tampon PBS-Tween 1 % contenant 3 % de BSA pendant une nuit à 4°C sous agitation. Toutes les manipulations suivantes sont réalisées à température ambiante et séparées par trois lavages successifs de 5 min sous agitation dans une solution de PBS-Tween 1 % afin d'éliminer les anticorps non fixés.

La membrane est ensuite incubée durant 1 heure sous agitation en présence d'immunoglobulines de lapin anti-lactoferrine humaine (dilution 1/500), puis dans une solution d'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase (dilution 1/10.000). Ces deux solutions d'anticorps sont diluées dans une solution de PBS-Tween 1 %-BSA 3 % et utilisée à température ambiante. Après une dernière série de lavages dans la solution tampon PBS-Tween 1 % (3 x 5 min), l'activité de la peroxydase est révélée par une réaction chimioluminescente via le kit Lumi-Light Western Blotting Substrate puis détectée grâce à un film photographique. Ces films sont ensuite digitalisés et analysés par le système informatique GelDoc2000 system (BioRad, Hercules, CA).

III-Etude des voies de signalisations mises en jeux pour l'activité microbicide des neutrophiles à l'aide d'inhibiteurs spécifiques.

Afin de mettre en évidence les voies de signalisation impliquées dans une stimulation par le peptide WKYVM, nous avons réalisé une série de tests microbicides en présence de différents inhibiteurs (tableau 8) connus pour inhiber les voies de signalisation intracellulaire.

Les suspensions cellulaires (20000 ou 50000 cellules/puits) sont préincubées (5 min, 37°C) en présence de cytochalasine B (5 µg/ ml) et de l'un des inhibiteurs spécifique de cette cascade de signalisation (tableau 8) puis stimulées par 60 nM ou 300 nM WKYVM selon le test microbicide étudié.

Boc-MLF	Protéine inhibée
Peptide C2 (WPLTHTLRHTIW)	Récepteur FPR
Peptide E11 (FPSIHTIRLTQF)	Récepteur FPRL1
H-89	PKA
Ly-294002	PI3-kinase
PD-98059	MAPK (MEK ½)
Staurosporine	PKC
U-73122	PLC
Wortmannine	PI3-kinase
LaCl3	Influx calcique extracellulaire
SKF	Canaux Soc (store operated calcium)
Thapsigargine	Pompes SERCA

Tableau 8: Récapitulatif des différents inhibiteurs des voies de signalisations intracellulaire étudiés.

IV-Détermination de la viabilité cellulaire des neutrophiles de souris

IV-1-Viabilité des neutrophiles en culture.

IV-1-A-Principe

Le test de viabilité cellulaire est une méthode homogène de détermination du nombre de cellules viables en culture basée sur la titration de l'ATP (Adénosine TriPhosphate) intracellulaire présent qui signale une activité métabolique des cellules. En effet, l'ATP est une molécule synthétisée de façon constante par les cellules vivantes, une diminution de la production de cette molécule permet de mettre en évidence une mort cellulaire. La bioluminescence naturelle de l'ATP est donc utilisée comme marqueur de titration de la viabilité cellulaire. Un seul réactif appliqué directement sur la suspension cellulaire va permettre de lyser les cellules puis de générer un signal lumineux proportionnel à la quantité d'ATP. Nous avons utilisé le kit CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (Crouch *et al.*, 1993).

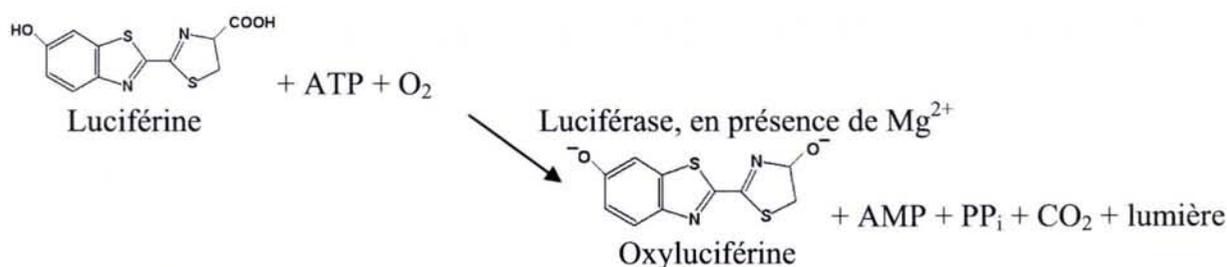


Figure 27: Réaction luciférase. La mono-oxygénation de la luciférine est catalysée par la luciférase en présence de Mg²⁺, d'ATP et d'oxygène.

III-1-B-Ensemencement et traitement

Les neutrophiles issus du sang périphérique ou de la moelle osseuse sont repris dans le milieu de culture RMPI-1640 additionné de 10 % de sérum de veau fœtal décomplementé (1 h, 56°C) et contenant 2 mM de L-Glutamine ainsi que 100 U/ml d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine).

Dans les puits d'une plaque de microtitration blanche, les polynucléaires neutrophiles de souris sont mis en culture à raison de 20000 cellules/puits dans un milieu de culture (décrit ci-dessus) pour un volume final de 50 µl. L'incubation se fera dans une étuve réglée en température (37°C), en gaz (5% de CO₂) et en humidité (90 %).

Afin de déterminer le temps de demi-vie des deux populations cellulaires neutrophiles étudiées, des plaques de microtitration de deux types sont préparées : certaines contiennent des polynucléaires neutrophiles purifiés à partir du sang périphérique, d'autres des polynucléaires neutrophiles isolés à partir de la moelle osseuse. Ces deux populations cellulaires sont mises en culture dans le milieu précédemment décrit.

Pour chaque temps étudié, 3 à 5 puits sont ensemencés. Les cellules seront maintenues en culture pour une période maximale de 48 heures.

A différents temps d'incubation, la plaque est sortie de l'incubateur et repose pendant 20 min à température ambiante. Dans chaque puits est ensuite ajouté un volume de réactif CellTiter-Glo égal au volume présent dans ce puits (50 µl). Il faut homogénéiser le contenu des puits par une agitation orbitale vigoureuse de 2 min pour induire la lyse cellulaire. La plaque repose alors à température ambiante pendant 10 min. A l'issue de cette incubation, le signal luminescent est stable et peut être analysé.

Ce signal luminescent est proportionnel à la quantité d'ATP présent, elle-même proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes dans la culture. La chimioluminescence est détectée en utilisant un lecteur de plaque Victor² et reportée sur une courbe standard pour la détermination du nombre de cellules viables (figure 28).

Afin d'établir cette courbe standard, la bioluminescence de différentes concentrations cellulaires (de 0 à 50000 cellules/puits) est mesurée. Cette gamme nous permet ainsi d'obtenir une relation entre la concentration cellulaire et la luminescence.

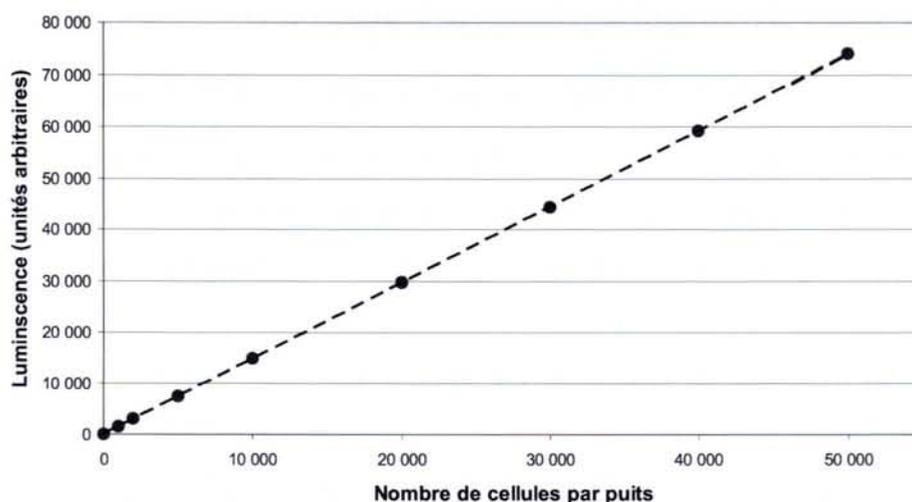


Figure 28: Exemple de corrélation du nombre de cellules et du rendement luminescent. Un rapport direct existe entre la luminescence mesurée avec le CellTiter-Glo™ Assay et le nombre de cellules vivantes présentes dans la culture (de 0 à 50000 cellules/puits).

IV-2-Effets d'agonistes et d'inhibiteurs des voies de signalisation sur la viabilité des neutrophiles

Dans les puits d'une plaque de microtitration blanche, les polynucléaires neutrophiles de moelle osseuse de souris sont mis en culture à raison de 20000 cellules/puits pour un volume final de 50 µl dans un milieu et dans des conditions de culture décrits précédemment.

Nous avons étudié l'influence d'agonistes et d'inhibiteurs des voies de signalisation sur la viabilité des neutrophiles de moelle osseuse. Pour cela, 2 types de plaques de microtitration sont préparés :

- des plaques contrôle contenant uniquement les cellules et le milieu de culture en présence du solvant des produits (DMSO, max. 0,1%);
- des plaques expérimentales dans les puits desquelles seront ajoutés les composés destinés à être testés, soit des inducteurs tels que le fMLF, le PMA ou le WKYMVm, soit des inhibiteurs des voies de signalisation tels que la wortmannine, le LY-294002, le H-89 ou le PD98059, soit un mélange des deux (inhibiteur + agoniste).

Pour chacune des concentrations de la molécule utilisée, 5 puits sontensemencés et les cellules sont maintenues en culture pour une période maximale de 48 heures. A différents temps d'incubation, les plaques de microtitration sont traitées et analysées comme décrit dans le paragraphe III-1-B.

La chimioluminescence détectée dans les différents puits des plaques expérimentales est reportée sur une courbe standard afin de déterminer le nombre de cellules viables présentes.

V-Les voies de signalisations de l'apoptose

V-1-Exploration de l'apoptose cellulaire par coloration cellulaire

Les expériences de viabilité cellulaire, nous ont permis de mettre en évidence une mort cellulaire physiologique du neutrophile en fonction du temps. Nous avons donc cherché à explorer quels mécanismes étaient mis en jeu dans cette mort physiologique du neutrophile de souris.

Deux méthodes de coloration ont été utilisées pour mettre en évidence une apoptose éventuelle :

- l'une permettant l'analyse de la morphologie nucléaire (DAPI, 0,5 µg/ml)
- l'autre permettant de détecter une perte de potentiel membranaire mitochondrial qui est un signe précoce associé à l'apoptose cellulaire (kit Mitocapture™ Apoptosis Détection).

V-1-A-Mise en évidence de l'apoptose cellulaire

V-1-A-a-Etude de la morphologie cellulaire.

La mort cellulaire peut être qualitativement suivie grâce à la microscopie. La comparaison de la morphologie cellulaire des neutrophiles à différents temps de culture permet la détection d'altérations cellulaires. On peut observer par exemple, des gonflements cellulaires et la dégénérescence des corps cellulaires entraînant une réduction marquée de la densité en culture. Cependant, l'observation microscopique ne suffit pas pour identifier le processus de mort cellulaire, qu'il soit d'origine apoptotique ou nécrotique. Une telle distinction nécessiterait l'emploi de la microscopie électronique.

V-1-A-b-Marquage nucléaire au DAPI.

V-1-A-b-a-Principe.

La morphologie nucléaire et la structure de la chromatine sont fortement affectées au cours de la mort cellulaire. La variation des événements nucléaires peut être associée soit à l'apoptose, soit à la nécrose, la différence entre ces événements permettant la distinction entre les deux types de mort cellulaire. L'état du noyau et la structure de la chromatine peuvent être visualisés par incorporation nucléaire d'un fluorochrome, le DAPI (4,6-DiAminido-2-Phenyl Indol) qui se fixe sur les séquences nucléotidiques composées d'une succession de bases A-T.

Un marquage par le DAPI permet donc de mettre en évidence la morphologie nucléaire et d'identifier une condensation de la chromatine caractéristique de l'apoptose (Wolvetang *et al.*, 1994).

V-1-A-b-β-Protocole

Dans les puits d'une plaque de culture 6 puits, les polynucléaires neutrophiles de moelle osseuse de souris sont mis en culture à raison de 500 000 cellules par puits pour un volume final de 3 ml dans un milieu et des conditions de culture décrits précédemment.

Nous avons réalisé deux types de culture cellulaire :

- des plaques contrôles contenant uniquement les cellules et le milieu de culture en présence du solvant des produits (DMSO, max. 0,1 %);

- des plaques expérimentales auxquelles sont ajoutés les composés destinés à être testés: soit des inducteurs à différentes concentrations tels que le fMLF, le WKYMVm ou le PMA, soit des inhibiteurs des voies de signalisation comme la Wortmannine, le LY-294002, le H-89, ou le PD-98059, soit un mélange des deux (inhibiteur + agoniste).

A différents temps d'incubation (4 h, 24 h et 48 h), les cellules sont centrifugées (400 g, 10 min, température ambiante), reprises dans 1 ml d'un mélange éthanol 70 % : acide acétique (3:1) glacé pendant 10 min afin de les perméabiliser puis centrifugées (400 g, 10 min, température ambiante). Les cellules sont ensuite lavées avec 1 ml PBS (centrifugation 400 g, 10 min, température ambiante) et reprise dans 1 ml de PBS contenant de DAPI 1 ‰ afin de marquer leur ADN nucléaire.

Les suspensions cellulaires sont ensuite incubées pendant 5 min à température ambiante puis centrifugées (400 g, 10 min, température ambiante). Après un dernier lavage avec 1 ml PBS (centrifugation 400 g, 10 min, température ambiante). Le culot cellulaire est alors repris dans 50 µl de PBS puis les cellules sont déposées sur une lame de verre sur laquelle elles vont adhérer (10 min) et sont ensuite recouvertes d'une lamelle. La morphologie nucléaire des noyaux sera observée à l'aide d'un microscope. Le nombre de noyaux apoptotiques sera comptabilisé et ramené en pourcentage par rapport au nombre total de noyaux.

V-1-A-b-γ-Discrimination entre nécrose et apoptose

Les cellules vivantes présentent un noyau rond avec une fluorescence diffuse indiquant une chromatine homogène. Les cellules nécrotiques sont caractérisées par des petits noyaux

très réfringents avec une condensation chromatiniennne uniforme, tandis que les cellules apoptotiques montrent une chromatine condensée et fragmenté (Gschwind et Huber, 1997).

Des comptages des cellules présentant les différentes propriétés ont été réalisées dans un minimum de 3 expériences différentes.

V-1-B-Mise en évidence de l'apoptose cellulaire par l'analyse du potentiel membranaire mitochondrial

V-1-B-a-Principe

Le kit MitocaptureTM Apoptosis Détection nous permet de mettre en évidence une perte de potentiel transmembranaire, un phénomène intracellulaire précoce et caractéristique de l'apoptose. C'est un outil simple, basé sur un réactif fluorescent qui permet de distinguer les cellules apoptotiques en détectant les changements du potentiel de membrane mitochondriale. Le kit utilise un colorant cationique, le MitoCaptureTM, qui fluoresce différemment selon qu'il s'agit de cellules saines ou de cellules apoptotiques. Dans les cellules non-apoptotiques, le réactif MitoCaptureTM s'accumule et s'agrège dans les mitochondries, il émet une fluorescence rouge, le cytoplasme étant vert.

Dans les cellules apoptotiques, le réactif MitoCaptureTM ne peut pas s'agréger dans les mitochondries à cause de la perte de potentiel membranaire mitochondriale, il reste ainsi dans le cytoplasme sous sa forme de monomère, il émet une fluorescence verte. Les signaux fluorescents sont détectés par microscopie à fluorescence à l'aide de filtres correspondant aux longueurs d'ondes de la fluorescéine (λ excitation: 510 nm; λ émission: 527 nm) et de la rhodamine (λ excitation: 585 nm; λ émission: 590 nm).

V-1-B-b-Protocole

Les polynucléaires neutrophiles de moelle osseuse de souris sont mis en culture comme décrit dans le § IV-1-B (500000 cellules/puits, volume final 3 ml) et les mêmes types de plaques sont réalisées (plaques de contrôle et plaques d'expérimentations).

A 4 h, 24 h et 48 h d'incubation, les cellules sont centrifugées (400 g, 10 min, température ambiante) puis reprises dans 1 ml de milieu de culture contenant 1 ‰ de réactif MitocaptureTM. Les suspensions cellulaires sont ensuite incubées pendant 15 min dans des conditions de culture cellulaire standard (37°C, 5 % CO₂, 95 % humidité) puis centrifugées (400 g, 10 min, température ambiante).

Le culot cellulaire est alors repris dans 50 µl de tampon PBS puis les cellules sont déposées sur une lame de verre sur laquelle elles vont adhérer (10 min) puis elles sont ensuite recouvertes d'une lamelle. Les cellules sont immédiatement observées à l'aide d'un microscope à fluorescence. Le nombre de cellules présentant une perte de potentiel membranaire est exprimé en pourcentage par rapport au nombre total de cellules.

V-2-Détermination de l'apoptose cellulaire par immunoempreinte

Nous avons étudié l'influence de différents agonistes et les voies de signalisation mises en jeu au cours de l'apoptose des neutrophiles de moelle osseuse par immunoempreinte afin de confirmer les résultats obtenus à l'aide du kit MitocaptureTM Apoptosis Détection.

Nous avons choisi d'étudier la voie mitochondriale de l'apoptose, en analysant l'expression de protéines pro-apoptotiques (Bad, Bax et Caspase-9) et l'implication de la voie PI3K / Akt.

Les suspensions cellulaires de neutrophiles de moelle osseuse de souris fraîchement isolés sont préincubées en présence de 5 µg/ml de cytochalasine B et de milieu tampon HEPES + glucose (9 mM) pour un volume final de 1 ml par tube.

Ces préparations sont préincubées 10 min à 37°C avant addition de différentes concentrations de fMLF ou de WKYMVm, ou du solvant (DMSO) seul. Après incubation à 37°C pendant 30 min, les tubes sont centrifugés (400 g, 10 min, 4°C).

Le milieu est éliminé et le culot est repris dans 1,5 ml de tampon de lyse (20 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 20 % glycérol, 2 mM DTT) additionné de 2 % d'inhibiteurs de protéases. Après 20 min sur glace, les cellules subissent ensuite trois cycles de congélation à l'azote liquide / décongélation sur glace. Chaque extrait cellulaire est ensuite centrifugé (400 g, 10 min, 4°C), le surnageant est aliquoté, plongé dans l'azote liquide et conservé à -80°C.

V-2-A-Préparation des extraits protéiques et dosage des protéines totales

La préparation des extraits protéiques ainsi que le dosage des protéines totales ont été réalisées selon les techniques décrites dans les paragraphes II-4-A et II-4-B.

Compte tenu du matériel nécessaire à la détection des protéines phosphorylées, les extraits protéiques utilisés correspondent à un pool de trois préparations de neutrophiles différentes.

V-2-B-Electrophorèse et transfert sur membrane

Le protocole utilisé est différent de celui permettant de détecter la présence de lactoferrine dans les neutrophiles murins. Le gel SDS-page ainsi que l'immunoempreinte décrits ci-dessous sont modifiés de façon à être mieux adapté pour la détection des protéines apoptotiques.

Le tampon de Laemmli 2X (Tris HCl 125mM, pH: 6,8, SDS 4 %, glycérol 20 %, bleu de bromophénol 0,05 %, β -mercaptoéthanol 10 %) est ajouté à chacun des extraits (v/v). Seules les protéines utilisées pour les immunoempreintes avec les anticorps anti-caspase-9, anti-Bax et anti-Bad sont dénaturées par chauffage pendant 10 min à 95°C avant d'être séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide (10 %) en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Un mélange de marqueurs de poids moléculaires prémarqués est également utilisé (protéines précolorées SDS-page Low Range, Biorad, 161-0305). Dans chaque puits sont déposés 40 μ g de protéines totales.

La migration s'effectue pendant 1h à 140 V (Minigel Biorad) en utilisant un tampon de migration (Tris 24,7 mM, glycine 0,191 M, SDS 1 %, pH 8).

A l'issue de la migration, le gel est incubé durant 10 min à température ambiante dans du tampon de transfert (Tris-HCl 12,5 mM, glycine 46,5 mM, éthanol 95% 20 %). Une membrane de Nitrocellulose Hybond™ N™ (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France) découpée à la taille du gel est préincubée pendant 10 min dans ce même tampon après humidification dans un bain de méthanol.

Un transfert "en phase liquide" est ensuite réalisé durant 1 h à 100 V dans le tampon de transfert décrit ci-dessus. La qualité du transfert est appréciée par une coloration au rouge Ponceau S.

V-2-C-Application des anticorps et révélation

La membrane est saturée pendant 1 h sous agitation dans du tampon PBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 0,01 %) contenant 10 % de lait écrémé en poudre (Régilait®). Toutes les manipulations suivantes ont été réalisées à température ambiante et séparées par 3 lavages successifs de 5 min sous agitation dans une solution de PBS-Tween 1 % afin d'éliminer les anticorps non fixés. Après 2 lavages de 5 min dans le tampon PBS-Tween 1 %, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire (dilution 1/1000 dans PBS-Tween 1 %) pendant 24 h sous agitation. Selon l'expérience réalisée, il s'agira soit de

l'anticorps anti-Caspase 9 (souris spécifique), soit l'anticorps anti phospho-Akt (Ser 473) (Cell Signaling Technology).

La membrane est ensuite incubée (1 h, température ambiante) sous agitation en présence d'une solution d'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (PBS-Tween 1 %, dilution 1/10000). Après une dernière série de lavage dans la solution tampon PBS-Tween 1 % (3 x 5 min) l'activité de la peroxydase est révélée par une réaction chimioluminescente via le kit Lumiglo 20 x / Peroxyde 20 x (Ozyme) puis détectée grâce à un film photographique. Dans le cas de la détection des protéines phosphorylées, les temps d'exposition ont été portés à 24 voir 48 h. Ces films sont ensuite digitalisés et analysés par le système informatique GelDoc2000 system (BioRad, Hercules, CA).

VI-Synthèse et purification du peptide H-WKYMVm-NH₂

Le peptide H-WKYMVm-NH₂ utilisé au cours de ce travail a été synthétisé en collaboration avec le Dr Régis Vanderesse (Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire - ENSIC-INPL, Nancy).

Ce peptide présente deux particularités :

- il possède un acide aminé de type *D* en position C_{term},: une *D*-Méthionine (notée *m*);
- c'est un peptide amide : sa région C_{term} se termine par un groupement amine.

Le concept fondamental de la synthèse peptidique sur support solide (SPPS), initié par Merrifield (Merrifield R.B., 1963), consiste à construire un peptide lié de façon covalente à un support insoluble, en général du polystyrène réticulé par 1 ou 2% de divinylbenzène (Birr C., 1978; Stewart et Young, 1969; Sheppard et Atherton, 1989).

Comme phase solide, nous avons utilisé une résine Rink-amide MBHA (4-méthylbenzhydrylamine) (Senn Chemicals) protégée par un groupement Fmoc. Au contraire des acides aminés *L*, pour lesquels la résine portant le premier acide aminé est disponible dans le commerce, il n'existe pas de Fmoc-***D***-Met-Rink-amide. Il nous a fallu greffer ce premier acide aminé. Comme le lien entre le linker et peptide est une liaison amide, un couplage peptidique classique est adapté.

Leurs résultats montrent que dans les cellules HEK293 transfectées avec le récepteur FPRL1, les dodécapeptides FPSIHTIRLTQF (Peptide 1 = E11) et WPLTHTLRHTIW (Peptide 4 = C2) inhibent la libération de Ca^{2+} intracellulaire suite à une stimulation WKYVM avec un Ic_{50} de 240nM et 300nM, respectivement (Poirey *et al.*, 2003). Ces deux peptides nous ont été fournis gracieusement par l'équipe du Dr Leroy afin que leurs activités biologiques soient étudiées sur les neutrophiles murins.

Ces travaux ont été présentés par le biais d'une communication affichée lors d'un congrès international à Paris, les 23 et 24 octobre 2004 (G Protein Coupled receptor : New insights into signaling and regulation). Ils ont été réalisés par Sylvie Poirey, Eric Gutknecht, Thomas Giller, Olivier Valdenaire et Xavier Leroy (Axovan Ltd., Innovation Center, Gewerbestrasse 16, CH-4123 Allschwil, Switzerland).

VIII-Matériel, produits et appareils

VIII-1-Matériel

- tubes à vis, bouchés, stériles (5 ml, 13x75 mm), en polystyrène, à fond rond (polylabo ref. 05248)
- tubes Falcon 50 ml polypropylène, stériles (Polylabo)
- La collecte des cellules sanguines humaines se fait dans des tubes K3E 15% EDTA, 4,5 ml, 13x75 mm, stérile (BD Vacutainer, Plymouth, UK)
- aiguille 122 mm, diamètre 0,45 mm, stériles (26G * 1/2) (CML, Nemours, France)
- seringue Terumo, sans aiguille, stérile (Polylabo)
- lames de verre LLR 76x26x1 mm (CML, Nemours, France)
- lamelles 24x36 mm (CML, Nemours, France)
- Papier Whatmann 3M (Fischer Labosi)
- Membrane de Nitrocellulose Hybond™ N™ (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France)

VIII-2-Produits

VIII-2-A-Purification cellulaire

- bleu Trypan (Sigma, T 8154)
- BSA, fraction V, (Albumine Bovine Sérum, Sigma, A-7906)
- Cocktail d'inhibiteur de Protéases (pour cellules de mammifères et extraits tissulaires, Sigma, P-8340)

- Coloration Hemacolor® (ref 1.11661, Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Constituants du tampon HEPES (NaCl 140mM, KCl 5mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 2mM, Hepes 10mM; pH 7,4) fourni par Sigma (St. Louis, USA).
- Constituants du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline: NaCl 137mM, KCl 3mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 2mM; pH 7,4) fourni par Sigma (St. Louis, MO, USA)
- D - Glucose (Fluka via sigma)
- Dextran Leuconostoc mesenteroides 500.000 (Sigma, D-52-51)
- Dichlorométhane, (Sigma, D65100)
- HBSS (Hanks' Balanced Salt Solutions, Sigma, H-4891):
 KCl: 0,4 g / l, Potassium phosphate monobasic (anhydre): 0,06 g / l
 NaCl: 8 g / l Sodium phosphate dibasic (anhydre) :0,04788 g / l
 D-glucose: 1g / l
- HISTOPAQUE®-1077 (Sigma, 1077-1)
- Percoll (Amersham Pharmacia Biotech, 17-0891-02)
 - Percoll 100 % (9 volumes de Percoll + 1 volume HBSS 10x + 104 µl de 1 M NaHCO₃)
 - Percoll 52 % (52 % Percoll 100%+ 48 % HBSS 1x additionné de phénol rouge)
 - Percoll 69 % (69 % Percoll 100%+ 31 % HBSS 1x)
 - Percoll 78 % (78 % Percoll 100%+ 22 % HBSS 1x additionné de phénol rouge)
- résine Eukitt (Fischer, A48055775)
- Solution de Phénol rouge (Sigma, P-0290)
- Solution de Türks pour le dénombrement cellulaire (Merck KgaA, 1-09277-0100)
- xylène (Prolabo, ref 28973.294)

VIII -2-B-Tests microbicides

VIII-2-B-a-NADPH-oxydase

- Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione-3-Aminophthalhydrazide) (Sigma, A-8511)
- Peroxydase du radis noir ou Horserardish peroxydase (HRP) (Sigma, P-8375)
- plaque microtitre, en polypropylène, blanche, à fond rond, (NUNC™, Roskilde, Denmark)

VIII-2-B-b-Granules primaires

- 4-Methylumbelliferyl-^{*}B-D-glucuronide Dihydrate (MUG) from Roth (Karlsruhe, Germany); référence 6394-2.

- EGTA (Sigma, E-4378)
- Untreated, 96-well polystyrene stackable Nunc* MicroWell* Plates with flat-bottomed well shapes from Nunc (Roskilde, Denmark); référence A-12-307 via Fischer Polylabo.

VIII-2-B-c-Granules secondaires

- Anti -Rabbit IgG (whole molecule)-Peroxydase antibody produced in goat (Sigma, A-9169)
- Anti-lactoferrine antibody produced in rabbit (Sigma,L-3262)
- DTT (Dithiothreitol, Acros)
- Film photographique (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France)
- Kit Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche Diagnostics France S.A, Meylan, France)
- Kit RC-DC Protein Assay (Biorad, Ivry sur Seine, France)
- Lactoferrine from human milk (Sigma, L0520)
- Low Molecular Weight Calibration Kit (Pharmacia Biotech, Orsay, France)
- Nunc Maxisorp F96 immunoplate from Nunc (Roskilde, Denmark); référence A-12-983-226 via Fischer Polylabo.
- Rouge Ponceau: 5g ponceau S, 30g acide trichloracétique, qsp 1L eau distillé
- Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Sigma, L-4509)
- Solution acrylamide / bis acrylamide 40/1 (Euromedex, Mundolsheim, France)
- tampon acétate : acétate de sodium 100 mM, pH 6,0
- Tampon carbonate : 90mM NaHCO₃, 36mM Na₂CO₃, pH 9.6
- Tampon TMB : 5mg/ml TMB, 10 ml tampon acétate 100mM pH 6.0, 1,2% H₂O₂
- TMB (3.3.5.5'-tetramethylethylenediamine, Chromogenic soluble Substrate for Peroxydase in immunoblotting / IHC) provided by Interchim (Montluçon, France); référence UP-15426D.
- TWEEN[®] 20 (Sigma, P-9416)

VIII -2-C-Viabilité cellulaire

- CellTiter-Glo[™] Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Charbonnières, France).
- DAPI (Calbiochem, 268298)
- Kit Mitocapture[™] Apoptosis Détection (Calbiochem, 475866)
- L-Glutamine 200mM (Sigma, G7513)
- pénicilline et streptomycine 10000 U/ml (Gibco via Invitrogen, 15140-122)
- plaque microtitre, en polypropylène, blanche, à fond rond, (NUNC[™], Roskilde, Denmark)
- RMPI-1640 + 25mM HEPES, sans glutamine (Gibco via Invitrogen, 42401-018)
- sérum de veau fœtal décomplementé (SVF) (Eurobio, S08826)

VIII -2-D-Voies de signalisation

- Anticorps Bad (Cell Signaling Technology, #9292)
- Anticorps Bax (Santa Cruz Biotechnology, SC493)
- Anticorps Caspase-9 (mouse specific) (Cell Signaling Technology, #9504)
- Kit Phospho-Akt Pathway Sampler (Cell Signaling Technology, #9916):
 - * Anticorps Anti-rabbit IgG, HRP-linked
 - * Anticorps Phospho-Akt (Ser473)
- plaque de culture 6 puits, en polystyrène, à fond plat, stérile (Falcon, Becton Dickinson, #353046)

VIII -2-E-Agonistes et inhibiteurs

Les agonistes et les inhibiteurs sont solubilisés à des concentrations variables dans le DMSO, exceptés le chlorure de lanthane et les peptides C2 et E11 qui sont solubilisés dans l'eau.

Les solutions sont stockées à -20°C jusqu'à leur utilisation. Les solutions d'inhibiteurs des voies de signalisation sont maintenues à l'obscurité autant que possible car ces molécules sont sensibles à la lumière. Différentes dilutions de ces solutions sont réalisées juste avant l'addition dans le milieu réactionnel, en prenant garde de ne jamais dépasser une concentration finale en solvant de 1 % (Kahler, 2000).

VIII-2-E-a-Agonistes

- Calcium Ionophore A23187 (Sigma, C-7522)
- Cytochalasine B (inhibiteur de polymérisation de l'actine) (Sigma, C-67-62)
- Diméthyl sulfoxyde (DMSO) (Sigma, D-8779)
- N-Formyl-L-méthionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (fMLF) (Sigma, F-3506)
- Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma, P-8139)
- Triton (Sigma, T-8532)
- peptide WKYMVm (préparé en collaboration avec le Dr R. Vanderesse, LCPM, ENSIC, Nancy)

VIII-2-E-b-Inhibiteurs

- Boc-MLF (F. Boulay, Grenoble)
- C2 (X. Leroy, Suisse)
- E11 (X. Leroy, Suisse)
- H-89 dihydrochloride (Merck, 371962)
- LaCl (Sigma, L-4131)
- Ly-294002 (VWR Calbiochem, 440-204)
- PD-98059 (Merck, 513001)
- SKF-96365 (Sigma, S-7809)

- Staurosporine (Sigma, S-4400)
- Thapsigargin (Sigma, T-9033)
- U-73122 (Cayman via Interchim, 70740)
- U-73343 (Sigma, U-6881)
- wortmannine (Merck, 681675)

VIII-3-Appareils

- Lecteur de plaque Victor² Wallac Multilabel, Perkin Elmer
- Centrifugeuses : Jouan GR 422 et Jouan MR 1812, Saint Nazaire, France
- cuve d'électrophorèse de protéines (Minigel Biorad)
- Cytocentrifugeuse : SHANDON SOUTHERN
- Spectrophotomètre (UV-visible, UV-160A, Shimadzu via Fischer)
- Transblot® semi-Dry (Biorad, Ivry sur Seine, France)

X-Analyses statistiques et traitement mathématiques

Les valeurs sont exprimées selon leur moyenne \pm écart-type moyen. De ces résultats ont été soustrait les valeurs obtenues par l'addition du solvant de l'agoniste testé. Les courbes d'aspect sigmoïdes ont été réalisées à l'aide du logiciel Origin 6.0 (Microcal, Northampton, MA) selon l'équation décrite dans le § II-3-c. A partir de ces graphiques pourront être établis les EC_{50} des agonistes (concentration molaire induisant 50 % de la réponse maximale) ou les IC_{50} des inhibiteurs (concentration molaire permettant une inhibition de 50 % de la réponse maximale) des voies de signalisations utilisées. Dans les expériences impliquant l'utilisation d'inhibiteurs, les résultats seront exprimés en % du contrôle c'est-à-dire généralement le DMSO, excepté pour le $LaCl_3$ et les peptides E11 et C2 où le contrôle sera de l'eau ultrapure.

Les tests statistiques ont été effectués par un test-T de Student. Des valeurs de P inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives et illustrées graphiquement par ★.

Le temps de demi-vie des cellules a été déterminé par la formule : $t_{1/2} = 0,693 \times \tau$ où τ représente le temps constant de mort exponentiel.

Résultats

et

discussion

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

61

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

**La moelle osseuse murine est
un réservoir de neutrophiles
matures**

Résultats

Chez les Mammifères, le sang et la moelle osseuse contiennent une population hétérogène de leucocytes. Chez l'Homme, au cours de la granulopoïèse intramédullaire, il existe un compartiment de réserve médullaire de polynucléaires neutrophiles morphologiquement murs mais fonctionnellement immatures qui interviennent dans la chaîne des mécanismes de défense anti-infectieuse (Berkow et Dodson, 1986). Ils constituent une réserve rapidement mobilisable lors d'une infection. La plupart des travaux chez la souris utilisent des neutrophiles préparés à partir de moelle osseuse afin de disposer d'une quantité suffisante de cellules.

La 1^{ère} partie de nos recherches consiste à étudier la capacité fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles isolés à partir de la moelle osseuse de souris. Pour éclaircir cela, nous avons comparé la population de polynucléaires neutrophiles issus de la moelle osseuse à celle isolée du sang périphérique. Nous avons comparé leur degré de différenciation morphologique et leurs capacités de réponse à un inducteur des fonctions microbicides.

Pour obtenir une population de polynucléaires neutrophiles morphologiquement et peut-être, fonctionnellement matures dans la moelle osseuse de souris, nous avons utilisé le même gradient de densité que celui employé pour séparer les différents types de cellules du sang.

I-Purification de neutrophiles morphologiquement matures chez la souris

I-1-Quantité de cellules disponibles

Pour purifier les neutrophiles du sang et de la moelle osseuse, les différents types de cellules présents dans ces 2 tissus ont été séparés sur gradient de densité. A partir des travaux de Serrander, nous avons tout d'abord réalisé des préparations de polynucléaires neutrophiles sur gradient discontinu de densité, constitué par la superposition de 3 couches de différentes concentrations de PERCOLL® (52 %, 67 % et 75 %) (Serrander *et al.*, 2000). Après étude des différentes fractions cellulaires obtenues par cyto centrifugation et coloration Wright-Giemsa, cette méthode a été améliorée au fur et à mesure. En relevant la concentration des phases inférieures de 67 à 69 % et de 75 à 78 %, nous avons réduit le nombre d'hématies et de cellules non granulocytaires de nos préparations.

Pour cette étude, les expériences ont été menées sur des souris femelles C57BL6 pesant 25 ± 2 g (tableau 9). Selon Chervenick, le tissu hématopoïétique de la moelle osseuse de souris représente 12×10^6 cellules nucléées par gramme de poids corporel et 18,7 % de ces cellules seraient présentes dans les tibias et les fémurs (Chervenick *et al.*, 1968). Les neutrophiles et les précurseurs de neutrophiles constituent environ 40 % des cellules de moelle, valeurs établies à l'aide de la coloration de Wright's et par une coloration de la peroxydase intracellulaire.

43 % de ces neutrophiles présentent un noyau en bande ou segmenté, ces cellules effectrices sont considérées comme restant en stockage dans la moelle osseuse puisqu'elles semblent être les cellules qui seront les plus rapidement libérées dans le sang circulant (Ludwig et Kohn, 1962).

Contenu de la moelle osseuse	Pour une souris de 25 ± 2 g environ
12×10^6 cellules nucléées par gramme de poids corporel	$300 \pm 24 \times 10^6$ cellules
18,7 % de ces cellules seraient présentes dans les 4 os longs de l'animal (2 tibias et 2 fémurs)	$56,1 \pm 4,5 \times 10^6$ cellules
environ 40 % de ces cellules sont des neutrophiles et les précurseurs de neutrophiles	$22,44 \pm 1,8 \times 10^6$ cellules
43 % de ces neutrophiles de moelle seraient morphologiquement matures	$9,6 \pm 0,8 \times 10^6$ neutrophiles de moelle seraient morphologiquement matures dans les 2 tibias et les 2 fémurs d'une souris pesant 25 ± 2 g.

Tableau 9 : Estimation du nombre de polynucléaires morphologiquement matures, purifiés à partir de la moelle osseuse des 4 os longs de souris (Chervenick *et al.*, 1968).

En ce qui concerne le nombre de neutrophiles présents dans le sang périphérique prélevé par incision caudale, Chervenick estime que les neutrophiles représentent 9,9 % des $12,3 \pm 0,7 \times 10^3$ cellules présentes par μ l de sang c'est à dire 1218 ± 69 neutrophiles/ μ l de sang ce qui correspond à $4,38 \pm 0,25 \times 10^5$ neutrophiles pour un volume de prélèvement moyen de 360 μ l. Notre rendement de $3,7 \times 10^5$ correspond donc à 92,6 % des neutrophiles présents dans le prélèvement.

	Volume (μ l)	Rendement ($\times 10^5$)	Pureté (%)	Recouvrement (%)	Viabilité (%)
Moelle osseuse (A)		$88,0 \pm 9,1$	$95,4 \pm 0,7$	$93,9 \pm 9,7$	$96,3 \pm 0,6$
Sang (B)	358 ± 29	$3,70 \pm 0,36$	$96,4 \pm 0,8$	$92,6 \pm 8,4$	$96,5 \pm 0,4$

Tableau 10: Comparaison du rendement, de la pureté, du % de recouvrement (calculé selon les valeurs publiées de Chervenick) et de la viabilité (déterminée par coloration au bleu trypan) des populations de neutrophiles issues du sang et de la moelle osseuse isolés par centrifugation sur gradient de PERCOLL® 3 couches. Moyenne \pm SEM, n = 28 - 41 (Chervenick *et al.*, 1968).

La purification de cellules à partir de la moelle osseuse, nous a permis d'extraire vingt trois fois plus de neutrophiles par souris comparativement aux préparations réalisées à partir de sang périphérique (tableau 10).

I-2-Analyse morphologique des cellules purifiées sur gradient de Percoll

Nous avons montré que les neutrophiles issus de la moelle osseuse (figure 30A) et du sang (figure 30B) présentent un diamètre semblable : $10,12 \pm 0,11 \mu\text{m}$ et $10,57 \pm 0,21 \mu\text{m}$, $n = 71$ et 53 , respectivement.

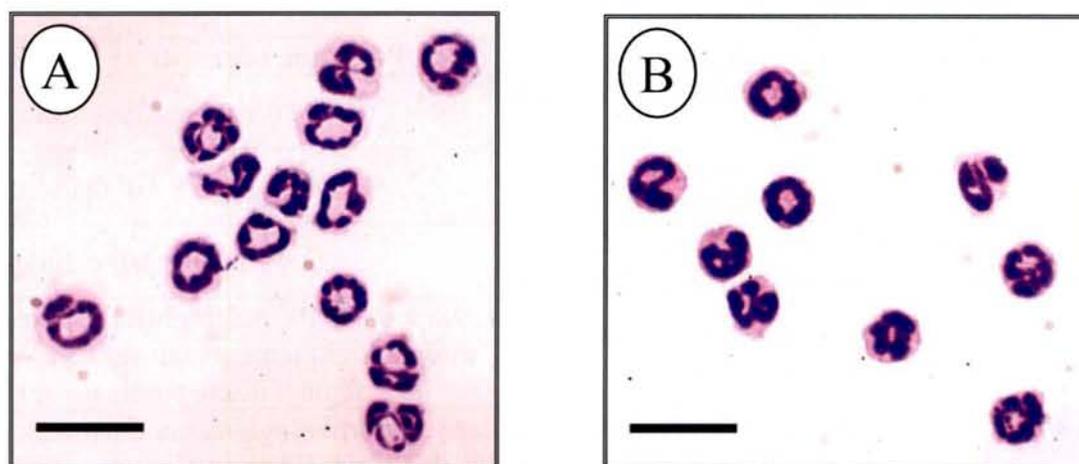


Figure 30: Observation des préparations cellulaires de neutrophiles de moelle osseuse (A) et de sang périphérique (B), issues de l'interface de 69 / 78 % après centrifugation sur gradient de PERCOLL[®] 3 couches, cyto-centrifugation sur lames de verre et coloration Wright-Giemsa. Echelle : barre = 20 μm .

De plus, les cellules présentes dans ces deux préparations présentent un noyau segmenté en forme dite de "doughnut", caractéristique typique du neutrophile de souris.

Nous sommes donc désormais capables de purifier des cellules morphologiquement matures (pureté > 95%) non seulement à partir du sang périphérique mais également à partir de moelle osseuse de souris.

Très peu d'études ont comparé les caractéristiques fonctionnelles des neutrophiles issues de la moelle et du sang. À notre connaissance, aucune de ces études n'a été faite sur des souris. Afin d'étudier si le degré de maturité de ces deux populations était identique, nous sommes principalement intéressés aux fonctions bactéricides du neutrophile qui peuvent être induites par le peptide bactérien fMLF et qui a été largement répandu pour caractériser les

neutrophiles humains (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Les fonctions bactéricides étudiées sont la génération des formes réactives de l'oxygène (FROs) par la NADPH-oxydase mais aussi l'exocytose des granules secondaires et primaires.

II-L'activation de la NADPH-oxydase aboutit à la formation d'anions superoxydes par les neutrophiles murins

II-1-Choix des plaques de microtitration utilisées

Nous avons étudié l'autofluorescence de différents types de plaques de microtitration et la plaque retenue pour les expériences de chimioluminescence est une plaque blanche Nunc Fluoronunc. Sa valeur moyenne de fluorescence est de $75,72 \pm 2,6$ (unités arbitraires, $n = 72$).

Les plaques noires présentaient de faibles valeurs d'auto luminescence mais, contrairement aux plaques blanches, réfléchissent moins bien la lumière émise lors de la dégradation du luminol. Les autres types de plaques blanches ont donné des valeurs d'auto luminescence plus élevées. Quant aux plaques transparentes, leur utilisation est peu recommandée car lors de l'émission de lumière, il peut y avoir "contamination" lumineuse d'un puits sur l'autre. Ces autres types de plaques risquant d'interférer fortement sur les résultats expérimentaux, elles n'ont donc pas été retenues pour ce type d'expérience (tableau 11).

Auto luminescence (unités arbitraires) Nombre de mesures effectuées n = 72	Moyenne	Ecart-type moyen
Corning Fischer Lab. Costar Black plate 3916	25,72	0,76
Corning Fischer Lab. Costar White plate 3916	67,28	1,55
Falcon Plastics Transparent plate	52,06	1,33
Greiner Cellstar Black plate	24,17	0,65
Greiner Cellstar White plate	202,40	7,55
Nunc Fluoronunc Polysorp White plate	75,72	2,60
Nunc U96 PP 0,5 ml White plate	117,31	4,05

Tableau 11 : Autofluorescence de différents types de plaques de microtitration.

II-2-Le peptide bactérien fMLF induit la production d'anions superoxydes par les neutrophiles murins

Nous avons mis au point une méthode de quantification des dérivés oxygénés (formes intermédiaires réactives de l'oxygène : FROs) en mesurant la chimioluminescence émise lors de la dégradation du luminol par les radicaux libres produits lors de l'activation de la NADPH-oxydase. La sensibilité de cette technique nous permet ainsi de travailler sur un faible nombre de cellules (20000 cellules/puits). Les résultats seront exprimés soit en cinétique, soit en production totale (pendant 5 min) d'anions superoxydes. Pour cela, les valeurs du signal lumineux sont intégrées pendant 5 min après la stimulation afin d'évaluer tout le dégagement d'anions superoxydes.

II-2-A-Etude de la production d'anions superoxydes par les neutrophiles sanguins

Pour étudier le phénomène d'explosion respiratoire sur les neutrophiles, nous avons caractérisé l'activité de la NADPH-oxydase en réponse à des concentrations croissantes d'agoniste. La production d'anions superoxydes est enregistrée approximativement 5 min avant et 5 min après l'addition de l'agoniste. La figure 31 illustre la production totale d'anions superoxydes, après stimulation, pour une gamme de fMLF allant de 0,01 à 10 μ M, en présence de cytochalasine B. Nous observons une courbe concentration-effet sigmoïde ce qui nous permet d'établir l' EC_{50} de cet agoniste (cf. Matériel et méthodes, § X).

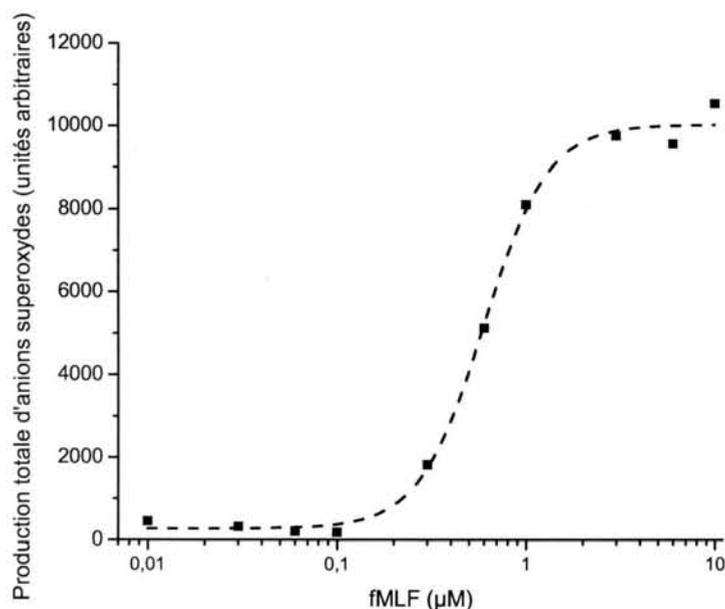


Figure 31: Courbe concentration-effet sigmoïde de la production totale de FRO par des neutrophiles sanguins en présence de cytochalasine B (5 μ g/ml). Cette figure montre une expérience représentative ; $n \geq 3$.

Nous nous sommes parallèlement assurés de l'innocuité du solvant de cet agoniste, à savoir le DMSO, sur la production d'anions superoxydes (figure 32). L'activité de la NADPH-oxydase en réponse à l'addition de DMSO est comparée à celle obtenue en réponse à fMLF 3 μ M. La concentration de fMLF fut choisie à l'aide de la figure 31. En effet, ces résultats préliminaires nous indiquent que la production d'anions superoxydes par les neutrophiles sanguins est maximale à partir de 3 μ M de fMLF.

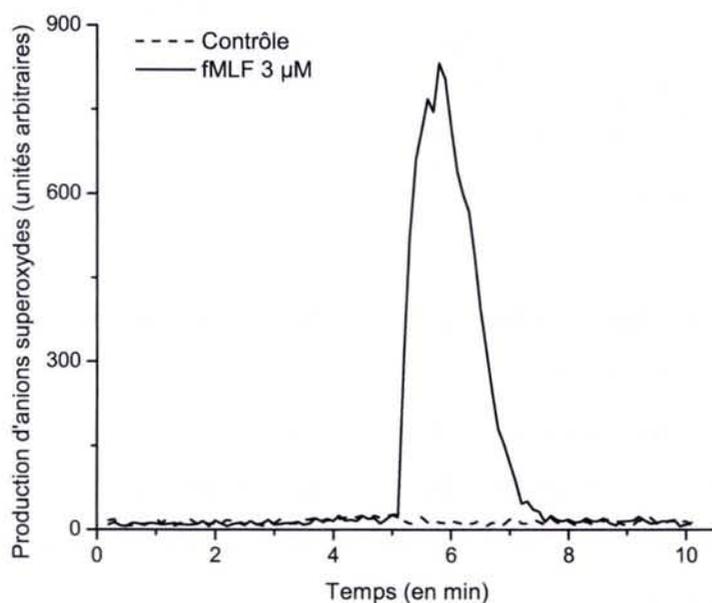


Figure 32 : Cinétique de production d'anions superoxydes par les neutrophiles sanguins suite à une stimulation par 3 μ M fMLF ou par le solvant de cet agoniste, le DMSO, en présence de cytochalasine B (5 μ g/ml). Cette figure montre une expérience représentative ; n = 4.

II-2-B-Etude de la production d'anions superoxydes par les neutrophiles issus de la moelle osseuse

En se basant sur les résultats obtenus à partir des neutrophiles sanguins, nous avons étudié la réponse oxydative de la population de neutrophiles purifiés à partir de la moelle osseuse.

Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir si ces cellules étaient capables de répondre à une stimulation par 3 μ M fMLF. Cette réponse a été comparée à celle obtenue en réponse au solvant DMSO (figure 33).

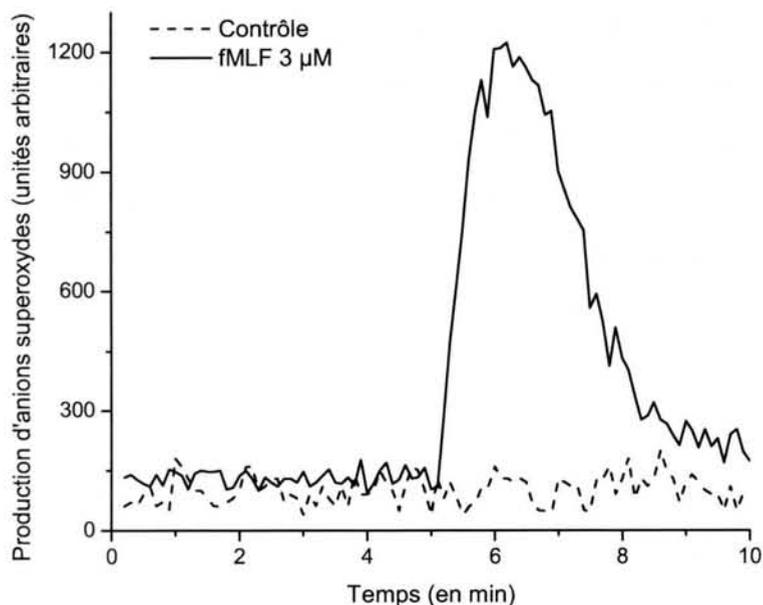


Figure 33: Cinétique de production d'anions superoxydes par les neutrophiles issus de la moelle osseuse suite à une stimulation par 3 µM de fMLF en présence de cytochalasine B (5 µg/ml). Cette figure montre une expérience représentative ; $n \geq 4$.

Le fMLF induit une production rapide et passagère de FROs par les neutrophiles de la moelle osseuse en présence de cytochalasine B.

Nous avons ensuite étudié le phénomène d'explosion respiratoire en utilisant à la fois des neutrophiles de moelle osseuse et des neutrophiles de sang périphérique. La figure 34 représente les cinétiques de production des dérivés oxygénés de neutrophiles de sang (courbe en pointillée) et de moelle (courbe pleine).

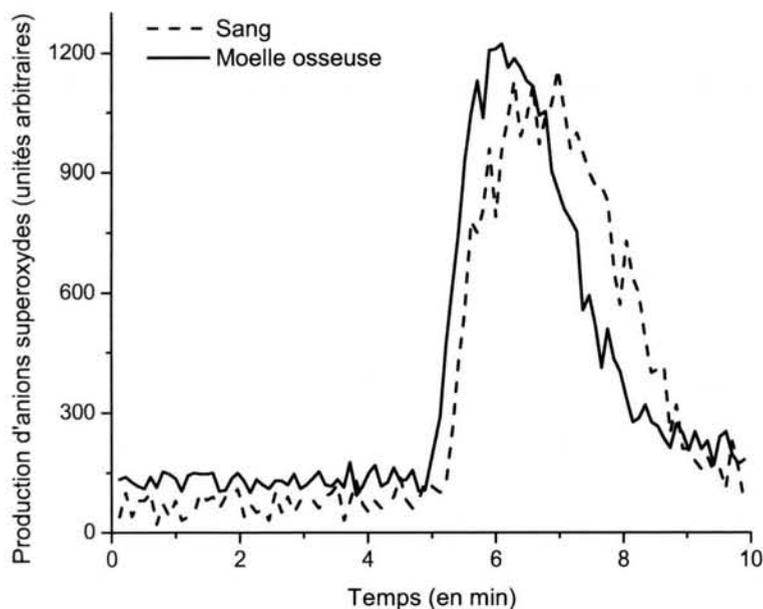


Figure 34 : En présence de cytochalasine B (5 µg/ml), le peptide bactérien fMLF (3 µM) induit la production d'anions superoxydes par les neutrophiles issus du sang périphérique et par ceux issus de la moelle osseuse. Cette figure montre une expérience représentative ; $n \geq 6$.

Ainsi, comparé aux neutrophiles de sang périphérique, les cellules de moelle osseuse ne présentent pas de différences dans la production d'anions superoxydes suite à une stimulation par 3 µM de fMLF.

II-3-Les neutrophiles de la moelle osseuse sont fonctionnels

Nous avons réalisé une comparaison quantitative de la production totale de FRO par les neutrophiles du sang et ceux de la moelle en réponse à différentes concentrations de fMLF pour vérifier si l'une de ces deux populations présentait une meilleure affinité pour ce peptide bactérien (figure 35).

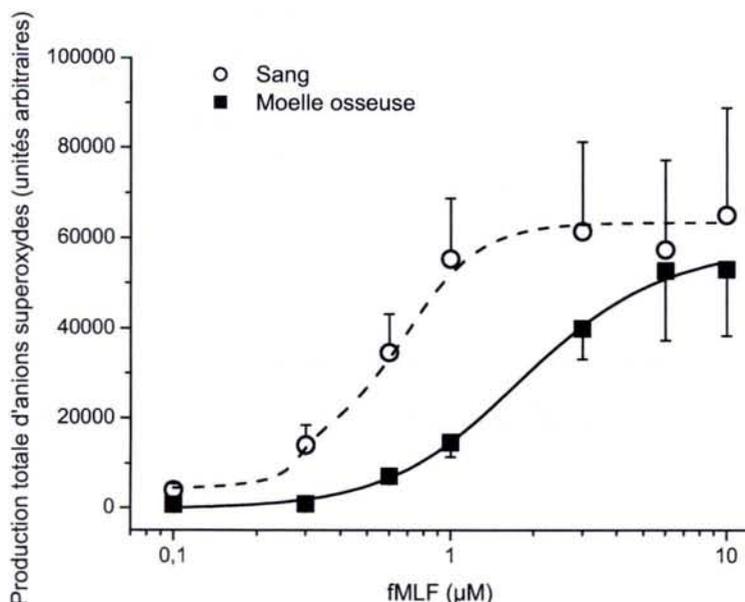


Figure 35: Courbe concentration-effet d'aspect sigmoïde de la production totale de FRO induite par différentes concentrations de fMLF en présence de la cytochalasine B (5 µg/ml). Les points représentent la moyenne de plusieurs expériences ($n \geq 4$). Barres : écart-type moyen.

L' EC_{50} de l'explosion oxydative des neutrophiles murins, en réponse au peptide bactérien fMLF, est de $0,52 \pm 0,1 \mu\text{M}$ pour les neutrophiles du sang et de $2,10 \pm 0,54 \mu\text{M}$ pour les neutrophiles de la moelle osseuse. Les neutrophiles sanguins répondent donc à une stimulation fMLF avec une affinité légèrement plus forte (statistiquement significative, $p < 0,05$) que les neutrophiles de la moelle osseuse.

Nous avons testé des doses plus élevées (jusqu'à 100 µM de fMLF) et aucune n'a mis en évidence d'augmentation de production d'anions superoxydes. Au contraire, à ces fortes concentrations, les cellules de moelle osseuse tendent à diminuer leur réponse oxydative (figure 36).

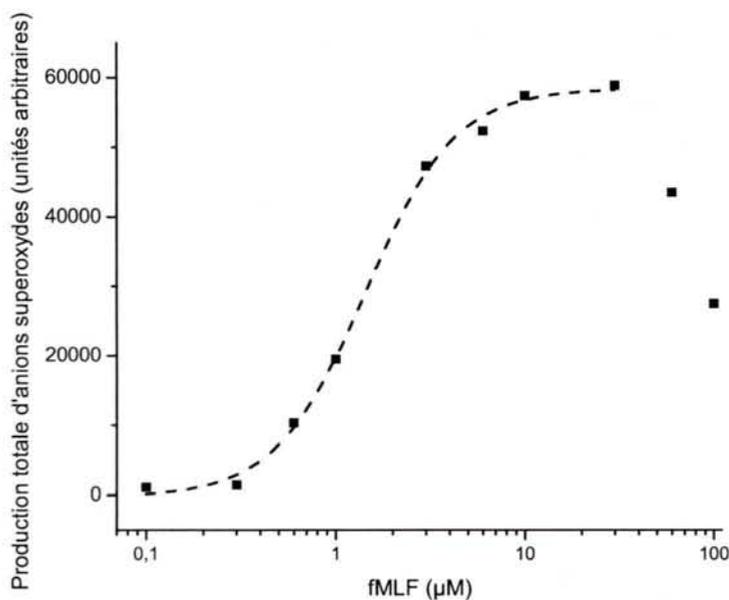


Figure 36: Courbe concentration-effet sigmoïde de la production totale de FRO par des neutrophiles de moelle en présence de la cytochalasine B (5 µg/ml). Cette figure montre une expérience représentative (n > 3).

En ce qui concerne l'explosion oxydative, les neutrophiles de moelle osseuse sont donc aussi fonctionnels que ceux du sang périphérique mais nécessitent des concentrations de fMLF 4 fois plus élevées.

II-4-La réponse oxydative au peptide bactérien fMLF nécessite la présence de cytochalasine B

L'activité de la NADPH-oxydase des neutrophiles en réponse à une stimulation par le fMLF est augmentée par la préincubation des cellules avec la cytochalasine B : un inhibiteur de polymérisation des microfilaments d'actine. En absence de la cytochalasine B, nous n'avons trouvé aucune production de FRO par les neutrophiles de moelle (figure 37). De même pour les neutrophiles du sang. En conséquence, toutes les mesures de production d'anions superoxydes ont été faites en présence de cytochalasine B.

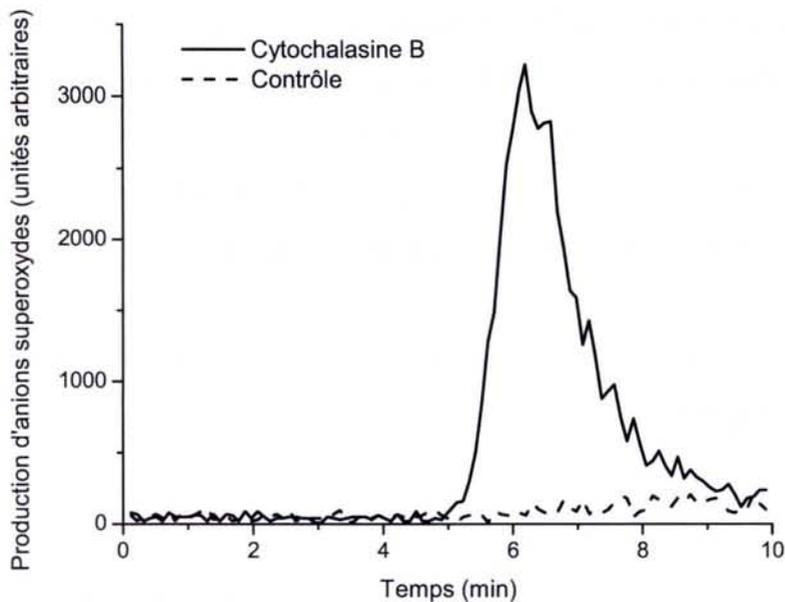


Figure 37 : Effet de la cytochalasine B: des neutrophiles de moelle osseuse ont été préincubées à 37°C en présence (en trait plein) ou en absence (ligne pointillée) de cytochalasine B (5 µg/ml) avant stimulation par fMLF 3 µM. Cette figure montre une expérience représentative (n > 3).

II-5-Un activateur de la protéine kinase C, le PMA, induit l'activation de la NADPH-oxydase

Du point de vue de la réponse oxydative, les neutrophiles de moelle osseuse sont aussi matures et aussi fonctionnels que leurs homologues sanguins. De plus, ils constituent un pool plus important de cellules fonctionnelles. Les expériences suivantes ont donc été menées sur des neutrophiles de moelle osseuse.

Tout comme nous l'avons fait pour le peptide bactérien fMLF, nous avons caractérisé l'activité de la NADPH-oxydase dans les neutrophiles en réponse à des concentrations croissantes PMA (figure 38).

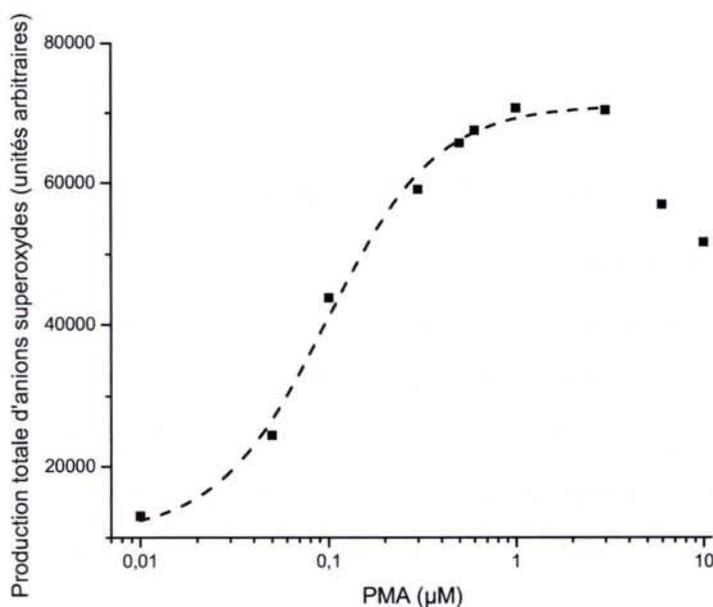


Figure 38: Courbe concentration-effet sigmoïde de la production totale de FRO par des neutrophiles de moelle en présence de la cytochalasine B (5 µg/ml). Cette figure montre une expérience représentative (n ≥ 3).

Ce graphique nous montre que pour les neutrophiles de la moelle, la réponse est dépendante de la concentration d'agoniste et est maximale à partir de 600 nM de PMA. Comme nous l'avons constaté pour la courbe concentration-effet fMLF, des doses plus élevées (jusqu'au 1 μ M de PMA), ne montrent pas d'augmentation de la production d'anions superoxydes mais tendent à diminuer l'intensité de la réponse oxydative.

Nous avons également étudié la cinétique de la production d'anions superoxydes en réponse à ce type d'agoniste (figure 39).

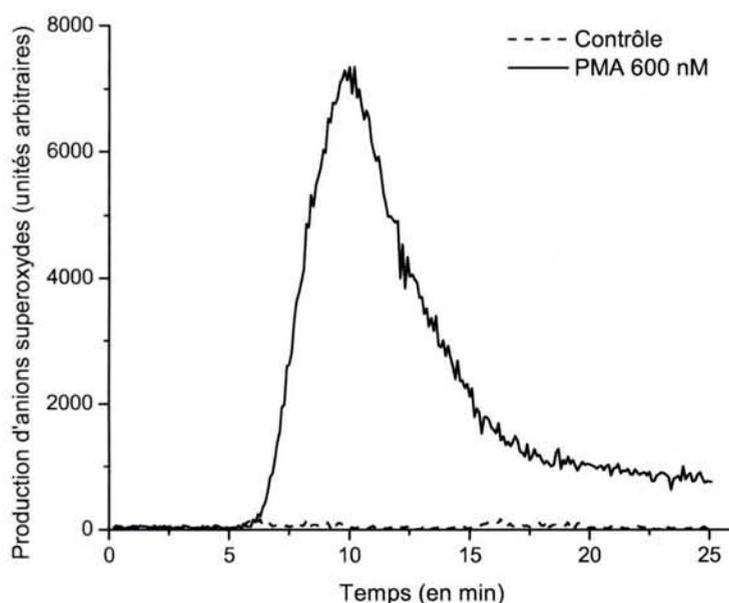


Figure 39: Cinétique de production d'anions superoxydes par les neutrophiles issus de la moelle osseuse suite à une stimulation par PMA (600 nM) en présence de cytochalasine B (5 μ g/ml). Cette figure montre une expérience représentative (n = 4).

Ainsi, comme pour les neutrophiles humains, le PMA induit une production de FROs de la part des neutrophiles murins plus lente mais plus soutenue que celle observée en réponse au fMLF (Karlsson *et al.*, 2000).

II-6-La chimioluminescence observée est due à la production d'anions superoxydes par la NADPH-oxydase.

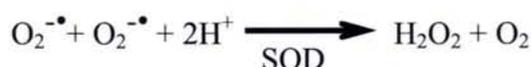
Nous nous sommes assurés que la chimioluminescence observée était effectivement due à la dégradation du luminol par les anions superoxydes et non pas à l'effet d'autres dérivés oxygénés ou des protéines produites par le neutrophile.

Pour cela, des expériences ont été réalisées en présence de SOD ou d'azide de sodium (deux antioxydants), et portent sur l'intensité de la réponse oxydative de ces cellules suite à une

stimulation par le peptide bactérien fMLF (figure 40) ou par l'ester de phorbol PMA (figure 41).

La superoxyde dismutase (SOD)

La superoxyde dismutase est une enzyme qui catalyse la transformation des ions superoxydes en eau oxygénée. La superoxyde dismutase a donc un effet protecteur contre les réactions radicalaires dans la mesure où la catalase et la glutathion peroxydase sont suffisantes pour détruire l' H_2O_2 formé, en générant de l' H_2O et de l' O_2 . La transformation du radical superoxyde en H_2O_2 peut s'effectuer spontanément dans le milieu biologique mais l'enzyme l'accélère environ 10 000 fois.



En présence de SOD, l'intensité du signal luminescent devrait être diminuée si la dégradation du luminol est due à la production d'anions superoxydes. Ces derniers ne pouvant plus réagir avec le luminol, l'intensité du signal observé est donc plus faible. Par contre, si le signal lumineux ne varie pas, alors la dégradation du luminol pourrait être due à l'action d'un autre dérivé oxygéné tel que le NO.

L'azide de sodium (NaN_3)

L'azide de sodium inactive les enzymes qui dégradent l' H_2O_2 , telles que la myéloperoxydase (MPO) et la catalase. L'azide de sodium peut traverser les membranes biologiques. Une diminution du signal luminescent signifierait donc que la dégradation du luminol est effectuée par l'une ou par les deux enzymes.

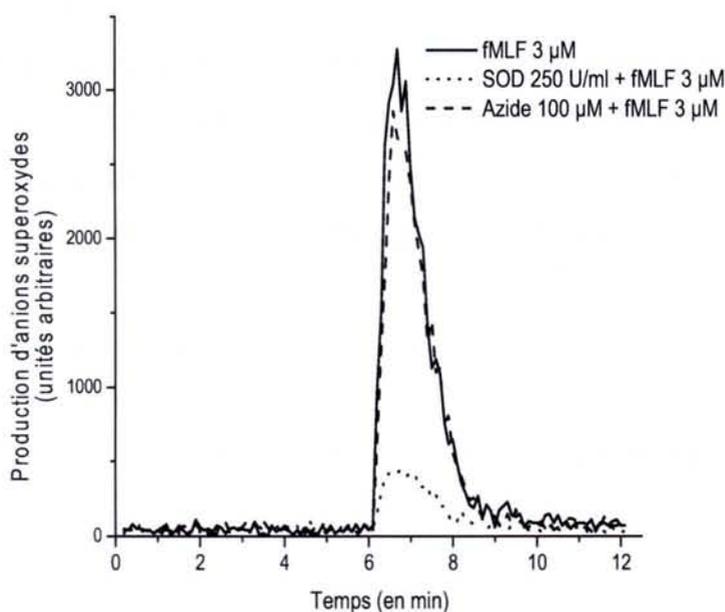


Figure 40 : Effet de la présence de SOD ou d'azide de sodium sur la cinétique de production d'anions superoxydes dans le milieu extracellulaire par les neutrophiles issus de la moelle osseuse suite à une stimulation par 3 µM de fMLF en présence de cytochalasine B (5 µg/ml). Cette figure montre une expérience représentative ; $n \geq 3$.

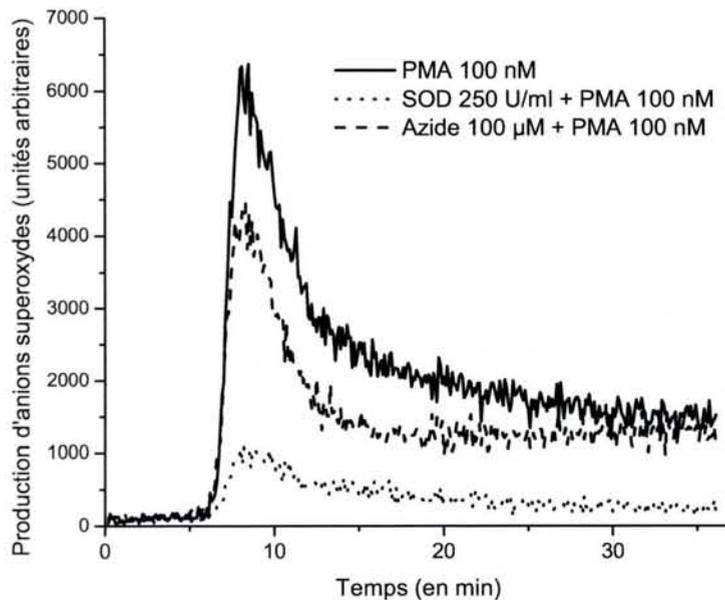


Figure 41 : Effet de la présence de SOD et d'azide de sodium sur la cinétique de production d'anions superoxydes dans le milieu extracellulaire par les neutrophiles issus de la moelle osseuse suite à une stimulation par 100 nM de PMA en présence de cytochalasine B (5 µg/ml). Cette figure montre une expérience représentative ; $n \geq 3$.

La présence de SOD dans le milieu extracellulaire diminue fortement l'intensité du signal luminescent. Par contre, la présence d'azide de sodium modifie peu l'amplitude du signal de fluorescence. La réaction de dégradation du luminol est donc bien dû à l'action des anions superoxydes et non pas à celle du NO, de la catalase et/ou de la myéloperoxydase.

III-L'enzyme β -glucuronidase, un marqueur des granules primaires

Si le contenu enzymatique des granules des neutrophiles humains est connu (Edwards, 1994); ce n'est pas le cas de ceux des neutrophiles murins. Nous nous sommes basés sur l'hypothèse que l'enzyme β -glucuronidase, connue pour être présente dans les neutrophiles de souris, est localisée dans les mêmes types de granules que dans leurs homologues humains (Rausch et Moore, 1975). Nous avons développé une méthode d'évaluation de la sécrétion des granules primaires en mesurant l'activité de β -glucuronidase. L'activité est mesurée avec le substrat 4-méthylumbelliferyl β -D-glucuronide qui est clivé pour libérer l'indicateur fluorescent : la méthylumbelliférone.

Adaptée d'un protocole mis au point pour l'étude de l'exocytose de l'enzyme N-acétyl- β -glucosaminidase des cellules HL-60, cette technique permet la mesure de l'activité de l'enzyme β -glucuronidase dans le surnageant de seulement 5000 cellules (Nusse *et al.*, 1997).

III-1-Comparaison de la quantité d'enzyme β -glucuronidase

Avant de s'intéresser à la capacité des neutrophiles à répondre aux stimulations par différents agonistes, nous voulions connaître la quantité d'enzyme β -glucuronidase que contenaient les neutrophiles purifiés à partir du sang ou de la moelle osseuse. Pour cela, nous avons procédé à une lyse totale en présence de Triton 0,02 % de ces deux types de suspensions cellulaires de neutrophiles (de sang et de moelle, figure 42).

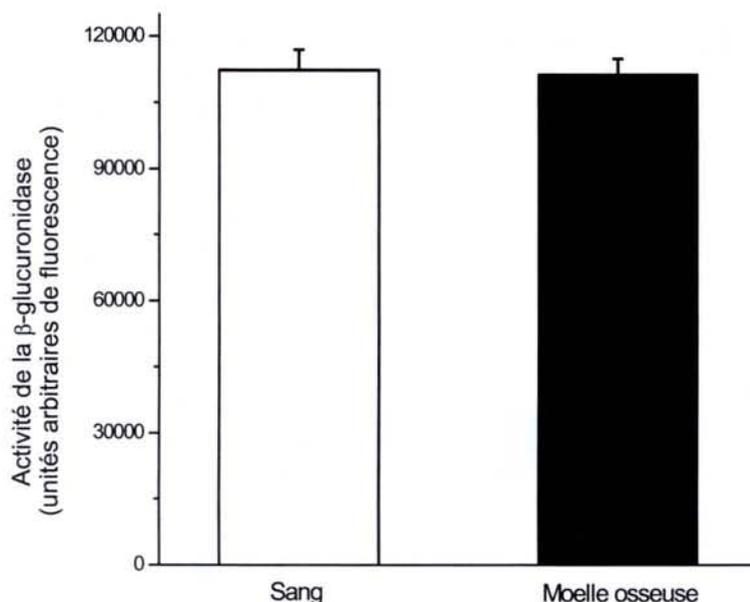


Figure 42 : Activité totale de la β -glucuronidase. Lyse totale des cellules par le Triton X-100 0,02 %.

Nous constatons que les deux populations de neutrophiles présentent la même activité totale de β -glucuronidase : 112 000 \pm 4 700 pour les neutrophiles du sang et 111 000 \pm 3 500 pour ceux de la moelle osseuse (unités arbitraires de fluorescence, n = 37 et 51).

III-2-La cytochalasine B joue un rôle important dans l'exocytose des granules primaires

Nous avons précédemment démontré que chez la souris, les neutrophiles sanguins et de moelle osseuse répondent, suite à une stimulation par le peptide bactérien fMLF, par la production d'anions superoxydes. De plus, nos travaux ainsi que ceux d'autres auteurs montrent que les neutrophiles murins possèdent de la β -glucuronidase (Rausch et Moore, 1975; Mocsai *et al.*, 1997).

D'autre part, les travaux de Bennet *et al.* ont montré que, comme pour la production d'anions superoxydes, l'exocytose des granules primaires des neutrophiles humains est

augmentée en présence de cytochalasine B en réponse à une stimulation fMLF (Bennett *et al.*, 1980).

Nous avons vérifié l'effet d'une stimulation par le fMLF (3 μ M) et ainsi que l'importance de la cytochalasine B sur l'exocytose des granules primaires de neutrophiles murins (figure 43).

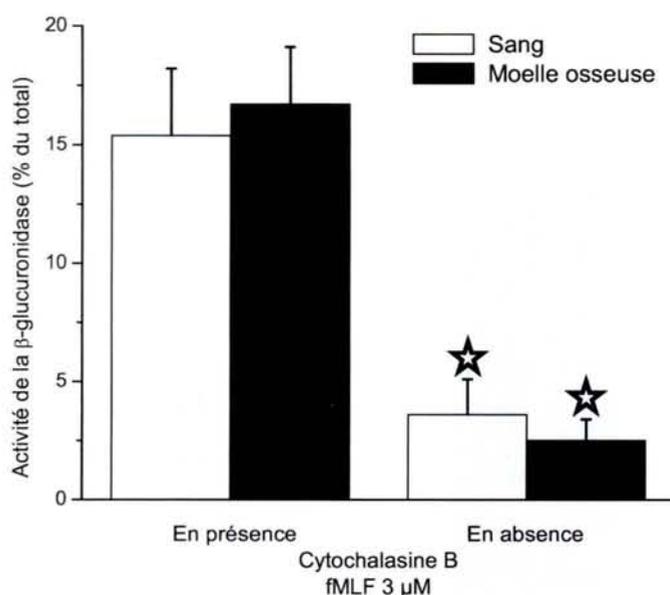


Figure 43 : Comparaison de l'exocytose des granules primaires chez des neutrophiles sanguins (barres blanches) et de moelle osseuse (barres noires). L'effet de la cytochalasine B (5 μ g/ml) sur la sécrétion des granules primaires en réponse à une stimulation par 3 μ M de fMLF est significatif ($p < 0,05$, $n \geq 6$). Les données sont exprimées selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen.

Comme leurs homologues humains, les neutrophiles murins (du sang et de la moelle osseuse) sont capables de répondre à une stimulation 3 μ M de fMLF par la sécrétion du contenu de leurs granules primaires. Ainsi, nous montrons qu'il n'y a pas de différence significative entre les neutrophiles du sang et ceux de la moelle osseuse.

De plus, en absence de cytochalasine B, l'activité de la β -glucuronidase est basse ce qui dénote une faible exocytose des granules primaires. En sa présence, l'activité mesurée de l'enzyme est significativement augmentée d'environ 5 fois ($p < 0,05$). Par conséquent, dans la suite du travail, toutes les mesures d'activité de la β -glucuronidase ont été réalisées en présence de cytochalasine B.

III-3-Du point de vue de la sécrétion des granules primaires, les neutrophiles de la moelle osseuse sont aussi fonctionnels que ceux du sang.

Comme pour la production d'anions superoxydes, nous avons étudié l'activité de la β -glucuronidase dans les deux populations de neutrophiles en réponse à différentes concentrations de fMLF. Le but était de savoir si l'une de ces deux populations présentait une meilleure affinité pour ce peptide bactérien (figure 44).

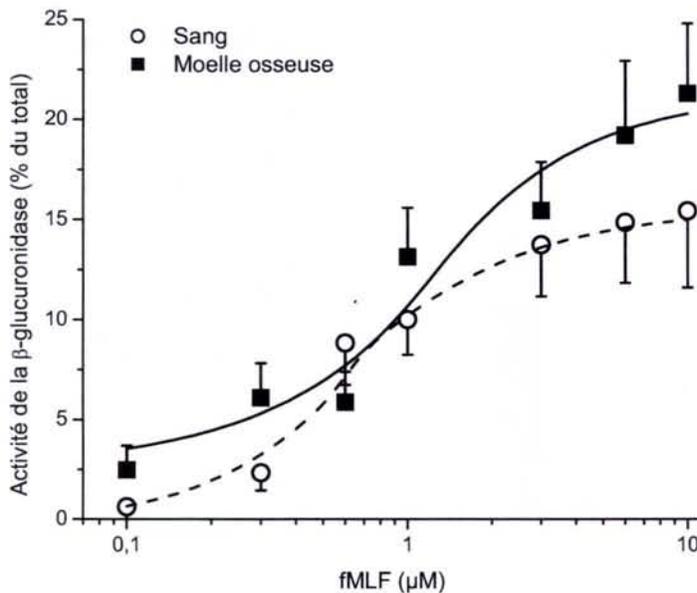


Figure 44 : Courbe concentration-effet de la sécrétion des granules primaires induite par différentes concentrations de fMLF en présence de cytochalasine B (5 μ g/ml) des neutrophiles sanguins (ligne pointillée) et de moelle osseuse (ligne pleine). Barres : écarts - types moyens ($n \geq 6$).

D'après ces courbes concentration-effet, pour les neutrophiles murins, l'activation par le fMLF stimule la libération des granules primaires au maximum jusqu'à 20 %. L' EC_{50} de la libération de β -glucuronidase par les neutrophiles murins en réponse au peptide bactérien fMLF est de $0,71 \pm 0,11 \mu$ M pour les neutrophiles du sang et de $1,19 \pm 0,094 \mu$ M pour les neutrophiles de la moelle osseuse. L' EC_{50} du fMLF pour la libération des granules primaires est très semblable à ceux obtenus pour la production de dérivés oxygénés.

Les neutrophiles sanguins répondent donc à une stimulation fMLF avec une affinité légèrement plus forte que les neutrophiles de moelle osseuse (statistiquement significatives, $p < 0,01$).

Les neutrophiles de moelle osseuse semblent donc aussi fonctionnels que les neutrophiles sanguins en ce qui concerne l'exocytose des granules primaires.

III-4-L'activité de la β -glucuronidase peut être détectée en réponse au PMA et à l'ionophore calcique A23187.

Les travaux de Bylund montrent que dans les neutrophiles humains, l'activation directe de la PKC par des esters de phorbol, tel que le PMA, a comme conséquence la production de FROs (Bylund *et al.*, 2003). Nous avons utilisé le PMA et l'ionophore calcique A23187 pour étudier la libération des granules primaires chez les deux populations de neutrophiles murins (figure 45).

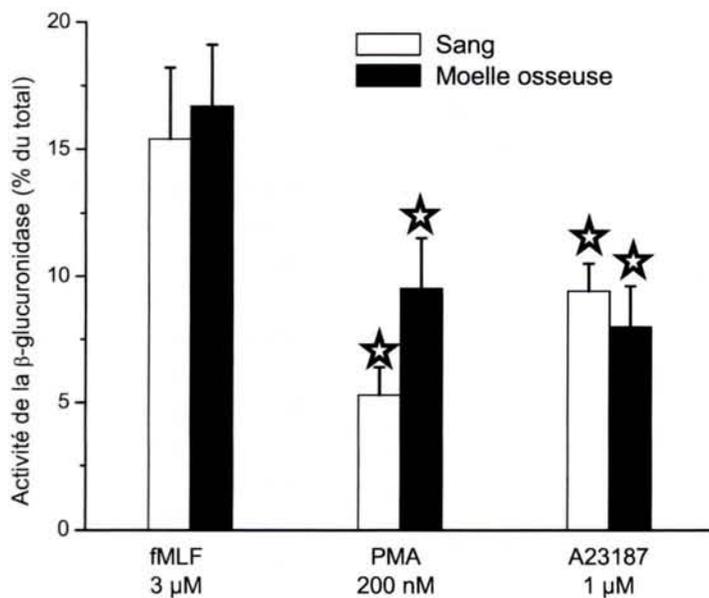


Figure 45: Comparaison de l'exocytose des granules primaires des neutrophiles sanguins (barres blanches) ou de moelle osseuse (barres noires) en réponse à une stimulation par 3 μ M de fMLF, 200 nM de PMA ou par l'ionophore calcique A23187 (1 μ M) en présence de cytochalasine B (5 μ g/ml) ($p < 0,05$ par rapport au fMLF). Barre : écart-type moyen ($n \geq 5$).

Cette figure montre clairement que l'activateur de la PKC (200 nM de PMA) ainsi que l'ionophore de Ca^{2+} (1 μ M d'A23187), bien que moins puissants que le fMLF (3 μ M), sont des agonistes efficaces de la sécrétion des granules primaires par les neutrophiles du sang et de la moelle osseuse. En conséquence, la PKC et les ions calcium sont donc bien impliqués dans l'exocytose des granules azurophiles des neutrophiles de souris.

IV-Exocytose des granules secondaires, évaluation de la sécrétion de lactoferrine par les neutrophiles de souris

Après avoir évalué la sécrétion des granules primaires, nous avons voulu savoir si, d'une part les granules secondaires sont libérés en réponse aux mêmes agonistes et, d'autre part, quelle est la concentration de fMLF nécessaire pour stimuler la sécrétion de ces granules.

Pour cela, nous avons choisi la lactoferrine comme marqueur des granules secondaires. La lactoferrine est une protéine à activité bactériostatique qui chélate le fer indispensable à la

croissance bactérienne. Sa sécrétion dans le milieu extracellulaire peut être détectée par ELISA.

IV-1-Confirmation de la présence de lactoferrine dans les neutrophiles murins

Aucun anticorps anti-lactoferrine murine n'étant actuellement disponible chez les fournisseurs, nous avons vérifié la spécificité d'une solution d'anticorps polyclonaux (Sigma), dirigé contre la lactoferrine humaine par immunoempreinte. Pour ce faire, la spécificité de cet anticorps a été testée sous différentes conditions comme décrit dans le protocole (Matériel et méthodes, § II - 4) (figure 46). Le film autoradiographique obtenu a ensuite été numérisé et analysé à l'aide du logiciel GelDoc 2000 Imaging System (BioRad, Hercules, CA). Ce logiciel, en se basant sur la distance de migration des marqueurs moléculaires disposés de part et d'autre du gel de migration, permet de déterminer la masse moléculaire des protéines ayant migré dans ce gel.

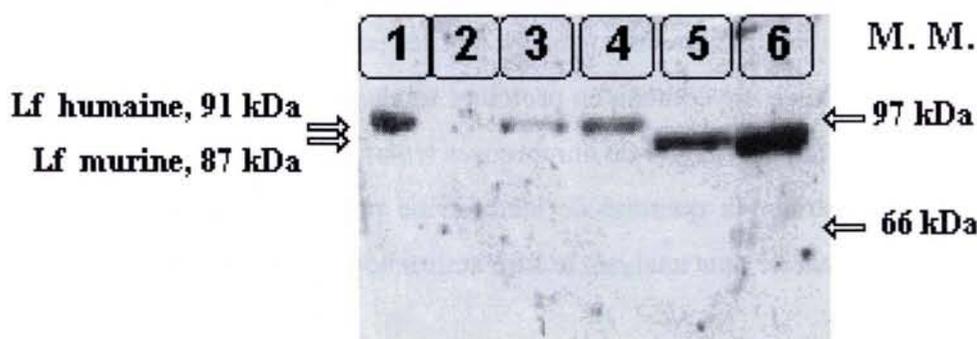


Figure 46 : Etude de la spécificité de l'anticorps anti-lactoferrine humaine vis-à-vis de son homologue murin : analyse par SDS-PAGE et immunoempreinte de surnageant de neutrophiles humains et murins, soit stimulés par 200 nM PMA soit lysés (MM : masse moléculaire).

Contenu des pistes :

- 1 : Lactoferrine humaine purifiée à partir de lait humain (Lf), Sigma, 40 ng ;
- 2 : BSA, Sigma, 500 ng ;
- 3 : Surnageant de neutrophiles humains stimulés par 200 nM de PMA ($0,64 \times 10^6$ cellules, 3 μ g de protéine totale) ;
- 4 : Lysat de neutrophiles humains ($0,17 \times 10^6$ cellules, 1 μ g de protéine totale) ;
- 5 : Surnageant de neutrophiles murins stimulés par 200 nM de PMA ($2,53 \times 10^6$ cellules, quantité de protéine totale non déterminée) ;
- 6 : Lysat de neutrophiles murins ($1,11 \times 10^6$ cellules, 18 μ g de protéine totale).

Cette radiographie est représentative d'au moins 3 expériences.

Cette immunoempreinte prouve que l'anticorps dirigé contre la lactoferrine humaine est également capable d'identifier spécifiquement la lactoferrine murine. En effet, une seule bande est détectée dans chacun des échantillons testés. Qu'il s'agisse de surnageant de cellules stimulées ou de cellules lysées, cet anticorps reconnaît une protéine de 91 kDa dans les neutrophiles humains et de 87 kDa dans les neutrophiles murins.

Le PMA étant connu pour stimuler la sécrétion des granules secondaires des neutrophiles humains (Wright *et al.*, 1977), le poids moléculaire de cette bande et le fait qu'elle apparaisse dans le surnageant de neutrophiles stimulés par le PMA confirme qu'il s'agit de lactoferrine.

Comme nous l'avions fait pour l'enzyme β -glucuronidase, nous nous sommes intéressés à la quantité de lactoferrine contenue dans ces 2 types cellulaires. Dans le but de réaliser une immunoempreinte puis une quantification via le logiciel GelDoc 2000, nous avons réalisé une lyse totale de plusieurs suspensions cellulaires de neutrophiles (de sang ou de moelle osseuse). Si les quantités de lactoferrine sont quantifiables dans le lysat de neutrophiles de moelle osseuse, il n'en est pas de même pour les neutrophiles sanguins. Le faible nombre de cellules disponibles par prélèvement ne permet pas le dosage des protéines totales dans le lysat de ces cellules. Le contenu en protéines totales de neutrophiles murins sanguins lysés est donc resté indécélable malgré de nombreuses tentatives.

Afin d'estimer la quantité de lactoferrine présente dans chacune de ces populations, nous avons numérisé puis analysé, le film autoradiographique présenté ci-dessous (figure 47).

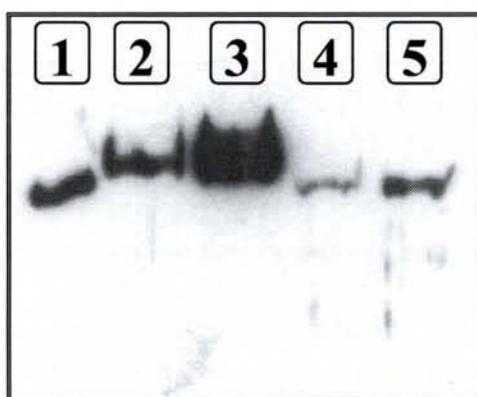


Figure 47 : Etude, à l'aide de l'anticorps anti-lactoferrine humaine, de la proportion de lactoferrine dans les neutrophiles humains et murins : analyse par SDS-PAGE et immunoempreinte de lysat de neutrophiles humains et murins.

Contenu des pistes :

1 : Lactoferrine humaine purifiée à partir de lait humain (Lf), Sigma, 30 ng ;

2-3 : Lysat de neutrophiles humains sanguins, respectivement 1 et 2 μ g de protéine totale

4-5 : Lysat de neutrophiles murins de moelle osseuse, respectivement 10 et 20 μ g de protéine totale

En se basant sur la quantification de l'intensité des bandes observées et après avoir soustrait l'intensité du bruit de fond, la valeur de chaque bande de lactoferrine peut être ensuite estimée par rapport à la quantité de lactoferrine déposée dans le puits de contrôle (tableau 12).

		Volume ajusté (U.A.)	Lactoferrine (Lf)	Protéines totales dosées	Lf / Protéines totales	
piste		Intensité * mm ²	µg	µg	%	moyenne
1	lactoferrine purifiée	3 664	0,03			
2	Neutrophiles humains (lysat)	5 267	0,043	1	4,31 %	4,07 ± 0,24 %
3		9 326	0,076	2	3,82 %	
4	Neutrophiles murins (lysat)	1 651	0,014	10	0,14 %	0,13 ± 0,02 %
5		2 654	0,022	20	0,11 %	

Tableau 12 : Estimation de l'intensité des bandes observées sur les autoradiographies des immunoempreintes des quantités relatives totales de lactoferrine contenues dans les populations neutrophiles humains et murins.

Cette immunoempreinte nous permet de penser que les neutrophiles humains, préalablement lysés, contiennent plus de lactoferrine que les neutrophiles murins (respectivement $4,07 \pm 0,24 \%$ contre $0,13 \pm 0,02 \%$ des protéines totales cellulaires, $p = 0,004$).

Toutefois, grâce à une technique cytochimique portant sur la fixation de fer par la lactoferrine (tableau 13), Barton démontre que les neutrophiles murins possèdent presque autant de lactoferrine que leurs homologues humains (Barton *et al.*, 1988). Il semble donc que notre solution d'anticorps polyclonaux anti-lactoferrine, présente une différence d'affinité pour la protéine murine ce qui sous-estime la quantité de lactoferrine présente dans nos échantillons.

	Score NFeBR
Rat (Wistar)	40 ± 0
Vache (Holstein)	160 ± 27
Lapin (New Zealand white)	169 ± 14
Porc (Sinclair miniature)	176 ± 18
Hamster (golden Syrian)	264 ± 54
Souris (C57BL6)	320 ± 0
Chien (bâtard)	371 ± 44
Chat domestique	385 ± 9
Homme	403 ± 3

Tableau 13 : Comparaison inter espèces de la quantité de lactoferrine contenue dans les granules de neutrophile (Barton *et al.*, 1988). (NFeBR : neutrophil iron binding reactivity)

IV-2-L'exocytose des granules secondaires est étudiée par la mesure de l'excrétion de lactoferrine à l'aide d'un test ELISA

IV-2-A-Etude du contenu cellulaire total en lactoferrine

Une fois la spécificité de l'anticorps anti-lactoferrine humaine étudiée, nous avons mis au point un test ELISA qui nous permettrait de mettre en évidence la présence de lactoferrine murine dans le surnageant de neutrophiles de souris préalablement stimulés.

Cette technique est basée sur un protocole mis au point par l'équipe de Mocsai (Mocsai *et al.*, 1999) auquel nous avons apporté deux modifications notables :

- d'une part, nous travaillons avec des cellules en suspension au lieu de cellules adhérentes ;
- d'autre part, nos analyses sont effectuées sur dix fois moins de cellules soit seulement 20000 cellules par conditions expérimentales.

En 1^{er} lieu, nous avons tenté de doser le contenu en lactoferrine de ces deux populations cellulaires murines, en dehors de toute stimulation. Des suspensions cellulaires de neutrophiles de sang et de moelle osseuse ont été lysés à l'aide de 0,02 % de Triton X-100 puis les surnageants ont été analysés comme décrit dans le protocole (chapitre Matériel et méthodes, § II - 3). Les valeurs de densité optique (D.O. 450 nM) obtenues à la lecture de ces puits se sont révélées être inférieures à celles lues dans les puits contenant le surnageant de neutrophiles stimulés par le solvant des agonistes précédemment cités.

Il nous a donc été impossible de déterminer le contenu en lactoferrine totale de nos deux populations neutrophiles murines. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que, dans un lysat cellulaire total, la compétition des autres protéines, libérées au cours de la lyse, pour les sites de fixation au support (Maxisorp Nunc) ne permettent pas la détection de cette lactotransferrine par une technique ELISA. Il est également possible que la présence de Triton dans le milieu réactionnel interfère sur la fixation de cette protéine.

La libération de lactoferrine par les neutrophiles est alors quantifiée à l'aide d'une gamme de cette protéine humaine purifiée (comme décrit dans le chapitre Matériel et méthodes, § II - 3). Ces valeurs sont ensuite exprimées en terme d'augmentation relative c'est-à-dire par rapport à la quantité de lactoferrine libérée par les cellules stimulées par le solvant des agonistes.

IV-2-B-La sécrétion de lactoferrine est observée en réponse au fMLF, au PMA et à l'ionophore calcique A23187

D'après les travaux de Mocsai, nous savons que les neutrophiles de moelle osseuse adhérents sont capables de répondre au fMLF, au PMA ou à un ionophore calcique par la sécrétion de leurs granules secondaires (Mocsai *et al.*, 1999).

Comme nous l'avons précédemment prouvé pour l'exocytose des granules primaires, nous cherchons maintenant à savoir si nos deux populations de neutrophiles de souris, en suspension, pouvaient, suite aux mêmes types de stimulation, mobiliser leurs granules spécifiques et libérer dans le milieu extracellulaire la lactoferrine qu'ils contiennent (figure 48).

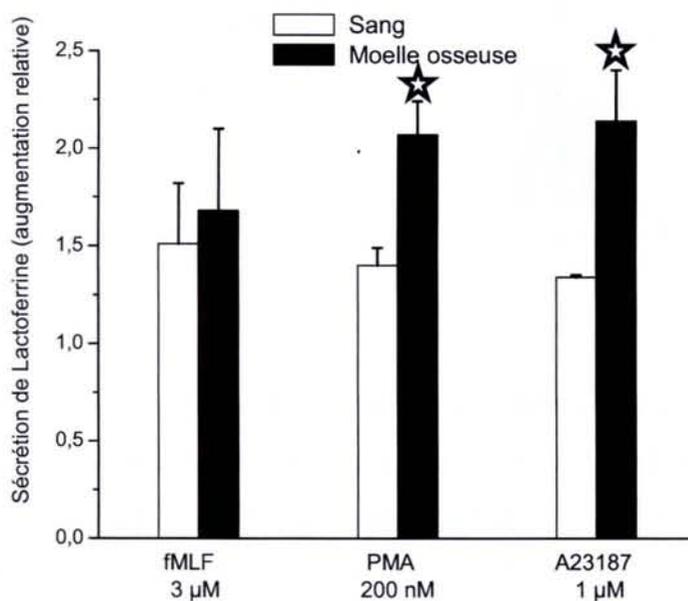


Figure 48 : Sécrétion des granules secondaires en réponse à une stimulation par 3 μM de fMLF, 200 nM de PMA ou par 1 μM de l'ionophore calcique A23187 en présence de cytochalasine B (5 μg/ml). Ces valeurs sont exprimées par rapport à la quantité de lactoferrine libérée par les cellules stimulées par le solvant de ces agonistes, le DMSO. Les données sont exprimées selon leur moyenne ± écart-type de la moyenne (n ≥ 3 ; p < 0,05).

Comme le montre la figure 48, le PMA et l'A23187 sont tous deux des stimulateurs efficaces de la sécrétion des granules spécifiques et dénotent un pouvoir mobilisateur semblable à celui du fMLF. Il est également intéressant de noter que la réponse des neutrophiles de la moelle osseuse à ces deux agonistes est significativement plus importante que celle des neutrophiles sanguins (p < 0,05).

IV-2-C-La cytochalasine B est importante pour l'exocytose des granules secondaires *in vitro*

Comme nous l'avons mis en évidence pour la production d'anions superoxydes et pour la sécrétion des granules primaires, nous avons évalué le rôle du cytosquelette d'actine dans la libération des granules contenant de la lactoferrine (figure 49).

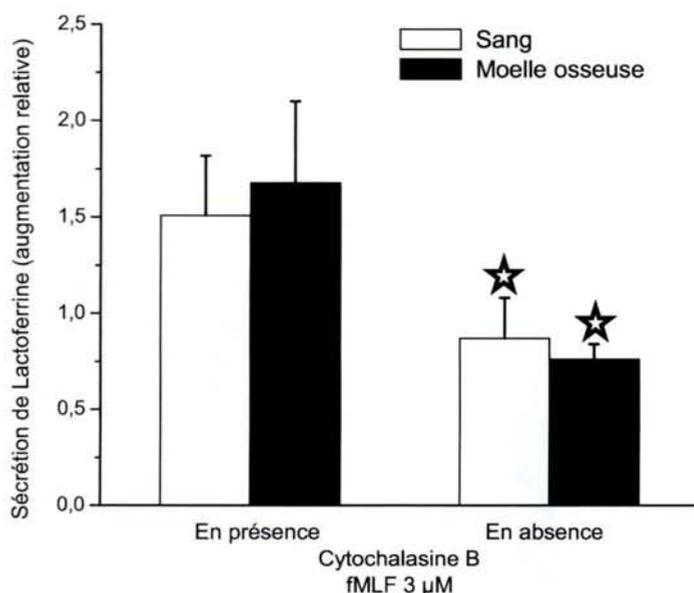


Figure 49 : Effet de la cytochalasine B sur la sécrétion des granules secondaires. Les neutrophiles sanguins (bande blanche) et ceux de la moelle osseuse (bande noire) sont préincubés (10 min, 37°C) en présence ou en absence de la cytochalasine B (5 μg/ml) avant stimulation par 3 μM de fMLF (n ≥ 3).

En absence de cytochalasine B, l'augmentation relative de la sécrétion de lactoferrine est de 1, c'est-à-dire que l'on observe une sécrétion des granules secondaires équivalente à celle obtenue en présence du contrôle DMSO. Ainsi, qu'il s'agisse de la génération de dérivés oxygénés ou l'exocytose des granules primaires et secondaires, la présence de cytochalasine B dans le milieu réactionnel favorise la réponse du neutrophile.

IV-2-D-Sécrétion des granules secondaires : les neutrophiles de la moelle osseuse sont aussi fonctionnels que ceux du sang périphérique.

Nous avons étudié l'exocytose de lactoferrine par ces deux populations de neutrophiles murins en réponse à différentes concentrations de fMLF afin de découvrir si, du point de vue de la libération des granules secondaires, l'une de ces 2 populations présente une meilleure affinité pour ce peptide bactérien (figure 50).

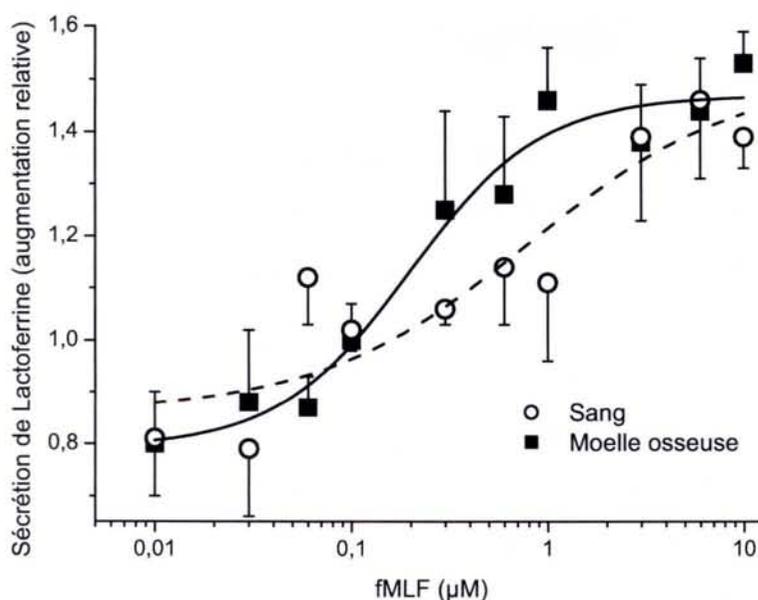


Figure 50 : Sécrétion des granules secondaires par les neutrophiles sanguins (ligne pointillée) et de moelle osseuse (ligne continue) en réponse à différentes concentrations de fMLF en présence de cytochalasine B (5 µg/ml). Ces résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type de la moyenne ($n \geq 6$; $p < 0,05$).

D'une part, cette figure nous montre que l'excrétion maximale de lactoferrine est la même, qu'il s'agisse des neutrophiles sanguins ou de ceux issus de la moelle osseuse. D'autre part, ces courbes nous permettent d'établir les EC_{50} pour le fMLF de ces deux populations de neutrophiles murins.

En ce qui concerne, l' EC_{50} des neutrophiles sanguins, la valeur obtenue ($0,8 \pm 0,13 \mu M$) est proche de celle obtenue pour les autres tests effectués (libération de radicaux oxygénés: $0,52 \mu M$ et sécrétion des granules primaires: $0,71 \mu M$). Par contre, la valeur de l' EC_{50} des neutrophiles de moelle osseuse ($0,2 \pm 0,05 \mu M$) est très en dessous des valeurs obtenues jusqu'à présent (libération de radicaux oxygénés: $2,1 \mu M$ et sécrétion des granules primaires: $1,19 \mu M$). Ainsi, en ce qui concerne la sécrétion de lactoferrine, contrairement à la production de radicaux libres et à l'exocytose des granules primaires, les neutrophiles de la moelle répondent à une stimulation par le fMLF avec une affinité légèrement plus forte que les neutrophiles sanguins.

En effet, quelle que soit la réponse microbicide étudiée (production de radicaux libres, exocytose des granules secondaires ou primaires), les neutrophiles sanguins présentent des affinités équivalentes pour le fMLF. Ceci ne semble pas être le cas des neutrophiles de moelle osseuse qui semblent beaucoup plus prédisposés à répondre par la sécrétion de leurs granules secondaires.

Discussion

Les modèles animaux sont employés intensivement dans la recherche biomédicale pour augmenter notre compréhension de la pathophysiologie humaine et ses mécanismes fondamentaux. Mais pour obtenir des conclusions biologiquement significatives, il est important de définir les différences entre la physiologie humaine et celle du modèle utilisé.

Les neutrophiles sont réputés pour être les cellules les plus importantes de la réponse immunitaire primaire aussi bien chez l'Homme que chez la souris. Pourtant, la souris ne présente pas les mêmes répartitions cellulaires que l'Homme, tant au niveau de son myélogramme (tableau 14) que de son hémogramme (tableau 15).

	Homme	Souris
Lignée érythrocytaire	16,0%	18,9%
Lymphocyte	8,0%	37,8%
Lignée éosinophile	4,0%	3,5%
Lignée neutrophile :	67,0%	38,7%
Myéloblaste	1,0%	1,8%
Promyélocyte	2,0%	7,7%
Myélocyte neutrophile	16,0%	6,9%
Métamyélocyte neutrophile	16,0%	5,6%
Polynucléaire neutrophile	32,0%	16,7%
Monocyte, plasmocyte, mégacaryocyte, ...	< 5 %	1,4 %

Tableau 14 : Comparatif des myélogrammes humain et murin

(Chervenick *et al.*, 1968; Coeur, 1999).

	Homme	Souris
Lymphocytes	20-40%	86,5%
Neutrophiles	50-75%	9,9%
Monocytes	< 10%	2,0%
Basophiles	< 1%	< 1%
Eosinophiles	< 5%	1,6%

x 10 ³ cellules / μ l	Homme	Souris
Lymphocytes	1,5 à 4	10,03 à 11,25
Neutrophiles	2 à 7,5	1,15 à 1,29
Monocytes	0,2 à 1	0,23 à 0,26
Basophiles	0,01 à 0,1	
Eosinophiles	0,04 à 0,5	0,19 à 0,21
Total	4 à 10	11,6 à 13

Tableaux 15 : Comparatif des hémogrammes humain et murin

(Coeur, 1999; Chervenick *et al.*, 1968; Mouse phenome database web site., 2004).

Notre but était de comparer les qualités fonctionnelles des deux populations de neutrophiles de souris issus de la moelle osseuse à ceux du sang périphérique. Or la moelle

osseuse de souris contient deux fois moins de neutrophiles matures que celle de l'Homme et le sang murin en contient près de 7 fois moins que le sang humain. A partir de ces constatations, il nous a fallu dans un premier temps choisir une méthode de purification des cellules murines. La méthode devait être simple, rapide étant donnée la courte durée de vie de ces cellules, reproductible et devait nous permettre d'obtenir à la fois une suspension cellulaire d'une grande pureté et d'un bon rendement étant donné le faible volume sanguin pouvant être prélevé à ces animaux sans risquer leur mort.

I-Choix du protocole d'isolement des neutrophiles

De nombreuses méthodes de purification existent actuellement. La cytométrie de flux est une méthode couramment utilisée pour la quantification ou pour des études concernant l'évolution morphologique et l'expression membranaire des marqueurs de différenciation des neutrophiles au cours de leur maturation. Elle est applicable sur des suspensions cellulaires murines de moelle osseuse aussi bien que sanguines (Lagasse et Weissman, 1996). Cependant cette technique nécessite l'emploi d'anticorps dirigés contre des molécules de surface spécifiques des neutrophiles et donc susceptibles de provoquer leur activation. Des études visant à comparer les fonctions bactéricides de suspensions cellulaires ainsi obtenues risqueraient d'être faussées par la préactivation de ces cellules lors de leur purification.

Récemment un protocole d'isolement des neutrophiles du sang murin, basé sur le principe de la sélection négative, a été mis au point (Cotter *et al.*, 2001). Cette méthode consiste à éliminer toutes les cellules autres que les neutrophiles à l'aide d'anticorps spécifiques d'antigènes de surfaces présents sur ces cellules "non désirées" et d'anticorps secondaires couplés à des billes magnétiques. Si le risque de préactivation des cellules est négligeable, cette technique se complique si l'on souhaite l'appliquer à une suspension de cellules de moelle osseuse car il faut alors employer une batterie d'anticorps spécifiques des cellules immatures.

La maturation des granulocytes est accompagnée d'une augmentation progressive de la densité des précurseurs de neutrophile (Olofsson *et al.*, 1980). Selon Sitar, ceci s'explique par le fait qu'au fur et à mesure de la maturation, les neutrophiles présentent une augmentation du nombre et de la diversité de leurs granules (Sitar et Fornasari, 1989). Ce rapport entre la maturité et la densité des précurseurs du neutrophile signifie que les différentes populations de précurseurs du neutrophile peuvent être isolées par centrifugation sur gradient de densité de façon analogue aux méthodes employées pour l'isolement des sous-groupes de leucocytes du sang périphérique. En effet, dans le gradient de densité, les cellules se déposent dans la zone

où la densité du milieu environnant est égale à leur propre densité. Lorsque les milieux de séparation utilisés ont une densité fixe, ces milieux fonctionneront comme des barrières de densité. Les cellules qui ont une densité supérieure à celle du milieu de séparation seront arrêtées à l'interface suspension cellulaire / milieu de séparation tandis que les cellules ayant une densité plus faible traverseront l'interface pour constituer le culot (Cowland et Borregaard, 1999). C'est pourquoi, en nous basant sur les travaux de nombreux auteurs dont ceux de Serrander, nous avons choisi de purifier les polynucléaires neutrophiles de souris sur gradient discontinu de densité (Serrander *et al.*, 2000). Cette méthode a été améliorée au fur et à mesure de nos expériences afin de réduire le nombre d'hématies et de cellules non granulocytaires de nos préparations.

II-Les neutrophiles de moelle osseuse de souris sont morphologiquement matures

Les travaux de Berkow et ceux de Biermann ont permis de mettre en évidence la présence d'un grand nombre de neutrophiles morphologiquement matures (en bande et segmenté) dans la moelle osseuse de l'Homme (Berkow et Dodson, 1986) et de la souris (Biermann *et al.*, 1999). Ainsi, la moelle osseuse humaine serait un important réservoir de neutrophiles (Babior et Golde, 2001) morphologiquement matures mais incapables de phagocytose ou de production d'anions superoxydes donc fonctionnellement immatures (Berkow et Dodson, 1986).

Les neutrophiles de moelle osseuse de souris présentent une taille, une morphologie et expriment à leurs surfaces les marqueurs spécifiques caractéristiques de cellules matures (Allport *et al.*, 2002; Lowell *et al.*, 1996). Ils sont généralement utilisés par la majorité des études effectuées chez la souris afin de disposer de plus de cellules pour les expérimentations. Seulement, à notre connaissance, aucune étude visant à comparer les capacités fonctionnelles de cette population à celle purifiée à partir du sang périphérique n'a encore été effectuée. C'est pourquoi, en quête d'une population de neutrophiles fonctionnellement matures dans la moelle osseuse de souris, nous avons utilisé le même gradient de densité que celui employé pour isoler les neutrophiles du sang.

Du point de vue de leur densité (>1,09 g/l : interface 69-75 % Percoll), celle des neutrophiles du sang ou de la moelle osseuse de souris est clairement au-dessus de celle rapportée pour les neutrophiles humains de moelle osseuse (1,086 g/l) (Cowland et Borregaard, 1999) ou les neutrophiles sanguins humains (1,080 g/ml) (Olofsson *et al.*, 1980).

Selon les travaux de Borregaard et Cowland, la différence de densité des différentes populations cellulaires serait la conséquence d'une augmentation du nombre de granules intracellulaires (Cowland et Borregaard, 1999). La différence de densité observée entre les neutrophiles murins et humains pourrait laisser supposer que les neutrophiles murins contiendraient plus de granulations intracytoplasmiques ou des granulations plus denses que leurs homologues humains.

Du point de vue de leur morphologie nucléaire, les noyaux des neutrophiles issus de la moelle osseuse semblent néanmoins moins condensés, ce qui pourrait indiquer que ces cellules sont moins matures que celles purifiées à partir du sang.

Ce protocole nous a permis de récupérer plus de 90 % des neutrophiles morphologiquement mûrs présents dans le sang (92,6 %) et dans la moelle osseuse (93,9 %) des quatre os longs des membres postérieurs d'une souris. Selon Chervenick, le rendement aléatoire des prélèvements sanguins s'explique par le fait que le dénombrement de leucocytes est variable chez les souris. Il est influencé par une variété des facteurs tel que les prélèvements répétés, l'anesthésie au pentobarbital ou à l'éther, l'administration d'héparine, l'heure du prélèvement, le chauffage de la queue avant incision ou tout simplement la souche de souris utilisée (Chervenick *et al.*, 1968; Mouse phenome database web site., 2004). Selon notre propre expérience, nous avons pu constater que des aléas expérimentaux, tel que la coagulation rapide des hématies séquestrant les neutrophiles dans le culot ou un retard dans le minutage de la purification, influencent également ce rendement. En ce qui concerne le taux de recouvrement des neutrophiles de moelle osseuse, il peut s'expliquer à la fois par une certaine difficulté à décrocher les cellules hématopoïétiques de l'intérieur de l'os mais aussi par la détérioration d'un nombre significatif de cellules lors du premier passage de la solution de lavage dans la cavité osseuse. Les travaux de Chervenick révèlent que, malgré l'infiltration de 15 ml de solution à travers les os, près de 10 % des cellules ne se décrochent pas de la matrice osseuse (Chervenick *et al.*, 1968). Pour notre part, nous avons remarqué que la difficulté résidait également dans la coupure des extrémités distales de ces os petits et fragiles. En effet, moins nous retirions d'os avant d'injecter notre solution, meilleur était le rendement.

Parallèlement au rendement, la pureté des préparations était également l'une de nos prérogatives. Les colorations à l'aide d'une solution de Türks, nous ont révélés que 95,5 % des neutrophiles issus de la moelle osseuse et 96,4 % de ceux isolés à partir du sang périphérique, présentaient un noyau en forme de "doughnut" ou segmenté, caractéristique des neutrophiles de souris. Les travaux de Biermann *et al.* ont toutefois rapporté que quelques leucocytes du sang et de la moelle osseuse de souris présentant un noyau en anneau s'avèrent

être des monocytes et non des granulocytes (Biermann *et al.*, 1999). En se basant sur leurs critères morphologiques (diamètre réduit du centre cytoplasmique, noyau à contour irrégulier), une petite minorité des cellules de nos préparations pourrait appartenir à cette catégorie (< 5 %) (cf. figure 30). De plus, ces analyses ont été effectuées sur des suspensions cellulaires qui n'ont pas été purifiées sur gradient de Percoll. Il est donc possible que ces monocytes à noyau en anneau, qui possèdent beaucoup moins de granulations que les neutrophiles, ne présentent pas la même densité que les neutrophiles matures que nous avons isolés et du fait, ne se trouvent pas dans nos suspensions cellulaires.

III-Les neutrophiles de moelle osseuse de souris sont fonctionnellement matures

Le fMLF est un peptide chimiotactique et un puissant activateur des fonctions bactéricides des neutrophiles humains tels que la production d'anions superoxydes (Bylund *et al.*, 2003) et la sécrétion de leurs granules (Johnson *et al.*, 1998; Videm et Strand, 2004). Afin de comparer les capacités fonctionnelles des neutrophiles de souris issus de la moelle osseuse à ceux du sang périphérique, nous avons étudié trois des fonctions bactéricides des neutrophiles : la production d'anions superoxydes, la sécrétion des granules primaires et celle des granules secondaires.

III-1-La production d'anions superoxydes

Comme cela l'a été fait dans les neutrophiles humains sanguins, nous avons démontré que les neutrophiles, issus de la moelle osseuse et du sang de souris, répondent à une stimulation fMLF, par l'activation de la NADPH-oxydase et par la production de radicaux libres notamment d'anions superoxydes (Bylund *et al.*, 2003; Kim et Dinauer, 2001).

La production de dérivés oxygénés par la NADPH-oxydase, en réponse au peptide fMLF, au sein de ces deux populations de neutrophiles murins ont été comparé sur trois points : l' EC_{50} , la cinétique ainsi que l'intensité de la réponse.

Contrairement aux travaux effectués chez l'Homme (Berkow et Dodson, 1986), nous n'avons pas constaté de forte disparité dans l'intensité et la durée de la réponse entre ces deux populations de neutrophiles murins (figure 35). Pour les neutrophiles du sang périphérique, la réponse est maximale à partir de 3 μ M de fMLF alors que, pour les neutrophiles de moelle osseuse, la réponse maximale n'est obtenue qu'à partir de 10 μ M de fMLF. Néanmoins, la

réponse maximale des cellules de moelle est quasi identique à celle des cellules sanguines. Ainsi, bien que les neutrophiles sanguins ($0,52 \mu\text{M}$) répondent à une stimulation fMLF avec une affinité légèrement plus forte que les neutrophiles de la moelle osseuse ($2,10 \mu\text{M}$), l'ensemble de nos résultats n'a révélé que des différences mineures entre les réponses de ces deux populations de neutrophiles.

Du point de vue de l'activation du complexe NADPH-oxydase, les neutrophiles murins de moelle osseuse sont donc aussi fonctionnels que ceux du sang périphérique.

Chez les neutrophiles humains, le complexe NADPH-oxydase peut également être activé par des agonistes de la protéine kinase C (PKC) tels que le PMA (Karlsson *et al.*, 2000). Nos résultats nous ont permis de constater que, comme pour les neutrophiles humains, le PMA induit l'activation de la NADPH-oxydase des neutrophiles murins et une production d'anions superoxydes plus lente mais plus soutenue que celle observée en réponse au fMLF.

Au cours d'une réponse immune, selon le type de stimulation perçu par le neutrophile, la production de dérivés oxygénés peut avoir lieu soit à l'intérieur du phagosome soit vers le milieu extracellulaire, soit vers les deux milieux à la fois. Ainsi, les travaux de Bylund et de Lundqvist ont montré que dans les neutrophiles humains, l'activation directe de la PKC par des esters de phorbol, tel que le PMA, entraîne la production de FROs par les oxydases intracellulaires et extracellulaires (Bylund *et al.*, 2003; Lundqvist et Dahlgren, 1996), quoique par des voies de signalisations légèrement différentes de transduction de signal (Karlsson *et al.*, 2000; Dahlgren et Karlsson, 1999). Il peut donc y avoir une production intracellulaire de FROs sans qu'il y ait préalablement de phagocytose. Par contre, pour les neutrophiles humains stimulés par le peptide bactérien fMLF, la production d'anions superoxydes a lieu exclusivement au niveau extracellulaire (Bylund *et al.*, 2003). Nos expériences ayant été réalisées en présence de luminol, nous ne sommes pas en mesure de définir de quel côté de la membrane plasmique s'effectue la production des radicaux libres par la NADPH-oxydase des neutrophiles murins. Nous ne pouvons qu'affirmer que la dégradation du luminol est effectivement due à la production d'anions superoxydes et non pas à l'action d'enzymes ou d'autres dérivés oxygénés. Cependant, la SOD ne pouvant traverser les membranes, reste de ce fait principalement du côté extracellulaire. Sa présence dans le milieu réactionnel inhibe la dégradation du luminol, il est donc possible que la majorité des anions superoxydes soient produits du côté extracellulaire.

III-2-La sécrétion des granules primaires

Une caractéristique des neutrophiles est la présence de plusieurs types de granules intracytoplasmiques qui ont des rôles physiologiques spécifiques et des mécanismes d'exocytose partiellement distincts. Ils contiennent 4 types distincts des granules et de vésicules sécrétoires, synthétisées au fur et à mesure de la maturation cellulaire, qui sont libérés de façon hiérarchique (Borregaard *et al.*, 1993; Ligeti et Mocsai, 1999). En général, l'exocytose des granules primaires exige une stimulation plus importante. Ce qui pourrait refléter la nécessité d'un contrôle rigoureux de l'exocytose de ces granules qui contiennent les substances les plus agressives.

Dans un premier temps, nous avons pu remarquer que les deux populations de neutrophiles murins présentent la même activité totale de β -glucuronidase et que, malgré de fortes concentrations de fMLF, ces cellules ne libéraient au maximum que 20 % de la totalité de leurs granules primaires. Comme nous l'avions précédemment constaté pour la production d'anions superoxydes, la réponse des neutrophiles du sang périphérique est maximale à partir de 3 μ M de fMLF alors que, pour les neutrophiles de moelle osseuse, la réponse maximale n'est obtenue qu'à partir de 10 μ M de fMLF. De plus, la réponse maximale des neutrophiles de moelle osseuse, n'est pas statistiquement différente de celles des cellules du sang. De la même façon, les neutrophiles sanguins (0,71 μ M) répondent à une stimulation fMLF avec une affinité légèrement plus élevée que les neutrophiles de moelle osseuse (1,19 μ M).

La réaction stimulus - sécrétion implique plusieurs étapes de la voie de signalisation. Ces étapes peuvent être activées par des agonistes spécifiques. Un agoniste de la protéine kinase C (PKC) tel que l'acétate de myristate de phorbol (PMA) (Karlsson *et al.*, 2000; Bylund *et al.*, 2003) ou un ionophore calcique (Nakao *et al.*, 1998; McPhail *et al.*, 1984) sont connus pour activer la production d'anions superoxydes dans le neutrophile humain. Bien que capables d'activer le complexe NADPH-oxydase, la réponse des neutrophiles humains à ces deux activateurs reste cependant plus faibles que celle observée en réponse au peptide fMLF. Au travers de nos résultats, nous avons pu également constater que le PMA et l'ionophore calcique A23187, bien que moins puissants que le fMLF, sont des agonistes efficaces de la sécrétion des granules primaires de la part des neutrophiles murins, du sang aussi bien que de moelle osseuse.

Nos résultats n'ayant révélés que des différences mineures dans le comportement de ces deux populations de neutrophiles murins, nous pouvons donc conclure que du point de vue de

l'exocytose des granules primaires, les neutrophiles de la moelle osseuse sont aussi fonctionnels que ceux du sang.

Nous démontrons ici que les neutrophiles de souris, comme les neutrophiles humains, libèrent les granules primaires après stimulation par le peptide fMLF, le PMA ou l'ionophore calcique A23187 (Abdel-Latif *et al.*, 2004; Van Spriël *et al.*, 2001). Il faut toutefois noter une certaine différence de sensibilité au peptide fMLF entre les neutrophiles du sang, humains et murins. En effet, l' EC_{50} de ce peptide est de 0,71 μ M pour les neutrophiles murins alors qu'il n'est que de 0,01 μ M pour les neutrophiles humains (Barrowman *et al.*, 1986). Il semble également que contrairement aux neutrophiles murins (20 %), les neutrophiles humains soient capables d'exocytter jusqu'à près de 60 % de leur granules primaires en réponse à une stimulation par le fMLF en présence de cytochalasine B (Van Spriël *et al.*, 2001).

III-3-La sécrétion des granules secondaires

Nous savons, grâce aux travaux de Mocsai que les neutrophiles murins possèdent de la lactoferrine dans leurs granules secondaires. Sa sécrétion a d'ailleurs pu être mise en évidence chez des neutrophiles murins, adhérents, de moelle osseuse (Mocsai *et al.*, 1999).

En testant la spécificité de notre solution d'anticorps anti-lactoferrine (figure 46), nous pouvons noter une légère différence de migration entre la protéine humaine et la protéine murine. En effet, en dépit d'un nombre comparable d'acides aminés (711 pour humain, numéro d'accèsion NP_002334 ; 707 pour la souris, numéro d'accèsion BAA13633 ; rapport d'identité des protéines : 70%) et une masse moléculaire théorique semblable (78,3 kDa pour l'humain, 77,7 kDa pour la souris), la lactoferrine humaine présente, à la migration, une différence de 4 kDa par rapport à la lactoferrine murine alors que l'analyse de la séquence protéique ne nous laisser attendre qu'un écart de seulement 0,6 kDa. Cette différence de migration pourrait être expliquée par une différence dans le nombre de sites de glycosylation entre ces deux protéines. En effet, la chaîne polypeptidique de la lactoferrine humaine possède deux sites de glycosylation et cinq structures différentes de glycopeptide possibles (Spik *et al.*, 1982) alors que la lactoferrine murine ne présente qu'un seul site de glycosylation et un seul type de résidu glycosylé (Leclercq *et al.*, 1987).

En accord avec les résultats obtenus chez les neutrophiles humains, le PMA et l'ionophore calcique sont de meilleurs stimulants des granules secondaires que des granules

primaires (Lew *et al.*, 1986; Chou *et al.*, 1999) et de plus puissant agonistes que le fMLF en ce qui concerne les neutrophiles de moelle osseuse.

En ce qui concerne la sécrétion des granules secondaires, l'ensemble de nos résultats nous amène aux mêmes conclusions que celles émises pour la production d'anions superoxydes et la sécrétion des granules primaires. C'est à dire que du point de vue de l'exocytose des granules secondaires, les neutrophiles de la moelle osseuse sont aussi fonctionnels que ceux du sang.

L' EC_{50} des neutrophiles sanguins nous révèle une valeur (0,8 μ M) proche de celle obtenue pour les autres tests effectués (libération de radicaux oxygénés: 0,52 μ M et sécrétion des granules primaires: 0,71 μ M). Par contre, contrairement à ce que nous avons pu observer pour la production de radicaux libres (2,1 μ M) et pour l'exocytose des granules primaires (1,19 μ M), les neutrophiles de la moelle répondent à une stimulation par le fMLF avec une affinité légèrement plus élevée (0,2 μ M) que les neutrophiles sanguins. Tout se passe donc comme si la mise en place des systèmes de contrôle de l'exocytose des granules secondaires se situait dans les étapes finales de la différenciation cellulaire. De plus, il est possible que la sécrétion des granules secondaires soit nécessaire aux neutrophiles lors de sa diabase donc avant tout contact bactérien. Ce qui expliquerait pourquoi la sécrétion des granules secondaires en réponse au peptide fMLF serait plus importante dans les neutrophiles de moelle osseuse.

III - Conclusion.

Bien que moins sensibles au fMLF que leurs homologues humains (Gao et Murphy, 1993; Hartt *et al.*, 1999; Lavigne *et al.*, 2002), les neutrophiles de souris répondent également à cet agoniste par la production d'anions superoxydes par la NADPH-oxydase (Bylund *et al.*, 2003) ainsi que par la sécrétion de leur granules (Mocsai *et al.*, 1999; Abdel-Latif *et al.*, 2004). Comme chez l'Homme, nous avons pu montrer que, *in vitro*, l'induction des réponses microbicides des neutrophiles murins en réponse au peptide fMLF, nécessite la présence d'un agent de perturbation du cytosquelette : la cytochalasine B (Mocsai *et al.*, 1999; Ligeti et Mocsai, 1999; Bengtsson *et al.*, 1991).

L'ensemble de nos résultats n'a révélé que des différences mineures entre les réponses de ces deux populations de neutrophiles murins tant du point de l'activation de la NADPH-oxydase que de la sécrétion des granules primaires ou secondaires. Ainsi, en utilisant le même type de gradient de densité, nous avons obtenu des préparations de neutrophile de sang et de moelle osseuse de souris qui sont très semblables en ce qui concerne leur morphologie et leur

fonction. De plus, au travers des divers Ec_{50} du peptide fMLF observés au cours de toutes ces analyses (tableau 16), il semblerait qu'il existe une hiérarchie dans l'installation des fonctions bactéricides au cours de la maturation cellulaire du neutrophile. Il y aurait d'abord sécrétion des granules secondaires, peut-être pour faciliter le passage transendothélial des neutrophiles, puis sécrétion des granules primaires et quasi-simultanément production d'anions superoxydes afin, entre autres, d'activer certaines enzymes tels que la collagénase ou la myéloperoxydase (Borregaard et Cowland, 1997). Ce schéma reflète exactement ce qui est observé lors d'une activation des neutrophiles lors d'une infection bactérienne.

Ec_{50} fMLF (en μ M)	Sang	Moelle osseuse
Production d'anions superoxydes	$0,52 \pm 0,10$	$2,10 \pm 0,54$
Exocytose des granules primaires	$0,71 \pm 0,11$	$1,19 \pm 0,09$
Exocytose des granules secondaires	$0,80 \pm 0,13$	$0,20 \pm 0,05$

Tableau 16 : Récapitulatif des Ec_{50} du fMLF obtenus pour chacune des fonctions bactéricides étudiées.

Le principal rôle de ces neutrophiles fonctionnellement matures au sein de cette réserve qu'est la moelle osseuse, pourrait être de remplacer les neutrophiles périphériques ou d'accroître leur nombre lors d'une demande accrue de l'organisme comme par exemple lors d'une infection. Le volume de cette réserve serait dépendant non seulement du degré de prolifération de ces cellules mais aussi de leur taux de migration vers le sang périphérique puis dans les tissus.

Comparativement à l'Homme, la souris possède deux fois moins de neutrophiles morphologiquement matures dans sa moelle osseuse et près de sept fois moins de neutrophiles circulants dans son sang. De plus, les neutrophiles morphologiquement matures présents dans sa moelle osseuse sont fonctionnels. Tout se passe comme si la souris retenait les neutrophiles matures dans la moelle osseuse de façon à posséder une "armée" de cellules prêtes à intervenir en cas d'infection. La souris serait ainsi mieux préparée pour répondre à une attaque exogène.

Pour Berkow et Dodson, les neutrophiles de la moelle osseuse humaine sont considérés comme morphologiquement matures mais fonctionnellement immature car ils présentent une faible capacité d'adhérence et de phagocytose, et parce qu'ils produisent très peu de dérivés oxygénés suite à une stimulation par le fMLF (Berkow et Dodson, 1986). Toutefois des études complémentaires seraient nécessaires pour compléter ces résultats. L'étude individuelle des différentes fractions cellulaires obtenues par gradient de Percoll pourrait peut-être révéler qu'une partie de la réserve de neutrophiles de la moelle osseuse humaine est aussi fonctionnelle que celle de la souris.

**Le peptide WKYMVm-NH₂
agit via les récepteurs
membranaires des peptides
N-formylés et active les
neutrophiles de moelle
osseuse via de multiples voies
de transduction du signal.**

Résultats

Nos premiers résultats montrent que la moelle osseuse de souris contient un pool, une réserve de neutrophiles fonctionnellement matures (Boxio *et al.*, 2004). De plus, ce pool contient vingt trois fois plus de neutrophiles que le sang. Pour la suite de nos expériences, les neutrophiles de souris issus de la moelle osseuse constituent donc une alternative plus attrayante et tout aussi valable que les neutrophiles du sang périphérique.

A l'aide de nos techniques d'analyses des activités bactéricides du neutrophile, nous avons voulu étudier la sensibilité de la réponse des polynucléaires neutrophiles de moelle osseuse de souris à une stimulation par le peptide de WKYMVm. D'autre part, le schéma de signalisation intracellulaire des peptides bactériens N-formylés étant connu chez l'Homme (Le *et al.*, 2002), la cascade de signalisation intracellulaire du peptide WKYMVm chez la souris restait à définir.

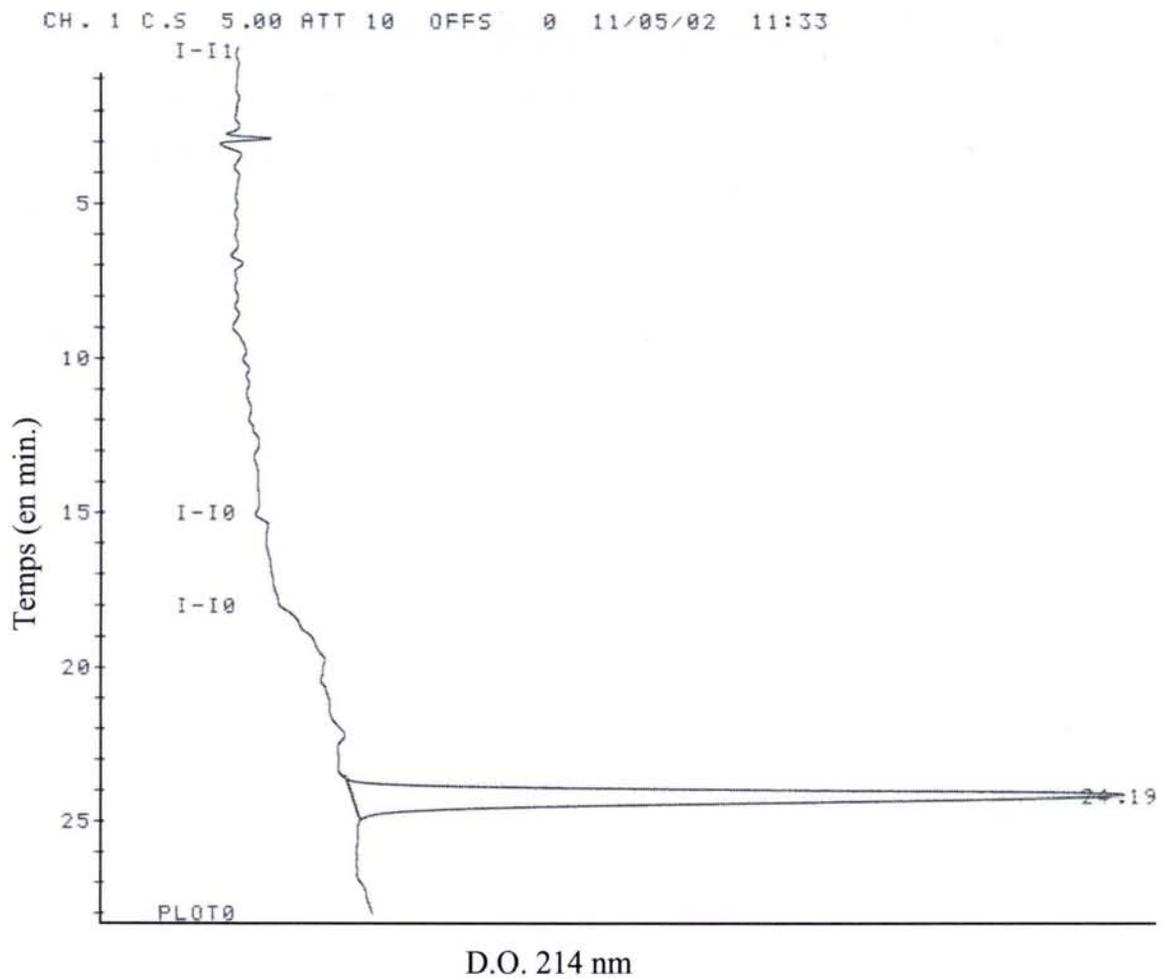
Les expériences ont été réalisées sur des échantillons de 20000 neutrophiles de moelle osseuse pour les mesures de l'activité de l'enzyme β -glucuronidase et pour la production d'anions superoxydes. Par contre, les études concernant la sécrétion de lactoferrine ont été menées sur des échantillons de 50000 cellules de moelle osseuse. En effet, le test ELISA présentant un fort bruit de fond, nous avons travaillé sur deux fois et demi plus de cellules pour obtenir une quantité de lactoferrine sécrétée plus importante et ainsi pallié ce problème.

I-Etude de la pureté du peptide WKYMVm-NH₂

I-1-Purification à l'aide d'une HPLC en phase inverse

La synthèse du peptide WKYMVm-NH₂ en phase solide (SPPS) terminée, une HPLC en phase inverse a été réalisée pour purifier le peptide brut (cf. chapitre Matériel et méthodes, § VI).

D'après la figure 51 ci-dessous, on peut ainsi observer que les différentes étapes de couplage ont abouti à la synthèse d'un seul type de peptide (1 seul pic ; pureté 100 % ; rendement 25 mg après purification).



D-2500 11/05/02 11:33

METHOD: REGIS TAG: 409 CH: 1

FILE: 2 CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC
1	24.19	21735733	100.000	BB
TOTAL		21735733	100.000	

Figure 51 : Chromatographe du peptide néosynthétisé par HPLC.

I-2-Authentification par spectrométrie de masse

Le peptide présent dans ce pic est recueilli séparément. La qualité de ce peptide a ensuite été contrôlée par le Dr Vanderesse par spectrométrie de masse (figure 52). Sa masse a alors été établie à 856,22 g / mole donc quasiment identique a la masse théorique (855,41 g / mole).

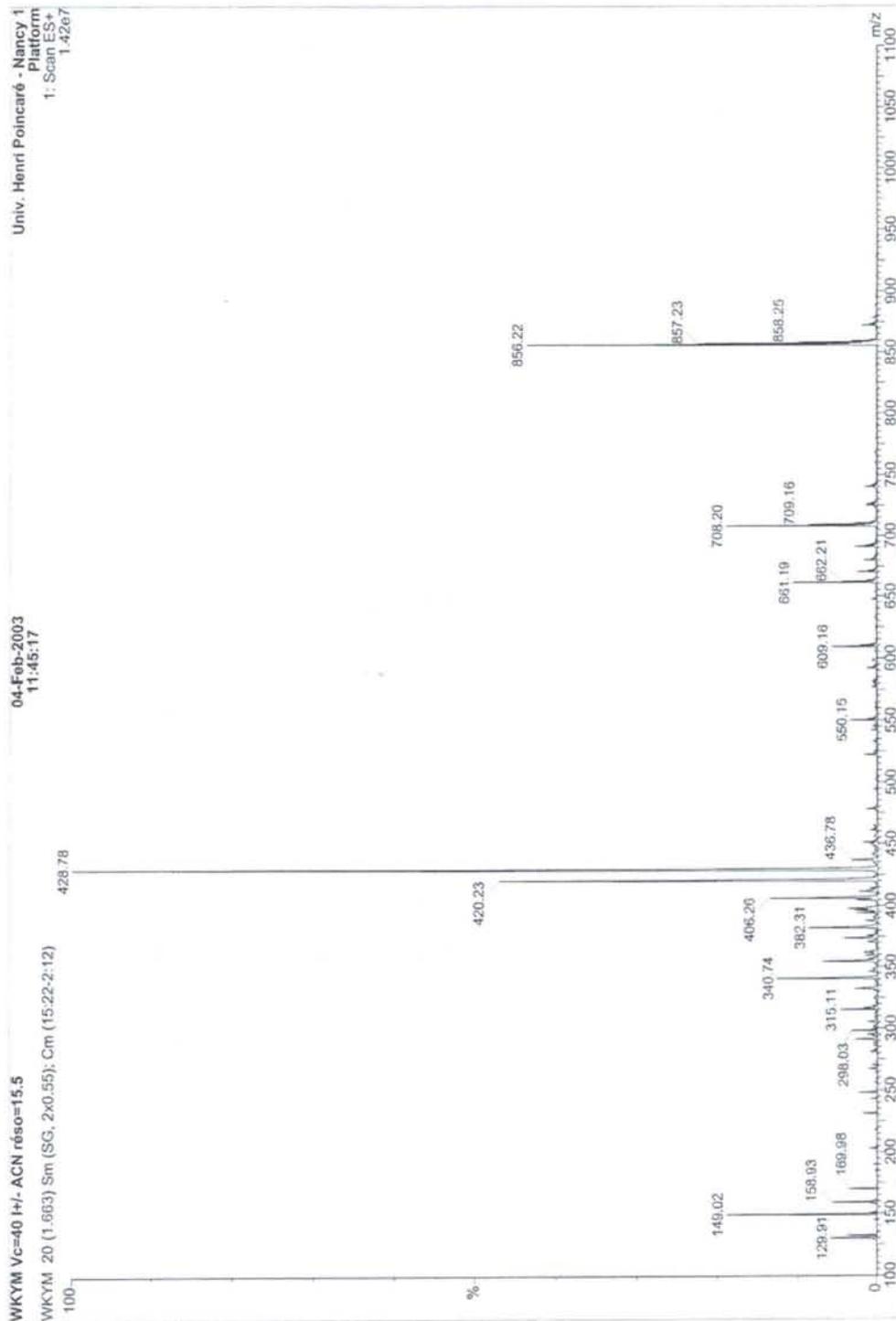


Figure 52: Spectrométrie de masse. Masse théorique 855,41 ; pic parent de masse expérimentale 856,22 pour $[M+H]^+$.

II-Tests fonctionnels

En utilisant les méthodes d'études des fonctions bactéricides du neutrophile de souris précédemment mises au point, nous avons étudié la sensibilité de la réponse de ces cellules suite à une stimulation par le peptide WKYMVm. Nous avons ensuite comparé la réponse obtenue avec les concentrations optimales de ce peptide avec celle obtenues pour une concentration optimale de fMLF. Enfin, comme nous l'avons effectué pour le fMLF, nous avons cherché à savoir si la présence de cytochalasine B dans le milieu réactionnel a un effet sur la réponse bactéricide du neutrophile de souris.

II-1-Etude de l'exocytose des granules primaires en réponse au peptide WKYMVm.

Nous avons dans un premier temps étudié l'activité de la β -glucuronidase en réponse à différentes concentrations de WKYMVm (figure 53).

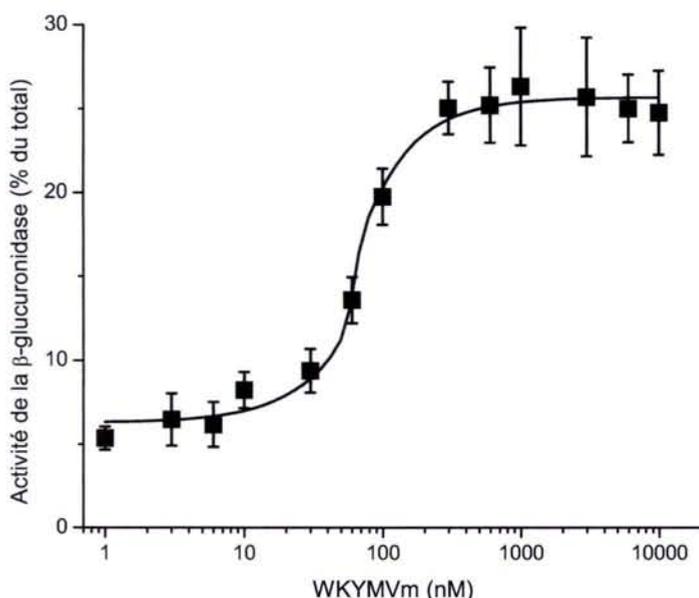


Figure 53: Courbe concentration-effet de la sécrétion des granules primaires induite par le peptide WKYMVm en présence de cytochalasine B (5 μ g/ml). Barres : écarts-types moyens (n = 7).

Le peptide WKYMVm permet d'induire l'exocytose des granules primaires des neutrophiles de moelle osseuse de souris. Comme nous l'avons remarqué au cours des expériences effectuées en présence de fMLF, malgré de fortes concentrations d'agonistes, les cellules ne libèrent pas la totalité de leurs granules primaires. Il semble toutefois que le peptide WKYMVm soit un meilleur agoniste que le fMLF car son EC_{50} est de $70,5 \pm 4,5$ nM alors que celui du fMLF atteint $1,19 \pm 0,094$ μ M.

Nous avons voulu comparer l'activité de la β -glucuronidase en réponse à une stimulation par des concentrations optimales de ces deux agonistes, choisies à l'aide de la figure 35 pour le fMLF et à partir de la figure 53 pour le WKYMVm. Ces deux figures

indiquant que la sécrétion des granules primaires par les neutrophiles de moelle osseuse est maximale à partir de 10 μ M de fMLF et à partir de 300 nM de WKYMVm. Du point de vue de l'exocytose des granules primaires, la réponse des neutrophiles de moelle osseuse est donc significativement plus sensible au peptide WKYMVm qu'au peptide fMLF ($p < 0,05$) mais pas significativement plus importante puisque la réponse au fMLF représente près de 86 % de la réponse au WKYMVm.

II-2-Etude de l'exocytose des granules secondaires en réponse au peptide WKYMVm

Après l'étude de la sécrétion des granules primaires, nous nous sommes penchés sur celle des granules secondaires (figure 54) :

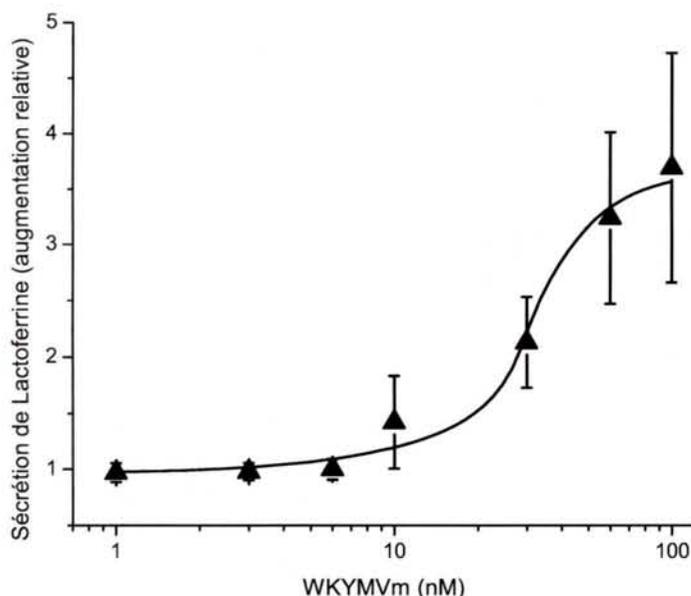


Figure 54: Courbe concentration-effet de la sécrétion des granules secondaires en réponse à différentes concentrations du peptide WKYMVm en présence de cytochalasine B (5 μ g/ml). Ces valeurs sont exprimées par rapport à la quantité de lactoferrine libérée par les cellules stimulées par le solvant de ce peptide, le DMSO. Barres : écarts-types moyens (n = 5).

De nouveau, nous pouvons observer qu'à partir d'une certaine concentration d'agoniste, la réponse est maximale et n'augmente plus. Les neutrophiles ont-ils épuisés la totalité de leurs granules secondaires ou plus probablement comme nous avons pu le constater pour les granules primaires, ne peuvent-ils excréter qu'une partie de leurs granules secondaires ?

Néanmoins, nous constatons que l' EC_{50} du WKYMVm est de $31 \pm 1,8$ nM alors que celui du fMLF est de 200 ± 50 nM (figure 35). Comme pour la sécrétion des granules primaires, la réponse des neutrophiles de moelle osseuse est significativement plus sensible au peptide WKYMVm qu'au peptide fMLF ($p < 0,05$).

Cette figure nous montre également que le dégagement maximal de lactoferrine en réponse au peptide WKYMVm (augm. rel. 3,5) est plus important que celui obtenu en réponse au peptide fMLF (augm. rel. 1,5). Du point de vue de l'exocytose des granules secondaires,

les neutrophiles de moelle osseuse de souris répondent plus fortement et avec une meilleure affinité au WKYMVm qu'au peptide fMLF.

II-3-Quantification de la production d'anions superoxydes en réponse au peptide WKYMVm

Nous avons ensuite caractérisé l'activité de la NADPH-oxydase en réponse à des concentrations croissantes du peptide WKYMVm (figure 55).

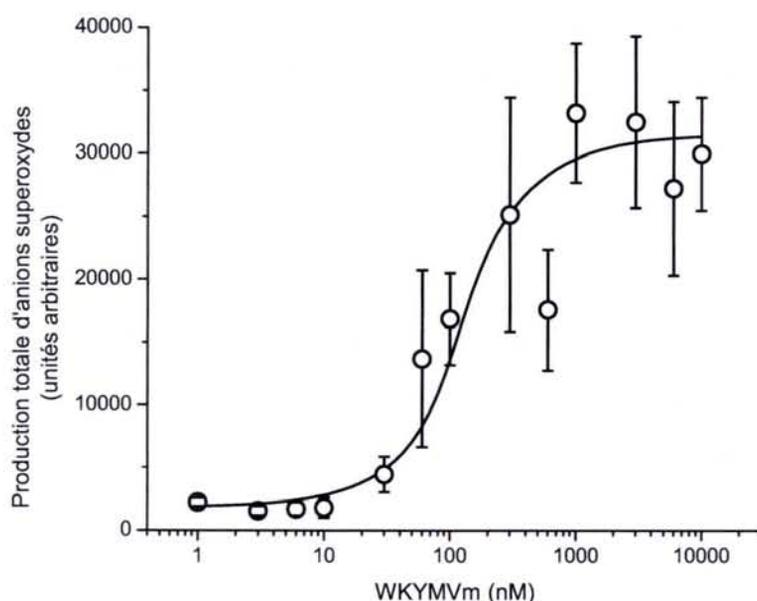


Figure 55: Courbe concentration-effet d'aspect sigmoïde de la production totale de FRO induite par différentes concentrations de WKYMVm en présence de la cytochalasine B (5 µg/ml). Les points représentent la moyenne de plusieurs expériences. Barres : écarts-type moyens (n = 4).

Ce graphique nous montre que pour les neutrophiles de la moelle, la réponse est dépendante de la concentration d'agoniste et est maximale à partir de 1 µM de WKYMVm. Avec cette figure, on observe de nouveau que l' EC_{50} du peptide WKYMVm ($133 \pm 9,9$ nM) est significativement plus important que celui obtenu pour le fMLF ($2,1 \pm 0,54$ µM) (figure 35) ($p < 0,05$). Du point de vue de la réponse oxydative, comme du point de vue de la sécrétion des granules primaires et secondaires, les neutrophiles présentent une affinité significativement plus importante pour le peptide WKYMVm que pour le peptide bactérien fMLF. Par contre, il ne semble pas y avoir de différences d'intensité de la réponse oxydative suite à une stimulation par de fortes concentrations de peptide, qu'il s'agisse du WKYMVm ou du fMLF.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons comparé l'activité de la NADPH-oxydase sur deux plans : la cinétique de la réponse oxydative et la production totale d'anions superoxydes en réponse à une stimulation par des concentrations optimales de ces deux agonistes. A l'aide de la figure 55 et de la figure 35, nous avons choisi des concentrations optimales de 300 nM pour le WKYMVm et de 3 µM pour le fMLF.

II-3-A-Cinétique de la production d'anions superoxydes

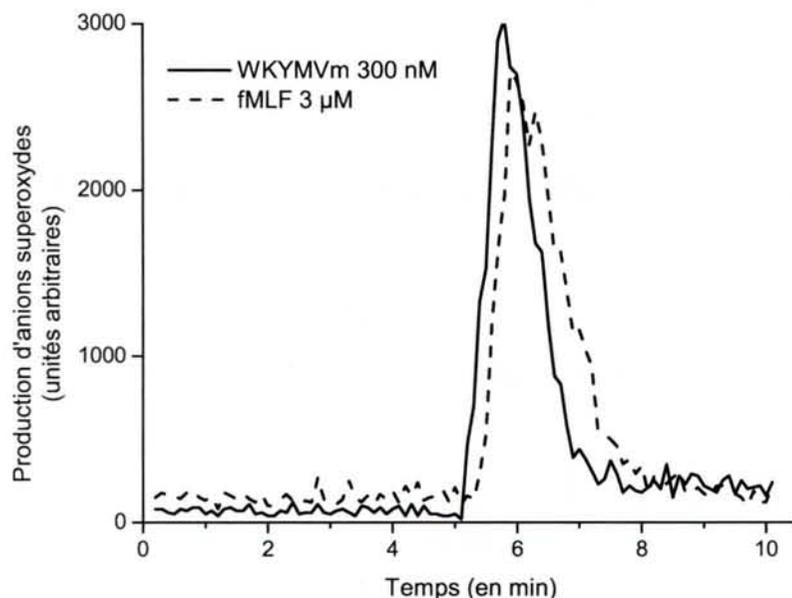


Figure 56: Cinétique de production d'anions superoxydes par les neutrophiles de moelle suite à une stimulation par 300 nM de WKYMVm ou par 3 µM de fMLF en présence de cytochalasine B (5 µg/ml). Cette figure montre une expérience représentative (n = 5).

Comme le montre la figure 56, en présence de cytochalasine B, le WKYMVm comme le fMLF induit une production rapide et transitoire de dérivés oxygénés. De plus, la réponse induite par 300 nM de WKYMVm présente la même cinétique et semble être de même intensité que celle induite par 3 µM de fMLF.

II-3-B-Production totale d'anions superoxydes.

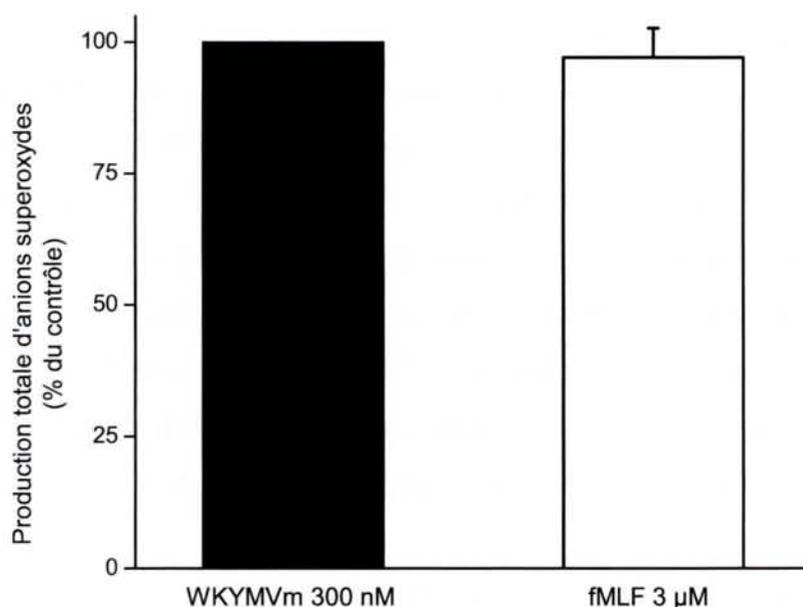


Figure 57: Comparaison de la production totale d'anions superoxydes des neutrophiles de moelle osseuse en réponse à une stimulation par 300 nM de WKYMVm (barre noire) ou par 3 µM de fMLF (barre blanche). Ces résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle, ici 300 nM de WKYMVm (n = 5)

Les résultats exprimés dans cette figure montre que la production totale d'anions superoxydes en réponse à une stimulation par les concentrations optimales de WKYMVm (300 nM) et de fMLF (3 µM) est identique. Contrairement à ce que nous avons pu observer

pour la sécrétion des granules secondaires, la sécrétion des granules primaires ainsi que la production totale d'anions superoxydes sont identiques lorsque les préparations cellulaires sont stimulées avec les concentrations optimales de ces agonistes. Il est cependant nécessaire d'employer 10 fois plus de fMLF pour obtenir une réponse équivalente à celle obtenue en présence de WKYMVm

II-4-Effet de la cytochalasine B sur la réponse microbicide

Nous avons précédemment démontré que la réponse bactéricide des neutrophiles, en réponse à une stimulation par le fMLF, est augmentée par la préincubation des cellules avec la cytochalasine B. Ceci a été démontré aussi bien pour l'exocytose des granules primaires (figure 43) et secondaires (figure 49) que pour la production de dérivés oxygénés (figure 37).

Nous avons donc étudié l'effet de la cytochalasine B sur l'exocytose des granules (granules primaires) et sur l'activité de la NADPH-oxydase en réponse à une stimulation par le WKYMVm.

II-4-A-Effet de la cytochalasine B sur l'exocytose des granules primaires

L'effet de la cytochalasine B sur les neutrophiles stimulés par 300 nM de WKYMVm a été étudié en incubant des cellules en présence (5 µg/ml) ou non de cytochalasine B, 10 min avant l'addition de l'agoniste (figure 58).

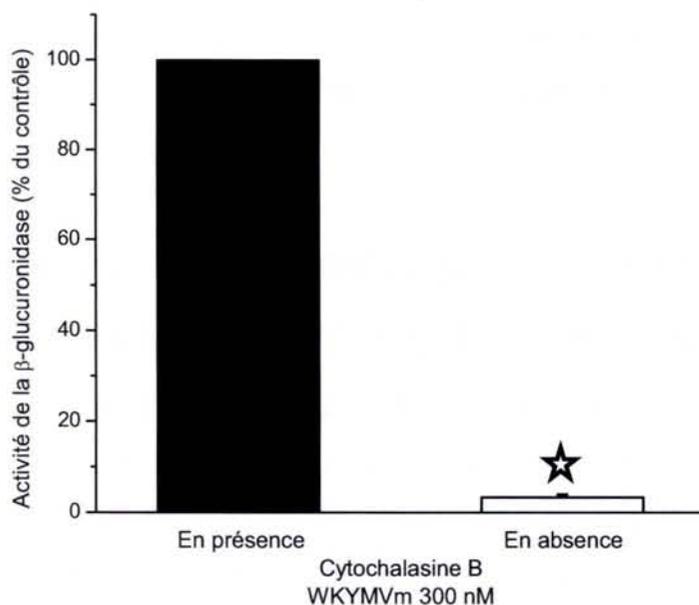


Figure 58: Comparaison de l'activité de la β-glucuronidase de neutrophiles incubés en présence (barre noire) ou en absence (barre blanche) de cytochalasine B (5 µg/ml). Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (ici en présence de cytochalasine B) selon leur moyenne ± l'écart-type moyen (n = 4 ; p < 0,05).

L'absence de cytochalasine B réduit considérablement la sécrétion des granules primaires : 3,3 % de l'activité β -glucuronidase obtenus avec le contrôle, à savoir en présence de cytochalasine B.

II-4-B- Effet de la cytochalasine B sur l'activation de la NADPH-oxydase

Nous avons également étudié l'effet de la cytochalasine B sur l'activité de la NADPH-oxydase.

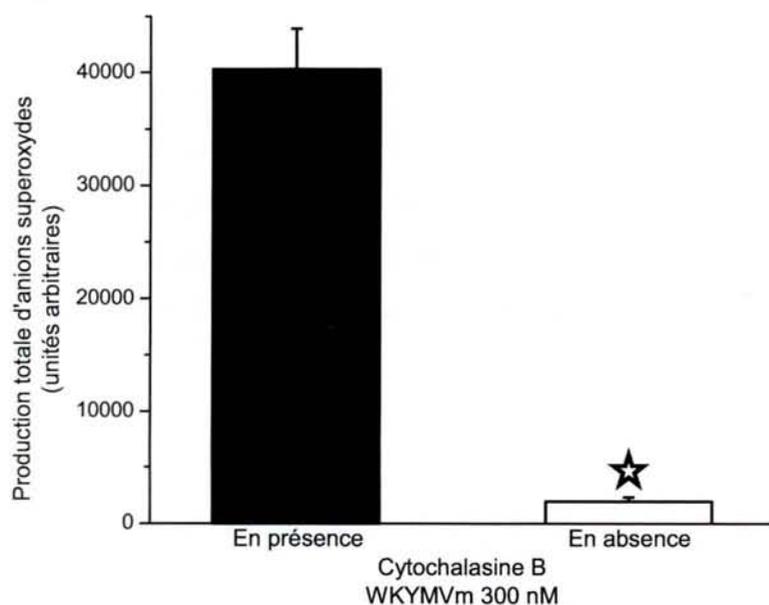


Figure 59: Comparaison de l'activité de la production totale d'anions superoxydes par des neutrophiles incubés en présence (barre noire) (5 μ g/ml) ou en absence (barre blanche) de cytochalasine B. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (ici en présence de cytochalasine B) selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen (n = 3 ; p < 0,05).

En absence de cytochalasine B, l'activité de la NADPH-oxydase est réduite à 5,0 % du contrôle (stimulation WKYMVm en présence de cytochalasine B). Ces résultats confirment ceux obtenus en présence du peptide bactérien fMLF : *in vitro*, la réponse microbicide des neutrophiles de souris est dépendante de la présence de cytochalasine B.

III-Identification des voies de signalisations intracellulaire impliquées dans une stimulation par le peptide WKYMVm-NH₂

Le peptide WKYMVm est connu pour stimuler un récepteur couplé à une protéine G hétérotrimérique de la famille de Gi/Go. L'activation de ce dernier induit une cascade de signalisation intracellulaire passant par de nombreuses protéines dont la PI3-kinase, l'adénylate cyclase et la phospholipase C. Nous avons examiné l'implication des branches de cette voie de signalisation à l'aide de plusieurs inhibiteurs des voies de signalisation intracellulaires. Le but était de déterminer les protéines impliquées dans l'activation de neutrophile par le peptide WKYMVm (en présence de cytochalasine B).

Etant donné qu'aucun de ces inhibiteurs n'est complètement spécifique pour une voie simple, nous avons déterminé l' Ic_{50} pour plusieurs d'elles. Cette approche permettra une comparaison avec l'action connue de ces inhibiteurs dans d'autres cadres expérimentaux, en particulier l'activation des neutrophiles humains par le fMLF. Les résultats sont exprimés par rapport au contrôle, c'est-à-dire des témoins d'expériences où l'inhibiteur est remplacé par la même concentration de solvant (DMSO ou eau pour le $LaCl_3$ et les peptides C2 et E11) puis stimulés par la concentration d'agoniste appropriée.

III-1-Etude de la voie PI3-kinase

Pour étudier la transduction du signal via la PI3-kinase, nous avons testé deux inhibiteurs de cette protéine : la wortmannine et le LY-294002.

III-1-A-Effet d'un inhibiteur de la PI3-K: la Wortmannine.

III-1-A-a-Effet de la Wortmannine sur la sécrétion des granules primaires en réponse au WKYMVm

L'effet de la wortmannine sur l'activation des neutrophiles a tout d'abord été caractérisé sur la sécrétion des granules primaires (figure 60).

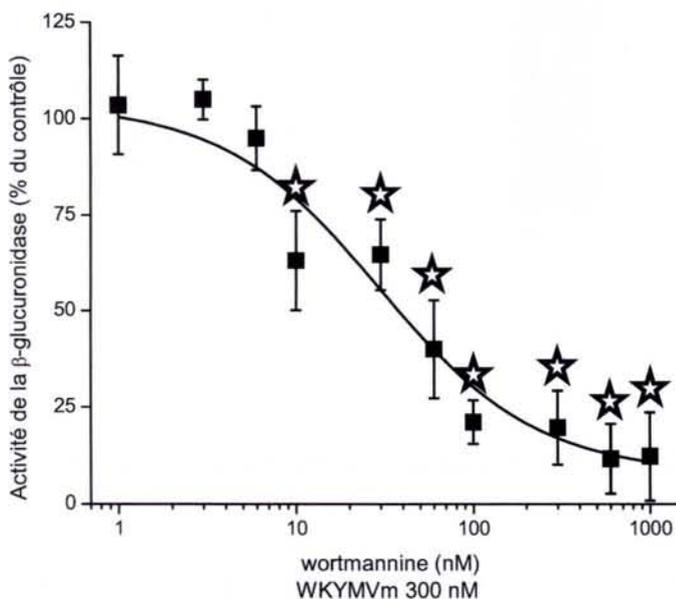


Figure 60: Courbe concentration-effet d'aspect sigmoïde de l'activité de la β -glucuronidase de neutrophiles de moelle osseuse en présence de concentrations croissantes de wortmannine. Les points représentent la moyenne de plusieurs expériences ($p < 0,05$; $n = 4$). Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO + WKYMVm 300 nM). Barres : écart - type moyen.

Ce graphique nous montre que la sécrétion des granules primaires est dépendante de la concentration de la concentration de wortmannine utilisée. De plus, à partir de 10 nM, l'effet de la wortmannine sur la sécrétion des granules primaires est significatif. A l'aide de cette figure, nous avons pu établir l' Ic_{50} de la wortmannine à $30,1 \pm 1,3$ nM. La PI3 kinase est donc une voie de signalisation importante pour l'exocytose des granules azurophiles.

III-1-A-b-Effet de la Wortmannine sur la sécrétion des granules secondaires en réponse au WKYMVm

Au vu de ce résultat, nous avons choisi trois concentrations de wortmannine susceptibles d'inhiber la sécrétion des granules secondaires (figure 61).

L'effet de la wortmannine sur la sécrétion de lactoferrine des neutrophiles de moelle osseuse en réponse à une stimulation par 60 nM de WKYMVm est significatif à partir de 300 nM de wortmannine ($p < 0,05$). Contrairement à l'exocytose des granules primaires, la sécrétion des granules secondaires semble moins sensible à la présence de wortmannine. En effet, les résultats précédents (figure 60) montrent une inhibition de plus de 80 % pour ces concentrations de wortmannine alors que dans le cas des granules secondaires, cette inhibition n'est que de 25 %, 40 % et 45 % (pour respectivement, 100 nM, 300 nM et 1 μ M de wortmannine). La voie PI3-kinase n'est donc pas la seule voie impliquée dans la sécrétion des granules primaires et secondaires.

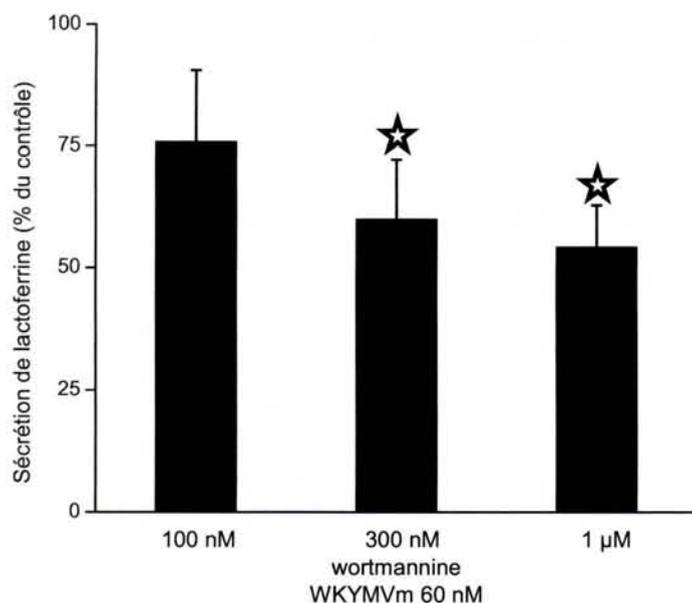


Figure 61: Comparaison de l'exocytose des granules secondaires des neutrophiles incubés en présence de wortmannine. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO + WKYMVm 60 nM) selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen (n = 5).

III-1-A-c-Effet de la Wortmannine sur la production d'anions superoxydes en réponse au WKYMVm

Nous avons ensuite poursuivi l'étude la voie de signalisation PI3 kinase sur la production totale d'anions superoxydes. Nous avons choisi de tester les quatre points principaux de la gamme testés sur la sécrétion des granules primaires, à savoir 1 nM, 10 nM, 100 nM et 1 μ M de wortmannine (figure 62).

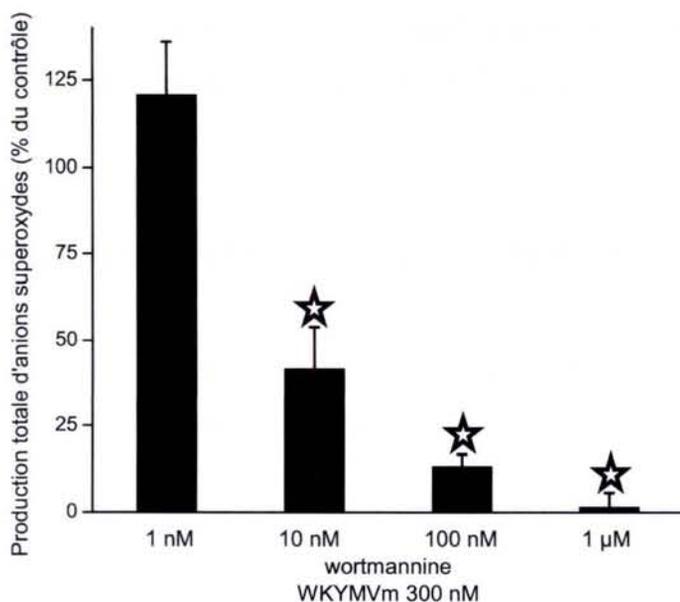


Figure 62 : Comparaison de l'activité de la production totale d'anions superoxydes par des neutrophiles incubés en présence de wortmannine. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO + WKYMVm 300 nM) selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n \geq 4$).

L'effet de la wortmannine sur l'activité de la NADPH-oxydase des neutrophiles de moelle osseuse en réponse à une stimulation par 300 nM de WKYMVm est significatif à partir de 10 nM de wortmannine ($p < 0,05$). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour l'exocytose des granules primaires. En effet, à ces mêmes concentrations, les pourcentages d'inhibition de la réponse microbicide sont proches (37 %, 79 % et 88 % pour la sécrétion des granules primaires, 60 %, 87 % et 99 % pour la production d'anions superoxydes, pour respectivement 10 nM, 100 nM et 1 μ M de wortmannine). La PI3 kinase serait donc une voie de signalisation importante non seulement pour la sécrétion des granules primaires mais aussi pour la réponse oxydative. Par contre, elle ne serait pas une voie indispensable dans l'exocytose des granules secondaires.

III-1-B-Etude des effets d'un autre inhibiteur de la PI3-K: le LY-294002

Afin de s'assurer que ces résultats sont effectivement liés à l'inhibition de la PI3-kinase et non pas à un effet de la wortmannine sur d'autres enzymes, nous avons complété ces expériences en utilisant un inhibiteur de la PI3-kinase structuellement différent de la wortmannine : le LY-294002 (figure 63).



Figure 63 : Structure moléculaire de la wortmannine et du LY-294002.

En se basant sur les travaux d'autres auteurs, nous avons choisi deux concentrations de 10 μ M et 100 μ M de LY-294002 (Cowburn *et al.*, 2002; Yasui et Komiyama, 2001).

III-1-B-a-Effet du LY-294002 sur la sécrétion des granules primaires en réponse au WKYMVm

Les deux concentrations de LY-294002 ont tout d'abord été étudiées sur la sécrétion des granules primaires afin de s'assurer de la validité des résultats obtenus à l'aide de la wortmannine (figure 64).

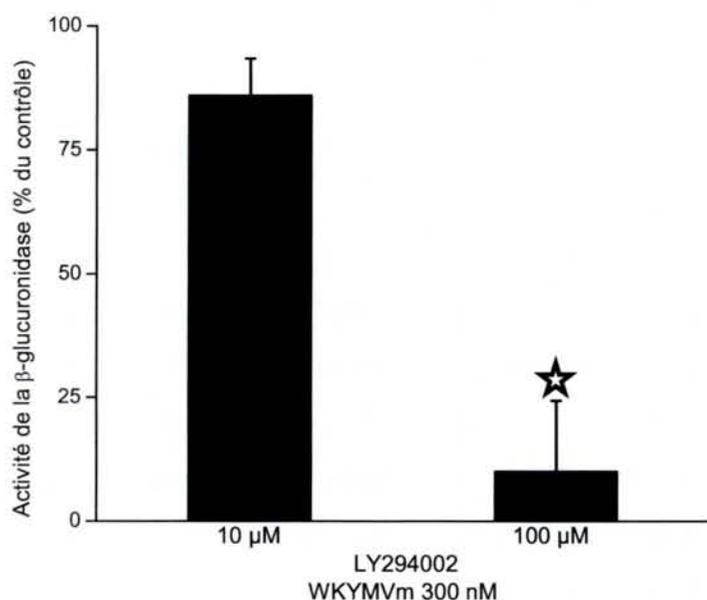


Figure 64: Comparaison de l'exocytose des granules primaires des neutrophiles incubés en présence de LY-294002. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO + WKYMVm 300 nM) selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen (n = 6).

D'après cette figure, nous pouvons remarquer que le LY-294002 n'agit significativement sur la sécrétion des granules primaires qu'à partir de 100 μ M ($p < 0,05$). A cette concentration, l'activité de la β -glucuronidase est faible ce qui signifie que l'inhibition de l'exocytose des granules azurophiles est importante. Ces expériences confirment les résultats obtenus à l'aide de la wortmannine : la PI3-kinase est fortement impliquée dans la sécrétion des granules primaires.

III-1-B-b-Effet du LY-294002 sur la sécrétion des granules secondaires en réponse au WKYMVm

Après avoir étudié l'effet du LY-294002 sur la sécrétion des granules primaires, nous avons procédé à l'étude de l'exocytose des granules secondaires en présence de ces deux concentrations de cet inhibiteur (figure 65).

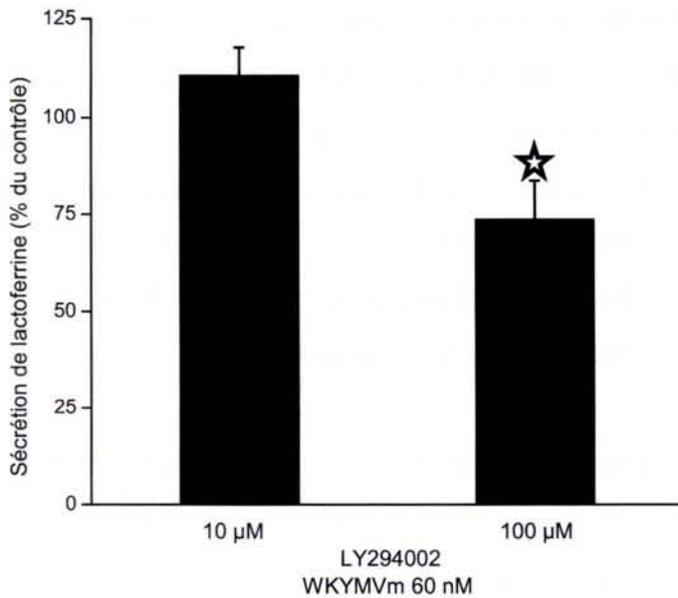


Figure 65: Comparaison de l'exocytose des granules secondaires des neutrophiles incubés en présence de LY-294002. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO + WKYMVm 60 nM) selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen (n = 4).

De nouveau, nous pouvons constater que l'effet du LY-294002 sur la sécrétion des granules secondaires n'est significatif qu'à partir de 100 µM ($p < 0,05$). A cette concentration, l'inhibition de l'exocytose de ces granules est de 26 %. Alors que pour une concentration de LY-294002 de 100 µM, l'inhibition de la sécrétion des granules primaires atteint 90 %. Ceci confirme le fait que la libération de lactoferrine, donc la sécrétion des granules secondaires, ne dépend pas majoritairement de la voie PI3-kinase.

III-1-B-c-Effet du LY-294002 sur la production d'anions superoxydes en réponse au WKYMVm

Nos recherches se sont poursuivies par l'étude de l'effet du LY-294002 sur l'activité de la NADPH-oxydase (figure 66).

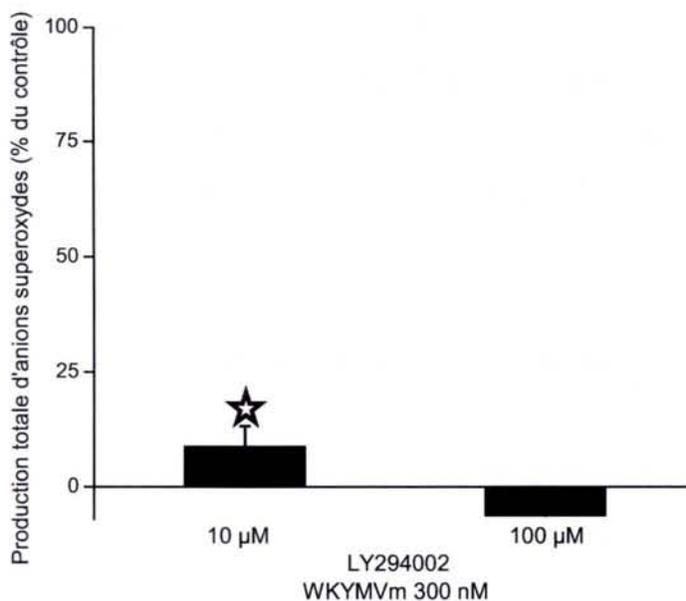


Figure 66: Comparaison de l'activité de la production totale d'anions superoxydes par des neutrophiles incubés en présence de LY-294002. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO + WKYMVm 300 nM) selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen (n \geq 4).

Les résultats obtenus se sont révélés être assez cohérents à ceux observés en présence de wortmannine. Cependant, les expériences concernant la wortmannine nous portaient à croire que la voie PI3-kinase était impliquée de la même façon dans l'activation de la NADPH-oxydase et dans la sécrétion des granules primaires. Au vu des résultats de la figure 66, nous pouvons constater que l'effet du LY-294002 sur la PI3-kinase est significatif dès 10 μM ($p < 0,05$). A cette concentration, l'activité de la NADPH-oxydase est réprimée de 91 %. Ce degré d'inhibition n'est observé pour la sécrétion des granules primaires que si l'on ajoute 10 fois plus de cet inhibiteur.

D'autre part, nous constatons que pour une concentration de 100 μM de LY-294002, la production totale d'anions superoxydes est négative. Ces résultats ont été obtenus en intégrant les valeurs du signal luminescent pendant 5 min après stimulation par 300 nM de WKYMVm. De ces valeurs ont été soustraites celles du bruit de fond c'est-à-dire les valeurs obtenues en stimulant les cellules non pas avec 300 nM de WKYMVm mais par le solvant DMSO de cet agoniste. Ces valeurs ont été ensuite normalisées par rapport au témoin DMSO + WKYMVm 300 nM. Le fait que les valeurs observées en présence de LY-294002 100 μM soient négatives, signifie que la production totale de radicaux libres est inférieure à celle du bruit de fond. A 100 μM , il est possible que l'inhibiteur LY-294002 agisse de façon non spécifique sur la réaction chimioluminescente des radicaux libres avec le luminol, peut-être en réprimant l'action de la HRP.

III-2-Etude des voies PKC, PKA et p44/42 MAPK

III-2-A-Effet d'un inhibiteur de la PKC: la staurosporine

La protéine kinase C (PKC) est activée par le diacylglycérol produit lors de la dégradation du phosphoinositol diphosphate en inositol triphosphate et en diacylglycérol par la phospholipase C. Pour étudier l'implication de la PKC sur la réponse microbicide du neutrophile de souris, nous avons utilisé un inhibiteur de cette protéine : la staurosporine.

III-2-A-a-Effet de la staurosporine sur la sécrétion des granules primaires en réponse au WKYMVm

L'effet de la staurosporine sur l'activation des neutrophiles a tout d'abord été caractérisé sur la sécrétion des granules primaires (figure 67).

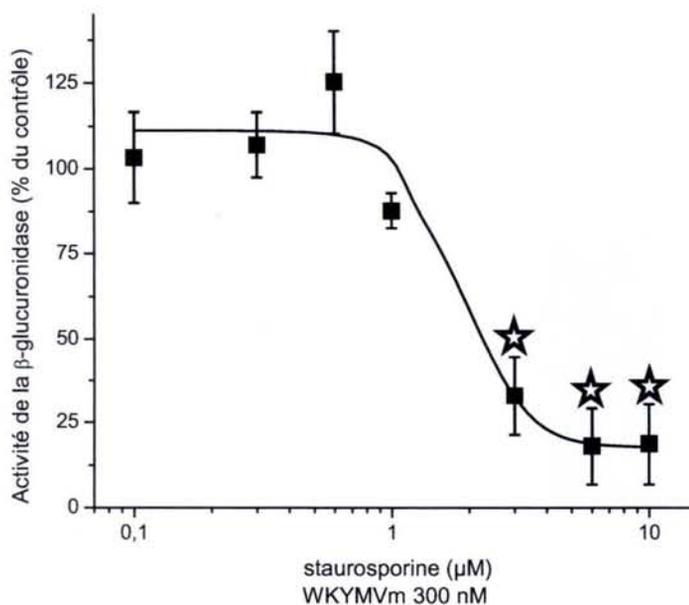


Figure 67: Courbe concentration-effet d'aspect sigmoïde de l'activité de la β-glucuronidase de neutrophiles de moelle osseuse en présence de concentrations croissantes de staurosporine. Les points représentent la moyenne de plusieurs expériences ($p < 0,05$; $n = 5$). Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO + WKYMVm 300 nM). Barres : écart - type moyen.

Ce graphique nous montre que la sécrétion des granules primaires est dépendante de la concentration de la concentration de staurosporine utilisée. De plus, l'effet de la staurosporine sur la sécrétion des granules primaires n'est significatif qu'à partir de 3 μM. À l'aide de cette figure, nous avons pu établir l' IC_{50} de la staurosporine à $1,9 \pm 0,3$ μM. À de telles concentrations, la staurosporine n'a pas un effet spécifique sur la PKC. La PKC ne serait probablement pas une voie de signalisation importante pour l'exocytose des granules primaires.

III-2-A-b-Effet de la staurosporine sur la sécrétion des granules secondaires en réponse au WKYMVm

En nous basant sur la figure 67, nous avons choisi deux concentrations de staurosporine (1 et 10 μM) afin d'étudier la voie PKC dans la sécrétion des granules secondaires (figure 68).

Même à de fortes concentrations, la staurosporine ne permet pas d'inhiber la sécrétion des granules secondaires suite à une stimulation par le WKYMVm. D'autre part, la présence de staurosporine (1 μM) dans le milieu réactionnel stimule significativement la sécrétion des granules secondaires ($p < 0,05$). Comme nous avons pu le constater pour la sécrétion des granules primaires, il semble que la voie PKC ne soit pas impliquée dans la sécrétion des granules secondaires.

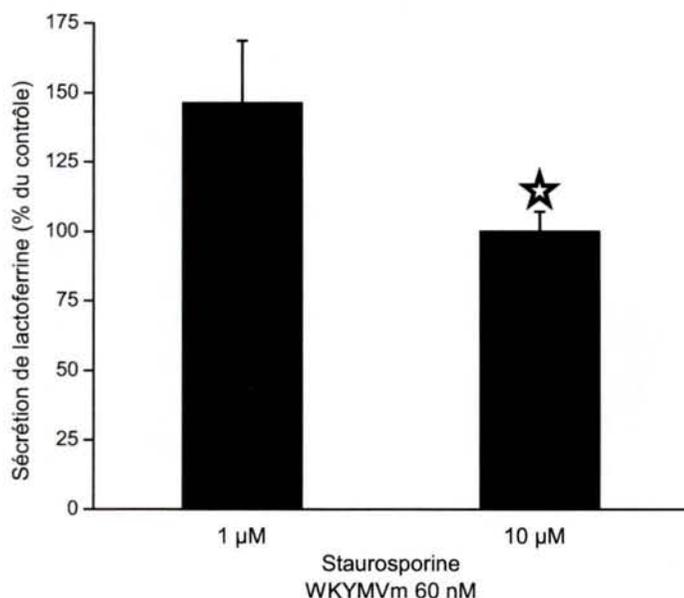


Figure 68: Comparaison de l'exocytose des granules secondaires des neutrophiles incubés en présence de staurosporine. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO + WKYMVm 60 nM) selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n \geq 4$).

III-2-A-c-Effet de la staurosporine sur la production d'anions superoxydes en réponse au WKYMVm

Nous avons ensuite poursuivi l'étude de la voie de signalisation PKC sur la production totale d'anions superoxydes. Nous avons choisi de tester des doses plus faibles de staurosporine afin de se mettre en accord avec les concentrations plus communément utilisées (Steadman *et al.*, 1996) (figure 76).

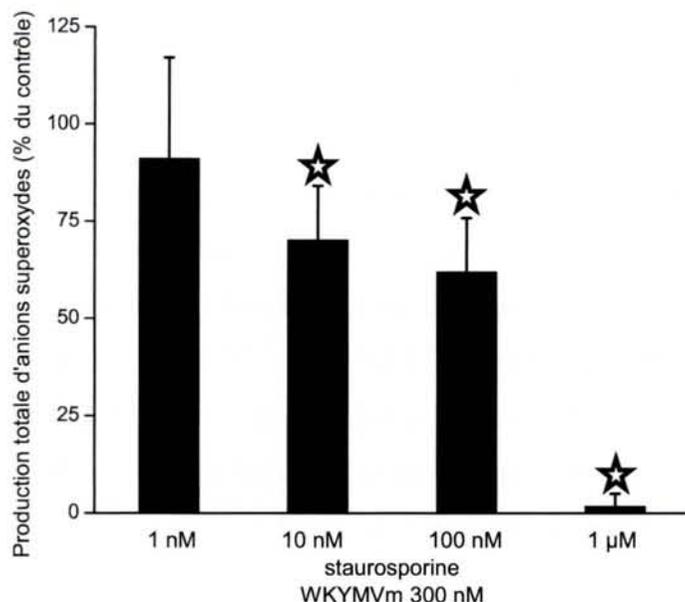


Figure 69 : Comparaison de l'activité de la production totale d'anions superoxydes par des neutrophiles incubés en présence de staurosporine. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO + WKYMVm 300 nM) selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n \geq 4$).

L'effet de cet inhibiteur sur l'activité de la NADPH-oxydase des neutrophiles de moelle osseuse en réponse à une stimulation par 300 nM de WKYMVm est significatif dès 10 nM de staurosporine ($p < 0,05$). La PKC, comme la PI3-kinase, semble donc être une voie de signalisation importante dans la réponse oxydative.

III-2-B-Effet d'un inhibiteur de la PKA: le H-89

En plus de la voie PI3-kinase et de la voie PKC, les récepteurs membranaires des peptides N-formylés activent la voie de l'adénylate cyclase. Cette enzyme, une fois activée, transforme l'ATP en AMP cyclique (AMPc). La liaison de l'AMPc sur la kinase A (PKA) induit l'activité de phosphorylation de cette enzyme et active une cascade de signalisation intracellulaire.

Pour savoir si la voie de signalisation PKA était mise en jeu lors de la réponse microbicide du neutrophile de souris, nous avons utilisé un inhibiteur de cette protéine : le H-89. En nous basant sur les travaux de Steadman, les concentrations de cet inhibiteur ont été choisies à 1 et 10 μM (Steadman *et al.*, 1996).

III-2-B-a-Effet du H-89 sur la sécrétion des granules primaires en réponse au WKYMVm

Les deux concentrations de H-89 ont tout d'abord été étudiées sur la sécrétion des granules primaires (figure 70).

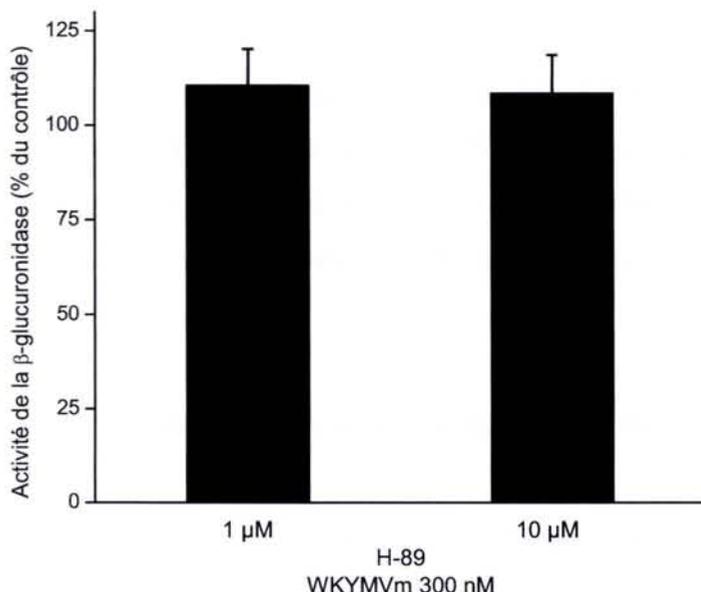


Figure 70: Comparaison de l'exocytose des granules primaires des neutrophiles incubés en présence de H-89. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO + WKYMVm 300 nM) selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen (n = 9).

D'après cette figure, la présence de H-89 dans le milieu réactionnel est sans effet sur la sécrétion des granules primaires. La protéine kinase A n'est donc pas impliquée dans la cascade de signalisation cellulaire qui aboutit à la sécrétion de ces granules.

III-2-B-b-Effet du H-89 sur la sécrétion des granules secondaires en réponse au WKYMVm

Avec les mêmes concentrations d'inhibiteurs H-89, nous avons cherché à savoir si la voie PKA était impliquée dans la sécrétion des granules secondaires (figure 71).

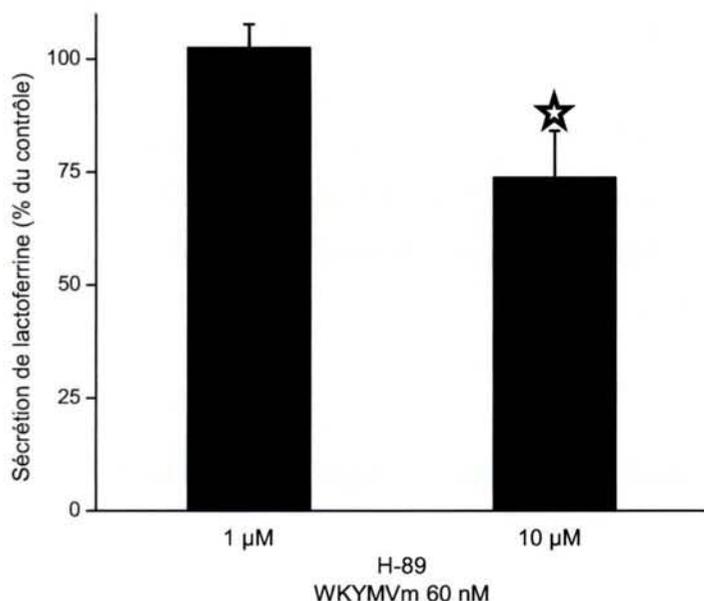


Figure 71: Comparaison de l'exocytose des granules secondaires des neutrophiles incubés en présence de H-89. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO + WKYMVm 60 nM) selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n \geq 4$).

Contrairement à ce qui est observé pour l'activité de la β -glucuronidase, l'effet inhibiteur du H-89 sur la sécrétion de lactoferrine des neutrophiles de moelle osseuse en réponse à une stimulation par 60 nM de WKYMVm est significatif pour une concentration de 10 μ M de H-89 ($p < 0,05$). L'inhibition de la voie PKA inhibe donc partiellement la sécrétion des granules secondaires (27 %). Il semblerait donc que la sécrétion des granules secondaires dépende à la fois de la PI3-kinase et de la PKA mais pas de la PKC.

III-2-B-c-Effet du H-89 sur la production d'anions superoxydes en réponse au WKYMVm

La caractérisation de la voie PKA s'est ensuite poursuivie par l'étude de l'activité NADPH-oxydase (figure 72).

L'effet de cet inhibiteur sur l'activité de la NADPH-oxydase des neutrophiles de moelle osseuse en réponse à une stimulation par 300 nM de WKYMVm est significatif dès 1 μ M de H-89 ($p < 0,05$). Cette figure nous montre que la présence de H-89 inhibe la production d'anions superoxydes de 55 et 67 % pour, respectivement, 1 et 10 μ M.

Il semble donc que l'activation de la NADPH-oxydase dépend de nombreuses voies d'activation : de la PI3-kinase, de la PKC mais aussi de la PKA. De plus, ces voies semblent

interagir les unes avec les autres, puisque l'inhibition de l'une d'entre elle suffit à inhiber la quasi-totalité de la réponse oxydative.

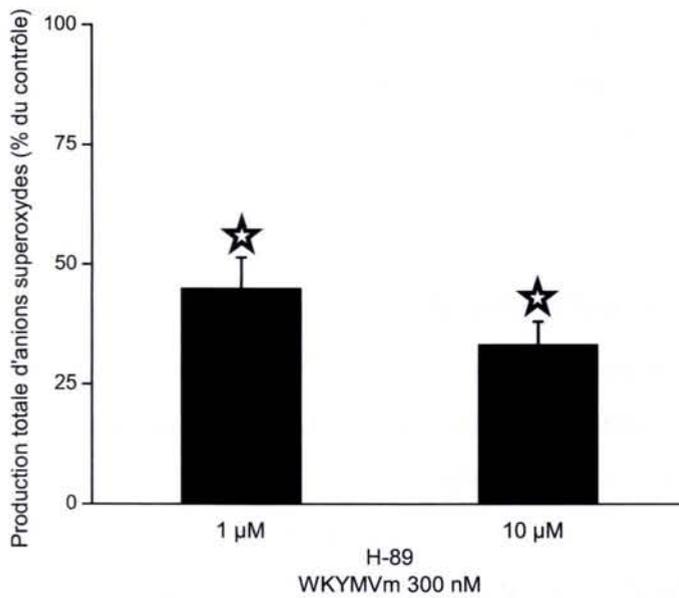


Figure 72: Comparaison de l'activité de la production totale d'anions superoxydes par des neutrophiles incubés en présence de H-89. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO+WKYMVm 300 nM) selon leur moyenne \pm l'écart-type ($n \geq 4$).

III-2-C-Effet d'un inhibiteur de la p44/42 MAPK: le PD-98059

Bien que les résultats précédents (figures 67 et 70) n'aient pas montrés d'implication des voies PKC et PKA dans la sécrétion des granules primaires, nous avons étudié une autre kinase, la p44/42 MAPK (mitogen activated protein kinase), en analysant l'effet d'un inhibiteur spécifique de cette MAPK sur la sécrétion des granules : le PD-98059 (Zu *et al.*, 1998). Pour cela une gamme de 100 nM à 100 μ M de cet inhibiteur à été testé sur l'activité de l'enzyme β -glucuronidase (figure 73).

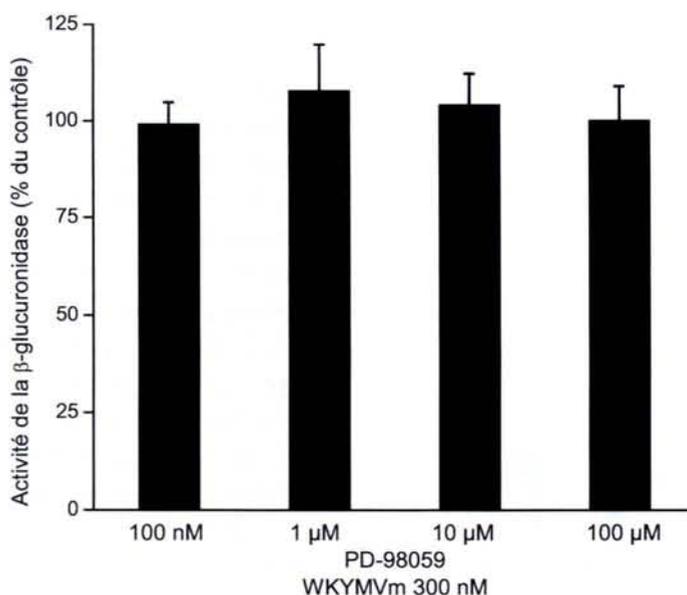


Figure 73: Comparaison de l'exocytose des granules primaires des neutrophiles incubés en présence de PD-98059. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO + WKYMVm 300 nM) selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n = 5$).

L'effet de cet inhibiteur sur l'exocytose des granules azurophiles des neutrophiles de moelle osseuse en réponse à une stimulation par 300 nM de WKYMVm n'est pas significatif quelle que soit la concentration d'inhibiteur testée. La voie de signalisation p44/42 MAPK ne semble donc pas intervenir pas dans la sécrétion des granules primaires. La sécrétion de ces granules apparaît être principalement dépendante de la voie PI3-kinase.

III-3-Etude de la voie de la phospholipase C

La PLC est une voie de signalisation en amont de la PKC. Nous nous sommes donc intéressés non seulement à cette phospholipase mais aussi au second messager qu'est le calcium dans la transmission des signaux dans la cellule.

Pour étudier la voie PLC, nous avons utilisé un inhibiteur de cette enzyme : le U-73122 et confirmé nos résultats par l'utilisation d'une molécule structurellement analogue, mais inactive, de cet inhibiteur : le U-73343.

III-3-A-Implication de la PLC dans la sécrétion des granules primaires en réponse au WKYMVm

L'effet de l'inhibiteur de la PLC sur la réponse microbicide des neutrophiles a tout d'abord été caractérisé sur la sécrétion des granules primaires.

III-3-A-a-Effet d'un inhibiteur de la PLC: le U-73122.

A travers une gamme, nous avons cherché à déterminer l'Ic₅₀ de cet inhibiteur (figure 74).

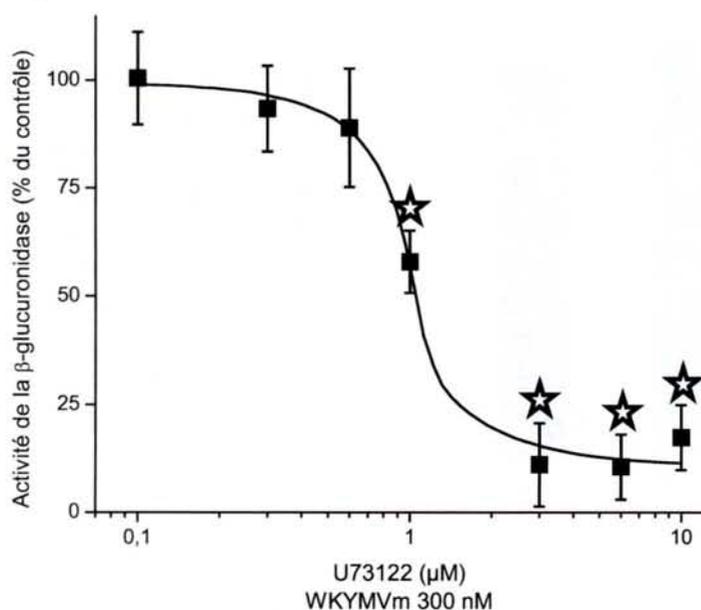


Figure 74: Courbe concentration-effet d'aspect sigmoïde de l'activité de la β-glucuronidase de neutrophiles de moelle osseuse en présence de concentrations croissantes d'U73122. Les points représentent la moyenne de plusieurs expériences ($p < 0,05$; $n = 6$). Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO + WKYMVm 300 nM). Barres : écart - type moyen.

Ce graphique nous montre que la sécrétion des granules primaires est dépendante de la concentration de la concentration d'U73122 utilisée. De plus, à partir de 1 μM , l'effet de cet inhibiteur sur la sécrétion des granules primaires est significatif. A l'aide de cette figure, nous avons pu établir l' Ic_{50} du U-73122 à $1,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$. La PLC est donc une voie de signalisation impliquée dans l'exocytose des granules azurophiles.

III-3-A-b-Effet d'une molécule structurale identique à l'inhibiteur de la PLC: le U-73343

Afin de s'assurer que les effets obtenus sont effectivement dus à l'action de l'inhibiteur de la PLC, des expériences ont été menées avec le U-73343 qui est une molécule inactive mais structurellement analogue à celle du U-73122. A l'aide de la figure précédente, nous avons choisi trois concentrations d'U-73122 qui présentent un effet significativement inhibiteur sur la sécrétion des granules primaires. Nous avons ensuite testé ces trois concentrations en utilisant la molécule analogue U-73343 (figure 75).

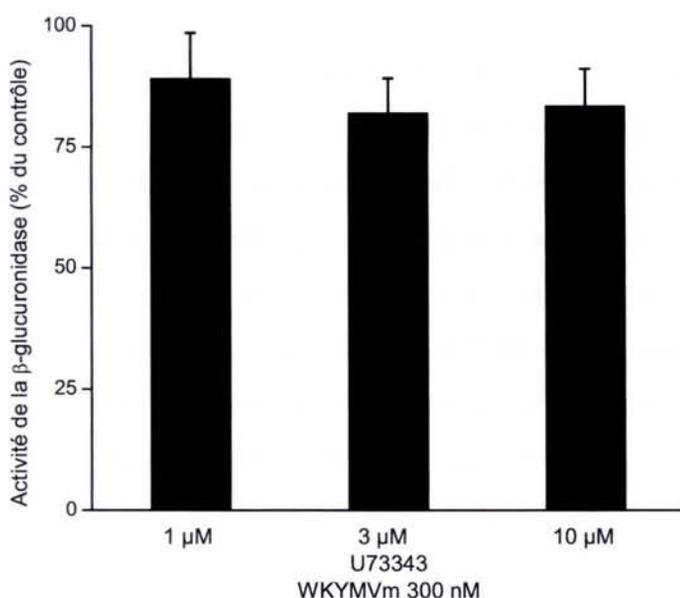


Figure 75: Comparaison de l'exocytose des granules primaires des neutrophiles incubés en présence de U-73343. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO) selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen (n = 4).

Cette figure nous montre que l'effet de l'analogue structurel U-73343 sur l'exocytose des granules azurophiles des neutrophiles de moelle osseuse en réponse à une stimulation par 300 nM de WKYMVm n'est pas significatif quelle que soit la concentration testée. Les résultats observés dans la figure 74 sont effectivement dus à l'effet inhibiteur de l'U-73122 sur la PLC. L'implication de la PLC dans l'exocytose des granules azurophiles est ainsi confirmée.

III-3-B-Implication de la PLC dans la sécrétion des granules secondaires en réponse au WKYVMm

Des expériences similaires ont été menées sur l'étude de la sécrétion de lactoferrine en utilisant la même concentration de ces deux molécules (figure 76).

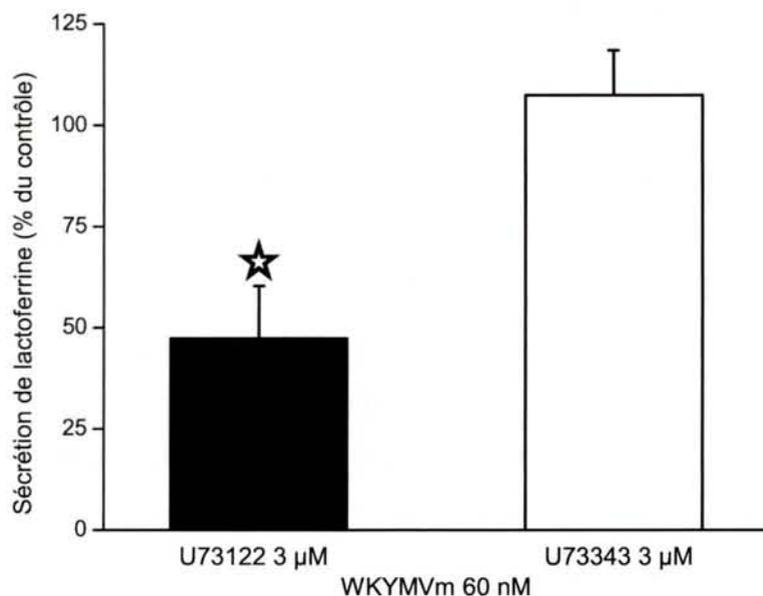


Figure 76: Comparaison de l'exocytose des granules secondaires des neutrophiles incubés en présence de 3 µM d'U-73122 (barre noire) ou de 3 µM d'U-73343 (barre blanche). Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO) selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen (n = 4).

Cette figure nous permet de mettre en évidence que l'effet inhibiteur de l'U-73122 sur la sécrétion de lactoferrine des neutrophiles de moelle osseuse en réponse à une stimulation par 60 nM de WKYVMm est significatif ($p < 0,05$). De plus, nous n'observons aucun effet de l'analogue structurel U-73343 sur l'exocytose des granules secondaires. La PLC est donc également impliquée dans la voie de signalisation aboutissant à la sécrétion des granules secondaires suite à une stimulation par 60 nM de WKYVMm. Pour une même concentration d'U-73122 (3 µM), nous pouvons constater que le degré d'inhibition de la sécrétion de ces deux types de granules n'est pas équivalent. En effet, la sécrétion des granules primaires est inhibée de 89 % alors que celle des granules secondaires ne l'est que de 53 %.

III-4-Importance du calcium dans la sécrétion des granules

Après avoir examiné l'importance de la PLC, c'est sur la piste calcique que nous avons poursuivi l'étude des voies de transduction du signal chez le neutrophile de souris. Nous avons abordé cette piste sur ces deux fronts : l'influx du calcium extracellulaire et la libération du calcium contenu dans les réservoirs calciques intracellulaires.

III-4-A-Intérêt de l'influx calcique extracellulaire

Dans un premier temps, nous avons réduit la concentration calcique présente dans le milieu extracellulaire puis, nous avons utilisé des inhibiteurs des canaux calciques de la membrane plasmique afin d'empêcher la pénétration du calcium dans le cytosol.

III-4-A-a-Effet d'un chélateur du calcium extracellulaire : l'EGTA dans la sécrétion des granules primaires en réponse au WKYMVm

Nous avons choisi de diminuer la concentration en calcium du milieu extracellulaire (figure 77). Ces expériences ont été menées sur la sécrétion des granules primaires en utilisant des milieux d'incubation dépourvus de calcium et/ou contenant un chélateur de cet ion : l'EGTA.

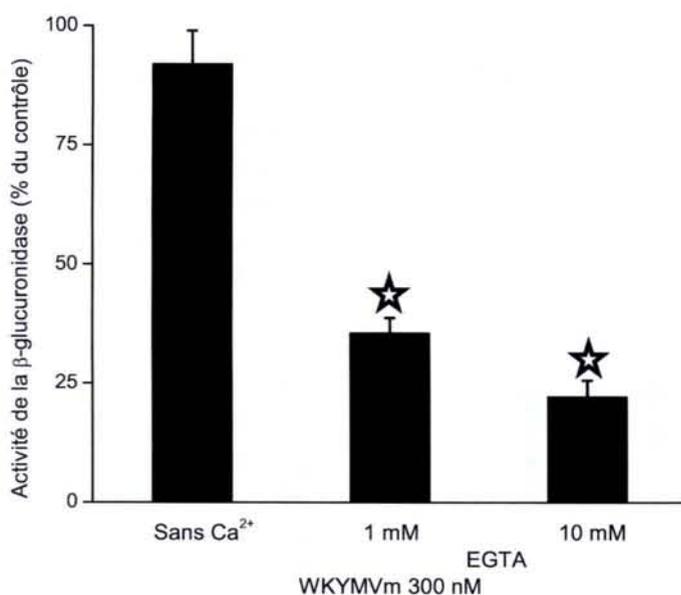


Figure 77: Comparaison de l'exocytose des granules primaires des neutrophiles incubés dans des tampons HEPES dépourvu de calcium et contenant de l'EGTA. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (concentration calcique extracellulaire : 2 mM Ca^{2+}) selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen (n = 5 ; p < 0,05).

Comme le montre cette figure, des milieux dépourvus de calcium extracellulaire ne suffisent pas à inhiber la sécrétion des granules azurophiles. Pourtant, la présence de calcium dans le milieu extracellulaire est importante pour l'exocytose optimale des granules azurophiles des neutrophiles de moelle osseuse en réponse à une stimulation par 300 nM de WKYMVm. Il faut cependant noter que ce milieu, bien que ne contenant aucune solution de calcium, peut néanmoins contenir des traces "parasites" de cet ion provenant très probablement de la présence du manteau de BSA à la surface des tubes (adsorbés à la BSA). Ces traces, associées à la libération du calcium des réserves intracellulaires, peuvent donc être suffisantes pour permettre la libération des granules.

De plus, en présence d'EGTA (1 ou 10 mM), bien que significativement inhibée l'exocytose des granules persiste. Cette exocytose résiduelle devant être dû à la diffusion des

réserves calciques du réticulum endoplasmique dans le cytosol ou à une sécrétion Ca^{2+} -indépendante.

III-4-A-b-Effet d'un inhibiteur des canaux calciques extracellulaire : le SKF-96365

Nos études ont ensuite porté sur les canaux calciques de la membrane plasmique. Des expériences d'exocytose ont été réalisées en présence d'un inhibiteur de ces canaux calciques : le SKF-96365.

III-4-A-b- α -Effet du SKF-96365 sur la sécrétion des granules primaires en réponse au WKYMVm

L'effet du SKF-96365 sur l'activation des neutrophiles a tout d'abord été caractérisé sur la sécrétion des granules primaires. Le but était de déterminer l' Ic_{50} (figure 78).

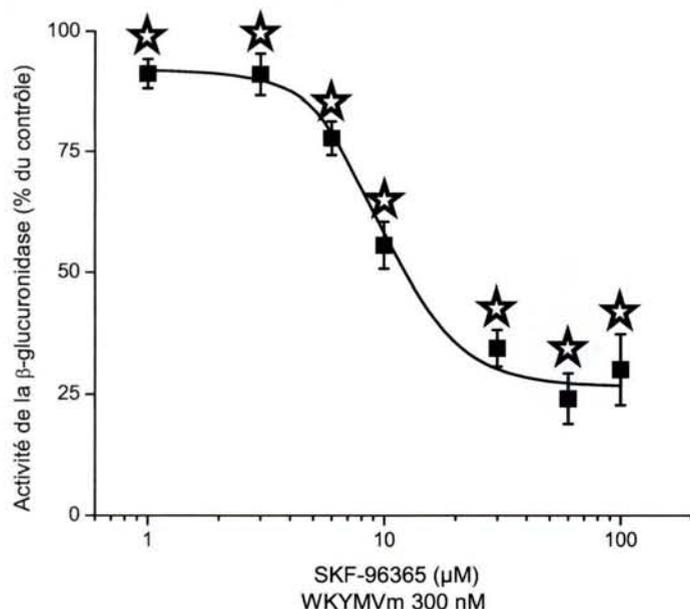


Figure 78 : Courbe concentration-effet d'aspect sigmoïde de l'activité de la β -glucuronidase de neutrophiles de moelle osseuse en présence de concentrations croissantes de SKF-96365. Les points représentent la moyenne de plusieurs expériences ($p < 0,05$; $n = 5$). Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO + WKYMVm 300 nM). Barres : écart - type moyen.

A l'aide de cette figure, nous avons pu établir l' Ic_{50} du SKF-96365 à $9,8 \pm 1,0 \mu\text{M}$. Chacune des concentrations testée s'est révélée être significativement différente du contrôle. L'influx calcique extracellulaire transitant par des canaux sensibles au SKF-96365, est donc important pour l'exocytose des granules primaires.

III-4-A-b-β-Effet du SKF-96365 sur la sécrétion des granules secondaires en réponse au WKYMVm

Au vu de ce résultat, nous avons choisi une concentration de SKF-96365 significativement active puis nous avons testé son potentiel d'inhibition sur la sécrétion des granules secondaires (figure 79).

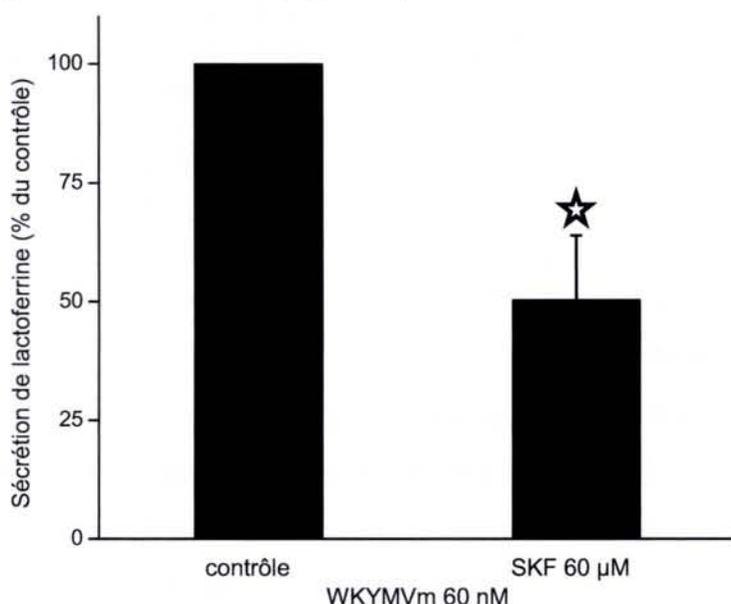


Figure 79: Comparaison de l'exocytose des granules secondaires des neutrophiles incubés en présence de 60 μM de SKF-96365. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO + WKYMVm 60 nM) selon leur moyenne ± l'écart-type moyen (n = 4).

L'effet inhibiteur du SKF-96365 sur la sécrétion de lactoferrine des neutrophiles de moelle osseuse en réponse à une stimulation par 60 nM de WKYMVm est significatif ($p < 0,05$). Pour une même concentration de SKF-96365 (60 μM), nous pouvons remarquer que nous inhibons l'exocytose que de 50 % des granules secondaires mais déjà 75% des granules primaires. Soit les réserves calciques intracellulaires servent en priorité à sécréter les granules secondaires, soit l'exocytose des granules primaires requière une plus forte augmentation de la concentration calcique que les granules secondaires.

III-4-A-c-Effet d'un autre inhibiteur des canaux calciques extracellulaire : le chlorure de lanthane (LaCl_3) sur la sécrétion des granules primaires en reponse au WKYMVm

Pour confirmer ces résultats, nous avons testé un autre inhibiteur de ces canaux calciques : le chlorure de lanthane (LaCl_3). Comme pour le SKF-96365, nous avons réalisé des mesures de la sécrétion des granules primaires en présence de différentes concentrations de cet inhibiteur dans le but d'en déterminer l' Ic_{50} (figure 80).

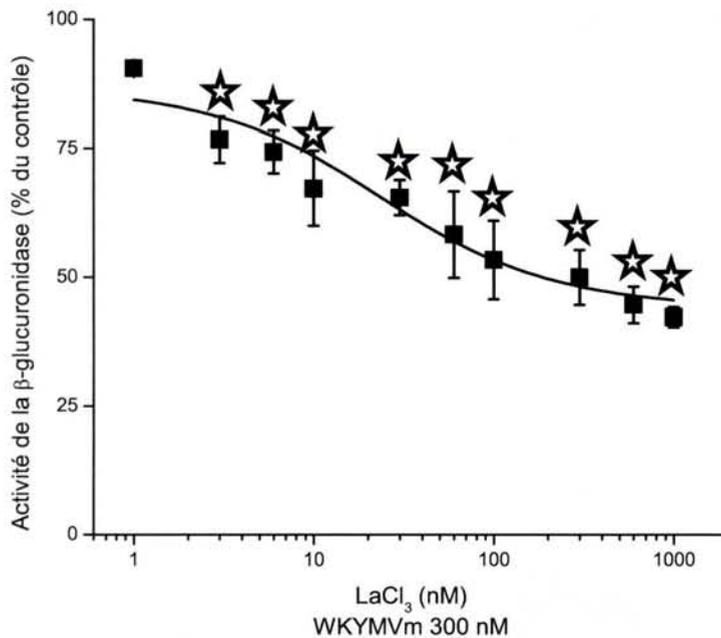


Figure 80 : Courbe concentration-effet d'aspect sigmoïde de l'activité de la β -glucuronidase de neutrophiles de moelle osseuse en présence de 1 nM à 1 μ M de LaCl_3 . Les points représentent la moyenne de plusieurs expériences ($p < 0,05$; $n = 4$). Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (eau + WKYMVm 300 nM). Barres : écart - type moyen.

Au travers de cette figure, nous pouvons déterminer un Ic_{50} du LaCl_3 sur la sécrétion des granules primaires de $24,4 \pm 1,5$ nM. Toutefois, nous pouvons constater que la moitié des granules primaires sont encore sécrétés malgré la présence d'1 μ M de LaCl_3 dans le milieu réactionnel. Pour comprendre ce phénomène, nous avons réalisé les mêmes expériences en augmentant les concentrations de notre gamme (figure 81).

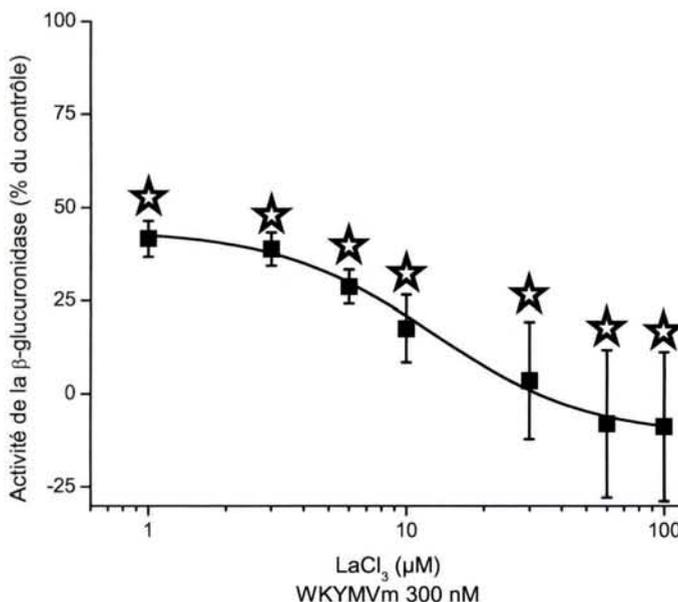


Figure 81: Courbe concentration-effet d'aspect sigmoïde de l'activité de la β -glucuronidase de neutrophiles de moelle osseuse en présence de 1 à 100 μ M de LaCl_3 . Les points représentent la moyenne de plusieurs expériences ($p < 0,05$; $n = 3$). Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (eau + WKYMVm 300 nM). Barres : écart - type moyen.

De nouveau, on obtient une courbe d'aspect sigmoïde et un second Ic_{50} a pu être déterminé à $12,3 \pm 0,8$ μ M. Le fait que les mesures des plus fortes concentrations de LaCl_3 soient négatives, donc inférieures aux témoins d'expériences où l'inhibiteur est remplacé par la même concentration de solvant, nous a amené à penser que cet ion affecte non seulement les canaux calciques mais aussi l'enzyme β -glucuronidase. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons incubé des neutrophiles de moelle osseuse en présence de trois concentrations de LaCl_3 pendant 10 min. Ces cellules ont ensuite été lysées à l'aide de Triton X-100 (0,2 %) puis

des mesures de dosages de l'activité β -glucuronidase ont ensuite été effectuées avec le surnageant de ces préparations (figure 82).

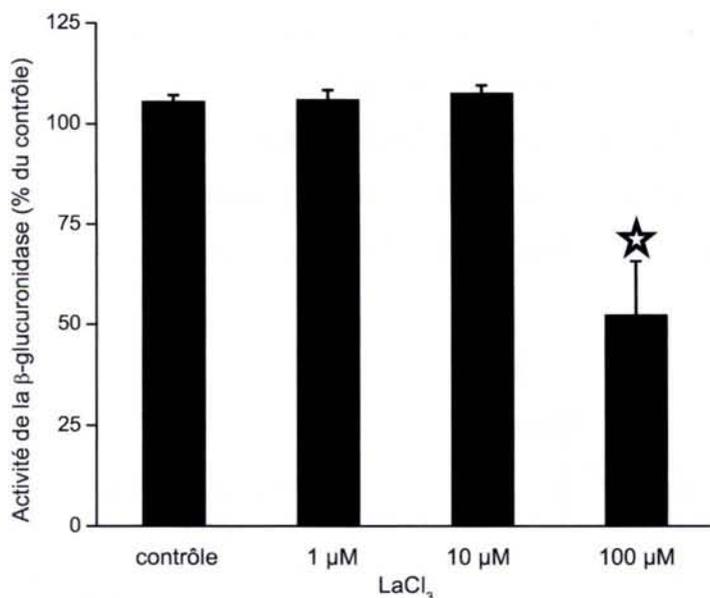


Figure 82 : Comparaison de l'activité de la β -glucuronidase de neutrophiles incubés en présence de LaCl_3 puis lysés à l'aide de Triton X-100 (0,2 %). Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (eau) selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen (n = 7).

Ces résultats ont confirmé notre hypothèse : l'effet de cet inhibiteur sur l'enzyme elle-même est significatif pour une concentration de 100 μM de LaCl_3 ($p < 0,05$). Par contre en dessous de 10 μM , il existe une forte inhibition de la sécrétion des granules primaires sans que cet ion interfère avec l'activité propre de la β -glucuronidase.

III-4-B-Nécessité de l'influx calcique intracellulaire : étude d'un inhibiteur des pompes calciques intracellulaires : la thapsigargine

Après avoir étudié les canaux calciques de la membrane plasmique, nous avons cherché à comprendre l'effet de la libération des réserves calciques du réticulum endoplasmique sur la sécrétion des granules primaires.

A l'aide de thapsigargine, nous avons perturbé l'homéostasie calcique du neutrophile. La thapsigargine est un inhibiteur des pompes SERCA (sarco-endoplasmic réticulum calcium ATPase). Sa présence empêche les réserves calciques de se remplir. Les ions calcium fuient des réserves calciques vers le cytosol, augmentant ainsi la concentration de Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule. D'autre part, lorsque les réserves calciques intracellulaires sont épuisées, un signal déclenche l'influx de calcium du milieu extracellulaire subséquent via les canaux calciques capacitifs (canaux SOC).

III-4-B-a-Détermination de l'Ec₅₀ de la thapsigargine

Puisqu'en présence de thapsigargine, les réserves calciques se vident par diffusion passive, nous avons voulu savoir si les quantités de calcium libéré dans le cytosol étaient suffisantes pour provoquer la libération des granules primaires. Dans un premier temps, nous avons donc cherché à déterminer l'Ec₅₀ de cette molécule (figure 83).

Ces expériences ont été effectuées en présence de thapsigargine dans des conditions standard (tampon HEPES contenant 2 mM de calcium et 9 mM de glucose mais sans EGTA).

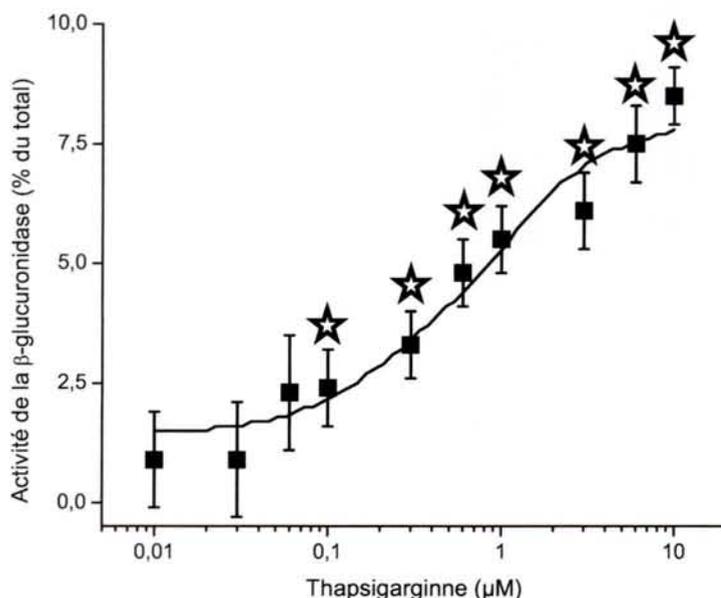


Figure 83: Courbe concentration-effet de la sécrétion des granules primaires induite par la thapsigargine en présence de cytochalasine B (5 µg/ml). Barres : écarts-types moyen (n = 5).

Comme le montre cette figure, l'Ec₅₀ de cette molécule est de $1,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$). Contrairement au fMLF et au WKYMVm, la thapsigargine permet la libération de très peu de granules primaires (maximum 7,5 % du total des granules). Ceci est probablement dû au fait que les réserves calciques se vident passivement et non pas brutalement comme se serait le cas suite à une stimulation par l'un ou l'autre de ces peptides. Il est également possible que l'exocytose des granules dépendent non seulement de l'augmentation de la concentration calcique mais également d'un second signal transitant via les autres voies de signalisations intracellulaires tel que la PI3-K.

III-4-B-a-Effet de la thapsigargine sur la sécrétion des granules primaires en réponse au WKYMVm

Nous avons ensuite voulu savoir si la déplétion des réserves calciques intracellulaire due à la présence de thapsigargine influençait la réponse induite par une stimulation WKYMVm (figure 84).

Ces expériences ont été effectuées en présence de thapsigargine dans des conditions standard (tampon HEPES contenant 2 mM de calcium et 9 mM de glucose mais sans EGTA).

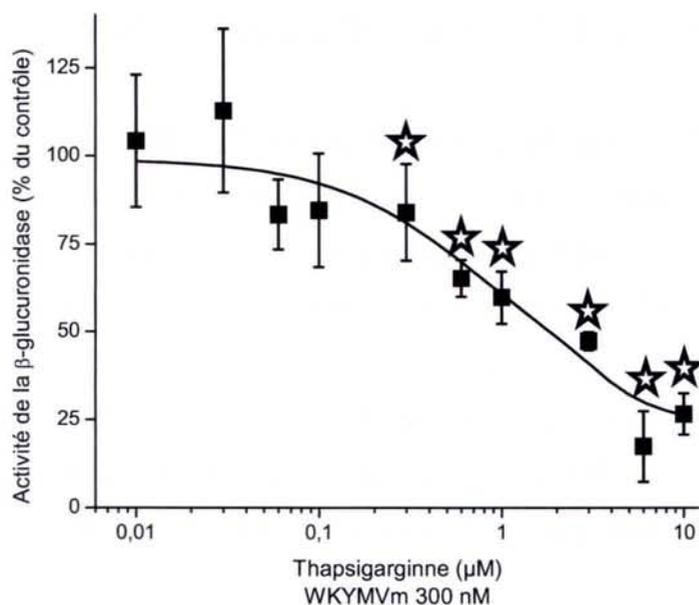


Figure 84: Courbe concentration-effet d'aspect sigmoïde de l'activité de la β -glucuronidase de neutrophiles de moelle osseuse en présence de concentrations croissantes de thapsigargine. Les points représentent la moyenne de plusieurs expériences ($p < 0,05$; $n = 4$). Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO + WKYVMm 300 nM). Barres : écart - type moyen.

La préincubation des cellules avec la thapsigargine révèle un effet inhibiteur de cette dernière. L' Ic_{50} de cet inhibiteur est de $1,2 \pm 0,4 \mu M$. Cet inhibiteur des pompes SERCA des réserves intracellulaires est cependant connu pour être un activateur de la réponse microbicide des neutrophiles. En effet, la déplétion des réserves calciques intracellulaires, induit l'ouverture des canaux calciques de la membrane, augmentant ainsi la concentration calcique cytosolique et préactivant de ce fait le neutrophile (Wenzel-Seifert *et al.*, 1996). Pour observer un effet inhibiteur de la thapsigarginne, nous avons utilisé de fortes concentrations de cette molécule. C'est-à-dire des concentrations 100 fois plus importantes que celles couramment utilisées. A de telles concentrations, il est donc possible que la thapsigarginne interfère sur la réponse microbicide du neutrophile.

En observant les résultats obtenus avec le SKF-96364 et la thapsigargine, il semble que l'exocytose des granules primaires ait lieu même avec un faible pic calcique intracellulaire. En effet, les figures (78 et 84) obtenues avec ces deux inhibiteurs nous montrent que, malgré le blocage de l'influx calcique extracellulaire ou la déplétion des réserves calciques intracellulaires, 6,25 % des granules primaires sont néanmoins excrétés suite à une stimulation par 300 nM de WKYVMm.

IV-Identification des récepteurs impliqués dans une stimulation par le peptide WKYVMm

De nombreux auteurs ont précédemment démontré que la stimulation des neutrophiles et

des monocytes humains par le WKYMVm induit la production d'anions superoxydes, l'activité bactéricide et la migration chimiotactique de la cellule via l'activation des voies de signalisation liées au récepteur de ce peptide (Bae *et al.*, 1999a; Bae *et al.*, 1999b; Bae *et al.*, 2000).

Le fait que le peptide WKYMVm présente une affinité pour FPRL1 et FPRL2 mais pas pour FPR dans les cellules humaines suggère que le peptide WKYMVm active préférentiellement les neutrophiles de souris par l'intermédiaire des récepteurs orthologues murins de FPRL 1, c'est-à-dire Fpr-rs2 et/ou Fpr-rs1 (Christophe *et al.*, 2001; Bylund *et al.*, 2003).

Ces conclusions ont été obtenues à partir d'expériences portant sur la production d'anions superoxydes. Nous avons donc cherché à savoir quel récepteur (mFPR1 ou Fpr-rs1/rs2) était impliqué dans la transduction du signal aboutissant à la sécrétion des granules.

IV-1-Le N-t-Boc-MLF : un antagoniste du récepteur au fMLF

Le N-t-Boc-MLF est un inhibiteur du récepteur humain FPR et de son homologue murin mFPR1.

IV-1-A-Etude des effets du N-t-Boc-MLF sur une stimulation fMLF

Afin de s'assurer que ce peptide était spécifique du récepteur mFPR1, des études ont tout d'abord été menées sur la sécrétion des granules en réponse à une stimulation par le peptide bactérien fMLF.

IV-1-A-a-Effet du N-t-Boc-MLF sur la sécrétion des granules primaires en réponse au fMLF

Comme pour la majorité des inhibiteurs que nous avons utilisés, nous avons réalisé des mesures de la sécrétion des granules primaires en présence de différentes concentrations de N-t-Boc-MLF dans le but d'en déterminer l' Ic_{50} (figure 85).

A l'aide de cette figure, nous avons pu établir l' Ic_{50} du N-t-Boc-MLF à $14,0 \pm 2,6 \mu M$. De plus, à partir de $60 \mu M$, l'effet de cet inhibiteur sur la sécrétion des granules primaires est significatif. Le récepteur mFPR1 semble être le récepteur impliqué majoritairement dans la transduction du signal induit par le peptide bactérien fMLF. Toutefois, afin de s'assurer que cet inhibiteur est effectivement spécifique de ce récepteur, des expériences complémentaires sur des cellules portant uniquement le récepteur FPRL1, seraient nécessaires.

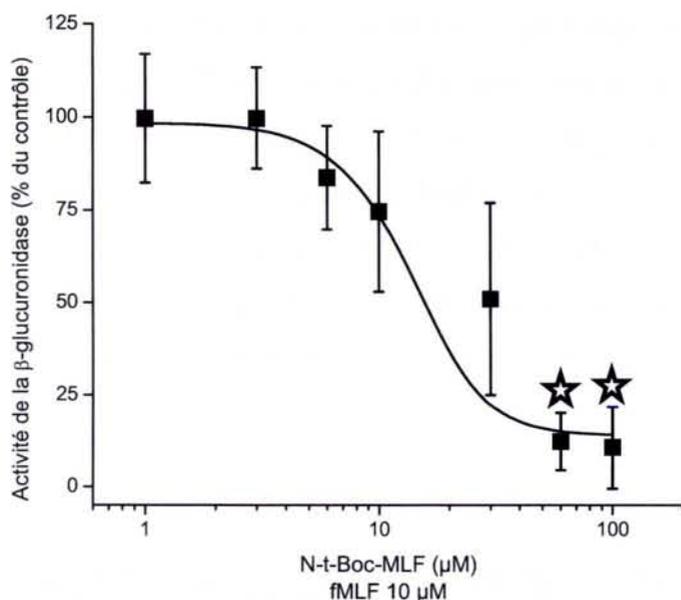


Figure 85: Courbe concentration-effet d'aspect sigmoïde de l'activité de la β -glucuronidase de neutrophiles de moelle osseuse en présence de concentrations croissantes de N-t-Boc-MLF. Les points représentent la moyenne de plusieurs expériences ($p < 0,05$; $n = 3$). Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO + fMLF 10 μ M). Barres : écart - type moyen.

IV-1-A-b-Effet du N-t-Boc-MLF sur la sécrétion des granules secondaires en réponse au fMLF

En nous basant sur la figure 85, nous avons choisi de tester les deux plus fortes concentrations de N-t-Boc-MLF afin de confirmer que le récepteur mFPR1 est également impliqué dans la sécrétion des granules secondaires suite à une stimulation par le fMLF (figure 86).

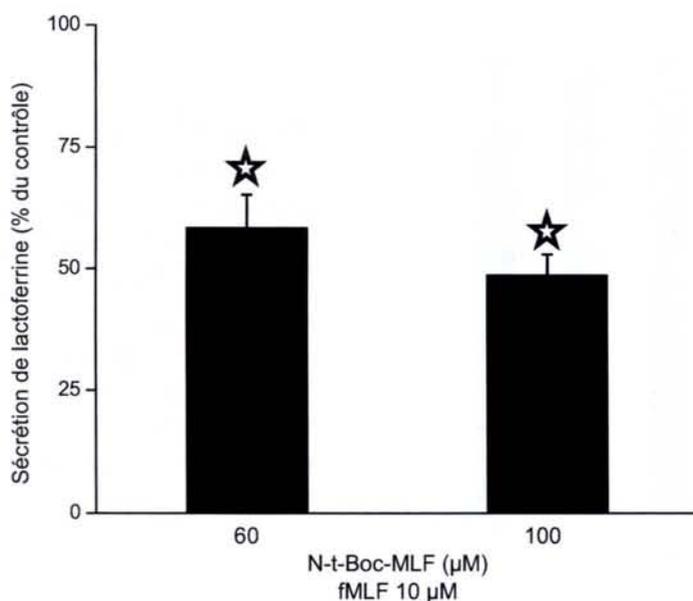


Figure 86: Comparaison de l'exocytose des granules secondaires des neutrophiles de moelle osseuse incubés en présence de N-t-Boc-MLF. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO + fMLF 10 μ M) selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n = 4$; $p < 0,05$)

Cette illustration confirme les résultats obtenus à la figure 99 : suite à une stimulation par le fMLF, l'effet du N-t-Boc-MLF sur le récepteur mFPR1 est significatif dès 60 μ M ($p < 0,05$). De plus, ces résultats nous montrent que le peptide bactérien fMLF induit effectivement la sécrétion des granules (primaires et secondaires) via ce récepteur.

Toutefois, comme nous l'avons constaté de nombreuses fois auparavant, la sécrétion des granules secondaires semble moins inhibée que celle des primaires. En effet, le Boc-MLF n'inhibe la sécrétion que de la moitié des granules secondaires mais plus de 75 % de celle des primaires. Soit l'activation du récepteur, même faible, semble déclencher en priorité la sécrétion de ces granules secondaires, soit le fMLF stimule un autre récepteur comme se fut démontré chez l'Homme : FPRL1 est un récepteur de faible affinité pour le fMLF car son activation, in-vitro, nécessite de forte concentration de ce peptide (de l'ordre du μM) (Prossnitz et Ye, 1997).

IV-1-B-Etude des effets du N-t-Boc-MLF sur une stimulation WKYMVm

Nous savons désormais que le N-t-Boc-MLF est un inhibiteur du récepteur mFPR1 et que le signal induit par le peptide bactérien fMLF transite par ce récepteur. Qu'en est-il pour le peptide WKYMVm ?

IV-1-B-a-Effet du N-t-Boc-MLF sur la sécrétion des granules primaires en réponse au WKYMVm

L'activation du récepteur mFPR1 par le peptide WKYMVm a tout d'abord été étudiée sur la sécrétion des granules primaires (figure 87).

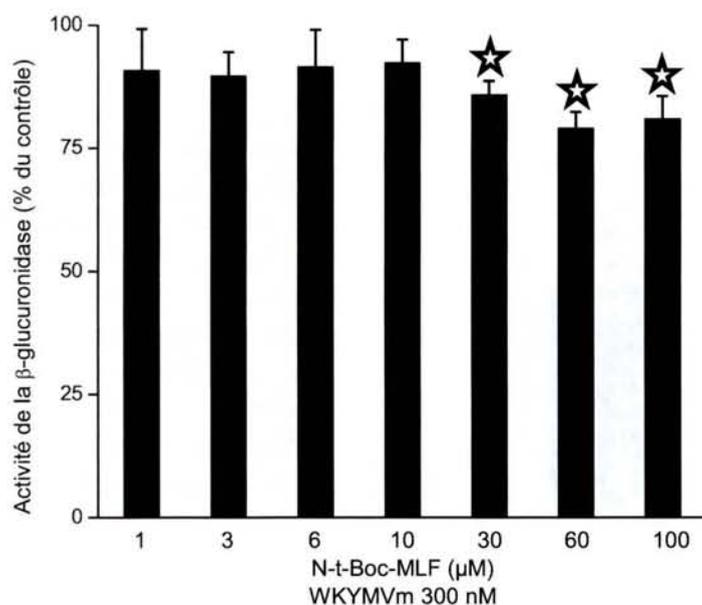


Figure 87: Comparaison de l'exocytose des granules primaires des neutrophiles incubés en présence de N-t-Boc-MLF. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO + WKYMVm 300 nM) selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n = 4$; $p < 0,05$).

D'après cette figure, nous pouvons remarquer que l'effet inhibiteur du N-t-Boc-MLF est significatif dès 30 μM ($p < 0,05$). Cependant, malgré sa présence, l'inhibition est au maximum de 20 % soit moins de 5 % des granules primaires qui aurait dû être exocytés suite a une stimulation par 300 nM de WKYMVm. En accord avec les travaux de Bylund, nous

pouvons donc conclure qu'un récepteur distinct de FPR est responsable de la majorité de la réponse au WKYMVm (Bylund *et al.*, 2003). Le WKYMVm se lie au récepteur mFPR 1 avec une affinité plus faible.

IV-1-B-b-Effet du N-t-Boc-MLF sur la sécrétion des granules secondaires en réponse au WKYMVm

Nous avons confirmé cette hypothèse en étudiant l'effet des deux plus fortes concentrations de N-t-Boc-MLF sur la sécrétion des granules secondaires en réponse au peptide WKYMVm (figure 88).

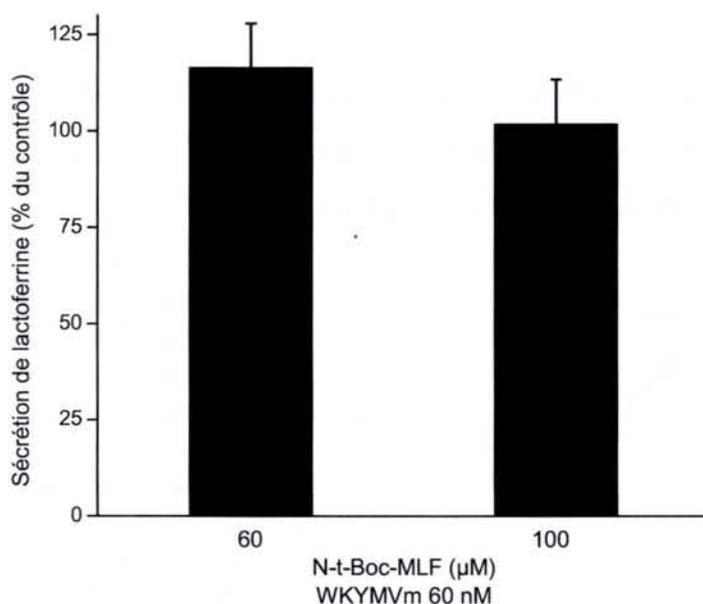


Figure 88: Comparaison de l'exocytose des granules secondaires des neutrophiles incubés en présence de N-t-Boc-MLF. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (DMSO + WKYMVm 60 nM) selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n \geq 3$).

L'effet inhibiteur du N-t-Boc-MLF sur l'activation du récepteur mFPR1 en réponse à une stimulation par 60 nM de WKYMVm n'est pas significatif quelle que soit la concentration utilisée ($p < 0,05$). Malgré la présence de fortes concentrations d'inhibiteurs, la sécrétion des granules secondaires en réponse au peptide WKYMVm n'est absolument pas altérée. L'affinité du WKYMVm pour le récepteur mFPR1 est faible, la majorité du signal induite par le WKYMVm transite via un autre récepteur.

IV-2-Les peptides antagonistes au récepteur FPRL1

Nous avons choisi d'étudier l'effet inhibiteur des peptides C2 et E11 découverts par l'équipe du Dr. Leroy chez le neutrophile de souris (Poirey *et al.*, 2003). Le but était d'une part de savoir si le signal induit par le WKYMVm transite via les récepteurs Fpr-rs1/-rs2

(homologue murin du récepteur FPRL1), d'autre part d'étudier l'effet de ces peptides sur le récepteur mFPR1.

IV-2-A-Etude des effets du peptide C2 (WPLTHTLRHTIW)

Nos études ont tout d'abord débuté par l'étude du peptide C2. Ce peptide a été étudié sur la sécrétion des granules primaires et secondaires en réponse au peptide WKYMVm et au peptide bactérien fMLF.

IV-2-A-a-Etude des effets du peptide C2 sur une stimulation WKYMVm

IV-2-A-a-a-Effet du peptide C2 sur la sécrétion des granules primaires en réponse au WKYMVm

Comme pour le N-t-Boc-MLF, nous avons réalisé des mesures de la sécrétion des granules primaires en présence de différentes concentrations de peptide C2 (WPLTHTLRHTIW) dans le but d'en déterminer l'Ic₅₀ (figure 89).

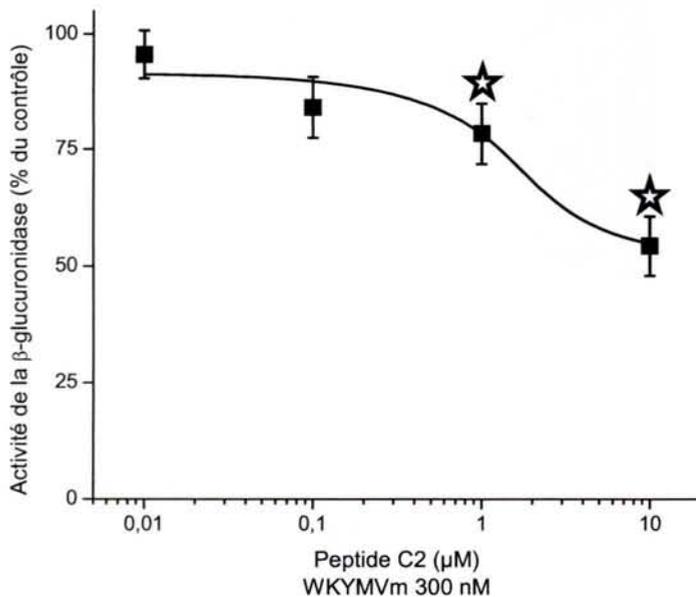


Figure 89: Courbe concentration-effet d'aspect sigmoïde de l'activité de la β-glucuronidase de neutrophiles de moelle osseuse en présence de concentrations croissantes de peptide C2. Les points représentent la moyenne de plusieurs expériences ($p < 0,05$; $n = 6$). Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (eau + WKYMVm 300 nM). Barres : écart - type moyen.

A l'aide de cette figure, nous avons pu établir l'Ic₅₀ du peptide C2 à $1,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$. L'effet de cet inhibiteur sur la sécrétion des granules primaires est significatif dès $1 \mu\text{M}$. Cependant malgré de fortes concentrations de ce peptide, nous n'avons pu mettre en évidence qu'une inhibition partielle de la sécrétion des granules primaires (46 %). Le peptide C2 et le WKYMVm rentre donc en compétition pour le même récepteur. Le peptide C2 étant un inhibiteur du récepteur FPRL1 donc des récepteurs Fpr-rs1/-rs2, il semble que ces récepteurs Fpr-rs1/-rs2 soient impliqués dans la transduction du signal induit par le peptide WKYMVm.

IV-2-A-a-β-Effet du peptide C2 sur la sécrétion des granules secondaires en réponse au WKYMVm

En nous basant sur la figure 89, nous avons testé les deux plus fortes concentrations de peptide C2 sur la sécrétion des granules secondaires. Le but de ces expériences était de confirmer que les récepteurs Fpr-rs1/-rs2 sont également impliqués dans la sécrétion de lactoferrine en réponse à une stimulation par le WKYMVm (figure 90).

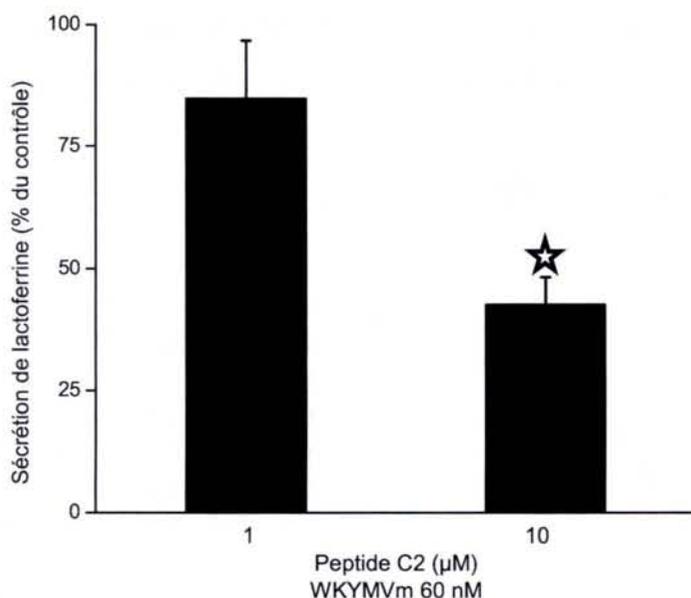


Figure 90: Comparaison de l'exocytose des granules secondaires des neutrophiles incubés en présence de peptide C2. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (eau + WKYMVm 60 nM) selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen (n = 5 ; p < 0,05).

L'effet inhibiteur de ce peptide sur la sécrétion de lactoferrine des neutrophiles de moelle osseuse en réponse à une stimulation par 60 nM de WKYMVm n'est significatif qu'à partir de 10 μ M mais plus importante que celle des granules primaires (inhibition de 58 % de la sécrétion des granules secondaires et 46 % des granules primaires). Les figures 89 et 90 nous montrent, suite à une stimulation par le WKYMVm, un effet inhibiteur du peptide C2 sur les récepteurs Fpr-rs1/-rs2. Le WKYMVm induit donc effectivement la sécrétion des granules (primaires et secondaires) via ces récepteurs.

IV-2-A-b-Etude des effets du peptide C2 sur une stimulation fMLF

Nous avons donc voulu vérifier cette hypothèse : le récepteur mFPR1 serait-il effectivement insensible au peptide C2 ? Pour cela, nous avons étudié la sécrétion des granules, en présence de peptide C2, en réponse à une stimulation par le fMLF.

IV-2-A-b- α -Effet du peptide C2 sur la sécrétion des granules primaires en réponse au fMLF

Contre toute attente, il s'est avéré que la présence de peptide C2 ne mettait pas en évidence l'effet inhibiteur escompté de ce peptide sur le récepteur mFPR1. Par contre, le peptide C2 s'est révélé capable d'activer la sécrétion des granules primaires en réponse au fMLF. Il semble que ce peptide C2 agisse comme un primer : la préincubation (10 min) des cellules en présence de peptide C2 stimule la sécrétion des granules primaires en réponse au peptide fMLF. L' EC_{50} des neutrophiles en réponse à différentes concentrations de ce peptide est de $1,5 \pm 0,4 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$).

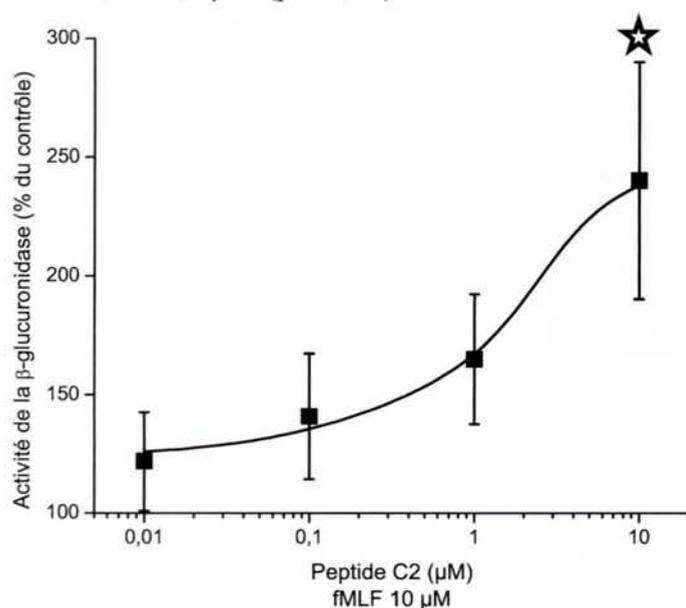


Figure 91: Courbe concentration-effet de la sécrétion des granules primaires induite par le peptide C2 + 10 μM de fMLF. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (eau + fMLF 10 μM) selon leur moyenne. Barres : écarts-types moyen ($n = 6$; $p < 0,05$).

Nous nous sommes cependant assurés que le peptide C2 n'était pas capable d'induire seul la sécrétion des granules primaires (figure 92).

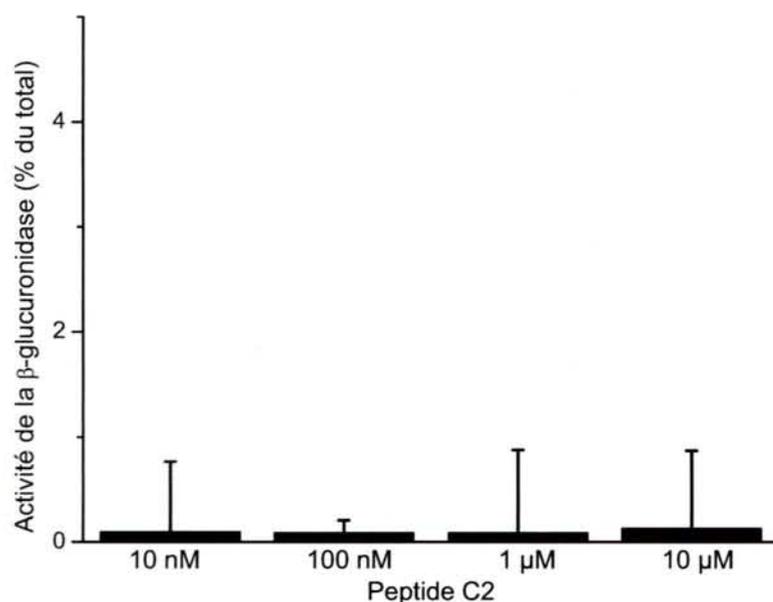


Figure 92: Etude de l'exocytose des granules secondaires des neutrophiles de moelle osseuse en réponse à des différentes concentrations de peptide C2. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (eau) selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n \geq 4$; $p < 0,05$).

Nous avons ainsi pu constater que, quelque soit la concentration de peptide C2 utilisée, nous n'observons pas de sécrétion significative des granules primaires.

IV-2-A-b-β-Effet du peptide C2 sur la sécrétion des granules secondaires en réponse au fMLF

Nous avons précédemment pu constater que le peptide C2 activait la sécrétion des granules primaires en réponse au fMLF. Notre étude s'est ensuite dirigée vers la sécrétion granules secondaires. Nous avons choisi de travailler sur les deux plus fortes concentrations de ce peptide afin de caractériser son effet (inhibiteur ou activateur) sur la sécrétion de lactoferrine (figure 93).

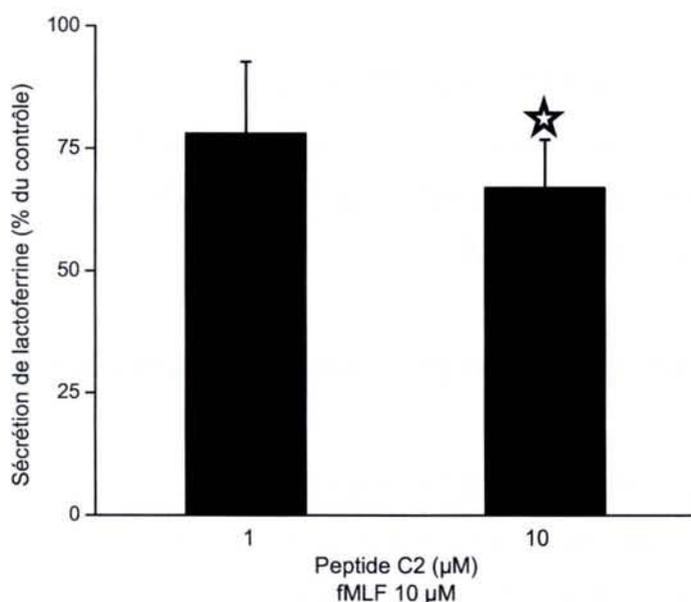


Figure 93: Comparaison de l'exocytose des granules secondaires des neutrophiles incubés en présence de peptide C2. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (eau + fMLF 10 μM) selon leur moyenne ± l'écart-type moyen (n ≥ 4 ; p < 0,05).

L'effet inhibiteur de ce peptide sur la sécrétion de lactoferrine des neutrophiles de moelle osseuse n'est significatif qu'à partir de 10 μM et induit une inhibition de 33 % de la sécrétion des granules secondaires. A partir des figures 91 et 93, nous pouvons remarquer que l'effet du peptide C2 sur la réponse au fMLF est très paradoxal. D'un côté, il stimule la sécrétion des granules primaires, de l'autre, il inhibe la sécrétion des granules secondaires. Les figures 89 et 90 nous montrent que le peptide C2 est un inhibiteur des récepteurs Fpr-rs1/rs2. Il inhibe aussi bien la sécrétion des granules primaires et secondaires en réponse au WKYMVm.

En réponse au fMLF, le N-t-Boc-MLF inhibe plus la sécrétion des granules primaires (figure 85) que celle des secondaires (figure 86). En réponse au WKYMVm, il inhiberait l'exocytose de 5% des granules primaires (figure 87) mais serait sans effet sur celle des granules secondaires (figure 88). Nous savons que le N-t-Boc-MLF se fixe sur le récepteur

mFPR1 et que le WKYMVm passe en majorité par les récepteurs Fpr-rs1/-rs2 et peu par mFPR1.

Lors d'une activation par le WKYMVm, la sécrétion des granules primaires semble dépendante en partie du récepteur mFPR1. En présence de N-t-Boc-MLF (100 μ M) et de fMLF, la sécrétion de la moitié des granules secondaires est inhibée. En présence de peptide C2 (10 μ M) et de fMLF, il y a une inhibition de sécrétion d'un tiers de ces granules. Soit un tiers de la sécrétion des granules secondaires, suite à une stimulation fMLF, transite via l'activation des récepteurs Fpr-rs1/-rs2 par le fMLF. Soit le peptide C2 se fixe sur une partie des récepteurs mFPR1 et de ce fait inhibe la fixation du fMLF sur son récepteur de forte affinité, inhibant ainsi une partie de la sécrétion des granules secondaires.

IV-2-B-Etude des effets du peptide E11 (FPSIHTIRLTQF)

Après l'étude du peptide C2, nous avons poursuivi nos recherches sur la caractérisation de l'effet inhibiteur du peptide E11. Ce peptide a été étudié sur la sécrétion des granules primaires en réponse aux peptides WKYMVm et fMLF.

IV-2-B-a-Effet du peptide E11 sur la sécrétion des granules primaires en réponse au WKYMVm

Comme pour le peptide C2, nous avons réalisé des mesures de la sécrétion des granules primaires en présence de différentes concentrations de peptide E11 (figure 94).

L'effet de cet inhibiteur sur l'exocytose des granules azurophiles des neutrophiles de moelle osseuse en réponse à une stimulation par 300 nM de WKYMVm n'est pas significatif quelle que soit la concentration testée. Contrairement à ce qui a été observé en présence du peptide C2, le peptide E11 ne présente aucun effet inhibiteur sur une stimulation par le WKYMVm. Pourtant ces peptides ont été caractérisés par l'équipe de Leroy comme étant des inhibiteurs du récepteur FPRL1. Chez la souris, ce récepteur correspond aux récepteurs Fpr-rs1 et Fpr-rs2. Il est donc possible que le peptide E11 se fixe uniquement sur l'un des deux récepteurs, récepteur qui ne serait pas lié à la sécrétion des granules. De la même façon, le peptide C2 se fixerait spécifiquement sur un seul de ces deux récepteurs, récepteur qui serait lié à la sécrétion des granules.

Aucune donnée ne nous permet de conclure sur la fixation spécifique de ces peptides sur l'un ou l'autre de ces récepteurs.

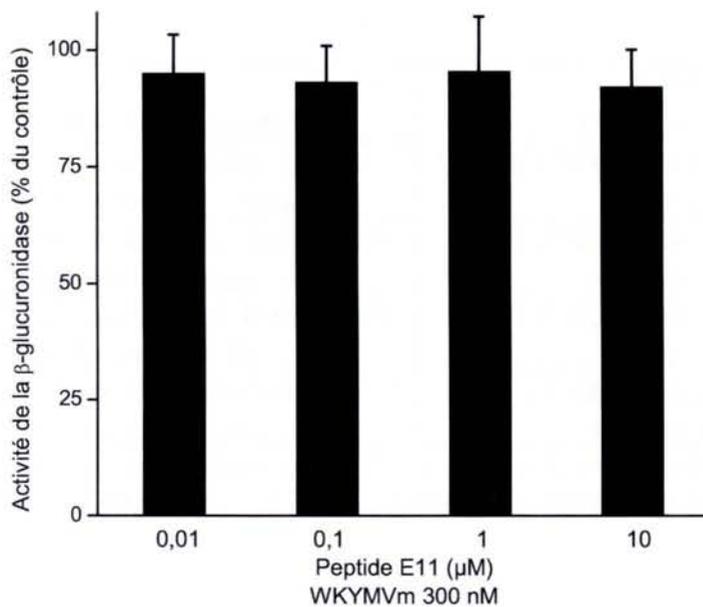


Figure 94 : Comparaison de l'exocytose des granules primaires des neutrophiles incubés en présence de peptide E11. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (eau+WKYMVm 300 nM) selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen (n = 5).

IV-2-B-b-Effet du peptide E11 sur la sécrétion des granules primaires en réponse au fMLF

Nous savons que le peptide C2 active la sécrétion des granules primaires en réponse au fMLF. Nous avons donc étudié l'effet du peptide E11 sur la sécrétion des granules primaires en réponse à une stimulation par le fMLF (figure 95).

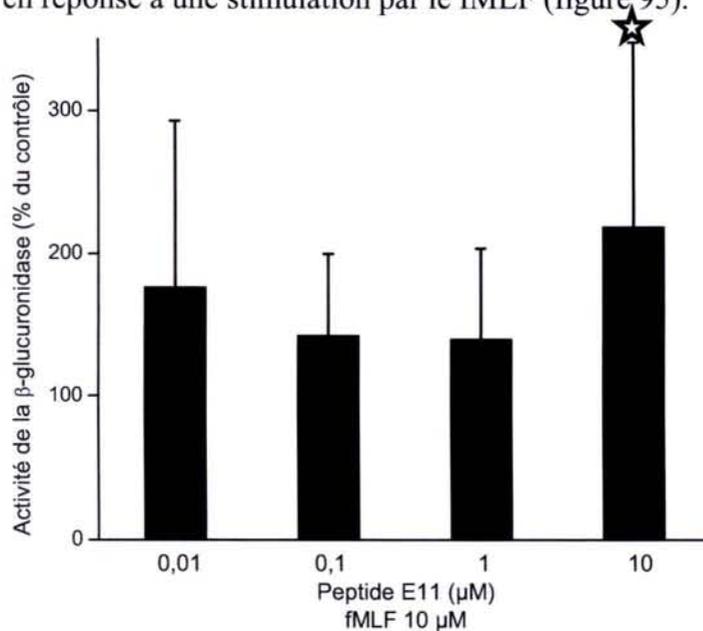


Figure 95: Comparaison de l'exocytose des granules primaires des neutrophiles incubés en présence du peptide E11. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (eau + fMLF 10 μM) selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen (n = 4 ; p < 0,05).

Comme nous l'avons montré pour le peptide C2, la présence de peptide E11 active-lui aussi la sécrétion des granules primaires en réponse à une stimulation par le fMLF mais l'effet de cet inhibiteur sur l'exocytose des granules azurophiles des neutrophiles de moelle osseuse en réponse à une stimulation par 10 μM de fMLF n'est significatif que pour une concentration de 10 μM de peptide E11.

	N-t-Boc-MLF (antagoniste de FPR1)	C2 (antagoniste de FPRL1)
fMLF	Inhibition de la sécrétion de 90 % des granules primaires	Augmentation de la sécrétion des granules primaires (x 2,4)
	Inhibition de la sécrétion de 50 % des granules secondaires	Inhibition de la sécrétion de 33 % des granules secondaires
WKYMVm	Inhibition de la sécrétion de 20 % des granules primaires	Inhibition de la sécrétion de 46 % des granules primaires
	Aucun effet sur la sécrétion des granules secondaires	Inhibition de la sécrétion de 58 % des granules secondaires

Tableau 17 : Effets des inhibiteurs N-t-Boc-MLF et C2 sur la sécrétion des granules primaires et secondaires en réponse aux peptides fMLF ou WKYMVm.

Discussion

De nombreux auteurs ont démontré que le peptide WKYMVm est un activateur efficace de l'activité NADPH-oxydase des neutrophiles humains (Seo *et al.*, 1997) et murins (Bylund *et al.*, 2003). Cependant, l'induction de l'exocytose des neutrophiles par le WKYMVm a été controversée et les voies de signalisation intracellulaire de ce peptide sont seulement partiellement connues. Contrairement à Svensson, Tuluc a pu mettre en évidence la sécrétion des granules primaires des neutrophiles humains en réponse à ce peptide (Svensson *et al.*, 2002; Tuluc *et al.*, 2003). A notre connaissance, de telles études n'ont pas encore été menées chez la souris.

A travers nos expériences, nous confirmons que le peptide chimiotactique WKYMVm-NH₂ est un stimulateur efficace de l'activité NADPH-oxydase mais également de l'exocytose des granules primaires et secondaires des neutrophiles de souris en présence d'un agent perturbateur des filaments d'actine du cytosquelette : la cytochalasine B.

I-Comparaison des effets stimulateurs du fMLF et du WKYMVm

En ce qui concerne la production d'anions superoxydes, chez l'Homme (Dahlgren *et al.*, 2000; Christophe *et al.*, 2001) comme chez la souris (Bylund *et al.*, 2003), il est communément admis que le WKYMVm est un meilleur agoniste que le fMLF. Bien que les EC_{50} de ces peptides n'aient été établis, l'intensité de la réponse oxydative est plus importante suite à une stimulation par le WKYMVm que par le fMLF (à concentration équivalente).

Nos expériences nous ont permis de confirmer cette hypothèse : pour obtenir une production d'anions superoxydes équivalente, il est nécessaire d'employer une concentration 10 fois plus forte de fMLF que celle du WKYMVm. D'autre part, la comparaison des EC_{50} de ces deux peptides, nous montrent également que les neutrophiles de souris semblent plus affins pour le WKYMVm que pour le fMLF (tableau 18).

Les mêmes constatations s'imposent en ce qui concerne la sécrétion des granules primaires et secondaires. En présence de cytochalasine B, le peptide WKYMVm est un meilleur agoniste que le fMLF du point de vue de la sensibilité de la réponse.

Concernant la sécrétion des granules primaires, il faut toutefois noter un point important. Dans le cas du WKYMVm, le relâchement maximal observé est de 25 %. Cette valeur n'est pas significativement supérieure à celle obtenue suite à une stimulation optimale par le fMLF (20 %). Ceci nous porte donc à croire que, suite à une stimulation, les

neutrophiles de souris ne semblent capables de relâcher au maximum que 25 % de leurs granules primaires totaux. Cette valeur de "relachement maximal" est en accord avec ceux observés dans les travaux d'autres auteurs (Abdel-Latif *et al.*, 2004; Tamura *et al.*, 1998).

Ec50 (en nM)	fMLF	WKYMVm
Production d'anions superoxydes	2100 ± 540	133,3 ± 9,9
Exocytose des granules primaires	1190 ± 90	70,5 ± 4,5
Exocytose des granules secondaires	200 ± 50	31,1 ± 1,8

Tableau 18 : Récapitulatif des EC_{50} du fMLF et du WKYMVm obtenus pour chacune des fonctions bactéricides étudiées.

D'après ce tableau, nous pouvons noter que la sécrétion des granules secondaires présente une sensibilité 2 fois plus élevée pour le WKYMVm que la sécrétion des granules primaires et 4 fois plus forte que la production d'anions superoxydes. Comme nous l'avons précédemment constaté au travers des divers EC_{50} du peptide fMLF et comme il l'a été décrit par de nombreux auteurs, il semblerait qu'il existe une hiérarchie dans la réponse microbicide des neutrophiles à savoir que les granules secondaires sont excrétés avant les granules primaires et que ces derniers précède légèrement la production de dérivés oxygénés (Boxio *et al.*, 2004). Ceci confirme la règle générale : les granules secondaires sont libérés plus facilement que les granules primaires, ces derniers étant exigés à un stade ultérieur de l'activation de neutrophile (Borregaard *et al.*, 1993).

II-Comparaison des voies de signalisations intracellulaire mises en jeu par le fMLF et par le WKYMVm.

Les voies de signalisations intracellulaires mises en jeu lors de l'activation des récepteurs N-formylés par le fMLF, implique de nombreuses protéines telles que la PI3K, la phospholipase C, ainsi que l'afflux de calcium. Ceci a été démontré non seulement pour les neutrophiles humains mais aussi pour les cellules HL-60 (Dewald *et al.*, 1988; Nusse *et al.*, 1997; Le *et al.*, 2002).

Le *et al.* ont supposé que l'activation des fonctions cellulaires par les différents récepteurs des peptides N-formylés implique les mêmes voies de signalisation intracellulaire (Le *et al.*, 2002). Nos travaux nous ont permis de vérifier cette hypothèse.

En outre, les voies de signalisation semblent être les mêmes chez les souris et les humains. Une comparaison plus détaillée indique cependant quelques différences dans les

voies de signalisations aboutissant à la sécrétion des granules primaires (β -glucuronidase), des granules secondaires (de lactoferrine) ou à la production de FRO.

II-1-Implication de la voie PI3-kinase dans la stimulation WKYMVm

Tous nos résultats nous ont permis de conclure que la PI3-kinase est une voie impliquée dans la transduction du signal induit par le peptide WKYMVm et aboutissant à la réponse microbicide du neutrophile de souris comme cela l'a été démontré pour le fMLF (Moraes et Downey, 2003; Yasui et Komiyama, 2001; Hirsch *et al.*, 2000). L'utilisation d'inhibiteurs de la PI3K nous a permis de mettre en évidence une sorte de hiérarchie de sensibilité à ces inhibiteurs. Ainsi, alors que la production de FRO semble être extrêmement sensible à ces inhibiteurs, la sécrétion des granules secondaires ne semble être que partiellement inhibée malgré l'utilisation de fortes doses de wortmannine ou de LY294002.

Des résultats semblables ont été observés dans les neutrophiles humains : alors que la production d'anions superoxydes présentait un Ic_{50} de 8 nM de wortmannine, celui des granules primaires s'élevait à 81 nM et à 89 nM pour les granules secondaires (Dewald *et al.*, 1988).

Cependant, dans notre cas, nous avons pu déterminer un Ic_{50} à 30,1 nM de wortmannine pour la sécrétion des granules primaires. Nous avons également constaté que la sécrétion des granules secondaires des neutrophiles de souris semble beaucoup moins sensible à la wortmannine. La voie PI3-kinase semble donc être très importante pour la réponse oxydative et pour la sécrétion des granules primaires, impliquée mais pas indispensable à la sécrétion des granules secondaires. La voie PI3-K n'est donc pas la seule voie de signalisation intracellulaire aboutissant à l'exocytose des granules.

II-2-Implication des voies PKC, PKA et p44/42 MAPK dans la stimulation WKYMVm

La staurosporine est un inhibiteur qui affecte de nombreuses kinases bien qu'il soit plus efficace contre la PKC. De nouveau, seule la production d'anions superoxydes semble être plus sensible à la présence de cet inhibiteur. En effet, les concentrations de staurosporine nécessaires pour observer une inhibition totale de la sécrétion des granules primaires (Ic_{50} 1,9 μ M) sont tellement importantes que des kinases, autre que la PKC, peuvent être affectées.

En d'autres termes, l'inhibition de la PKC semble être insuffisante pour bloquer l'exocytose induit par une stimulation par le WKYMVm. Toutefois, il est possible que l'inhibition de la production d'anions superoxydes par cet inhibiteur soit due à l'inhibition de la voie PKC. Il est également possible que cette inhibition soit due à une interférence de cette molécule sur une autre kinase.

Cette situation a déjà été observée chez les neutrophiles humains stimulés par le peptide fMLF ou par le C5a, où la production d'anions superoxydes est inhibée dès 24 nM de staurosporine mais est sans effet sur l'exocytose des granules primaires malgré de fortes concentrations de cet inhibiteur (100 nM) (Dewald *et al.*, 1989).

D'autre part, la staurosporine seule (1 μ M) stimule significativement la sécrétion des granules secondaires ($p < 0,05$). Cette observation est en contradiction avec nos premières expériences de sécrétion de lactoferrine (1^{ère} partie des résultats, § IV-2-B). En effet, lors de ces expériences, nous avons démontré que le PMA est un agoniste valable de la sécrétion des granules secondaires par les neutrophiles de moelle osseuse. Cet ester de phorbol étant connu pour être un activateur de la PKC, nous supposons que la PKC était impliquée dans la voie de signalisation intracellulaire aboutissant à la sécrétion des granules secondaires. La staurosporine étant un inhibiteur de la PKC, il aurait été logique que celle-ci ait un effet inhibiteur sur la sécrétion des granules spécifiques.

Bien que singulier, ce résultat est en accord avec les travaux d'autres auteurs : la staurosporine comme le PMA, induit l'exocytose des granules secondaires (Dewald *et al.*, 1989; Krause *et al.*, 1992). La PKC ne semble donc pas être la seule cible du PMA dans les neutrophiles humains (Steadman *et al.*, 1996; Baek *et al.*, 1999) et il semble qu'il en soit de même pour les neutrophiles de souris.

L'implication de la voie p44/42 MAPK dans la régulation des fonctions microbicides des neutrophiles humains est cependant controversée. Ainsi, contrairement à certains auteurs (Zu *et al.*, 1998; Coffey *et al.*, 1998; Kuroki et O'Flaherty, 1997), les travaux de Dewas et de Downey semblent démontrer que la p44/42 MAPK serait indispensable à l'activation du complexe NADPH-oxydase suite à une stimulation fMLF (Dewas *et al.*, 2000). Pour notre part et en accord avec ce qui a été démontré dans les neutrophiles humains en réponse au peptide fMLF, la p44/42 MAPK ne semble pas impliquée dans l'exocytose des granules primaires ou secondaires (Mocsai *et al.*, 2000; Downey *et al.*, 1998).

Les résultats obtenus avec les inhibiteurs des protéines kinases (PKC, PKA et p44/42 MAPK) confirment l'existence de différents processus de transduction des signaux dans l'activation de neutrophile, et suggèrent que la phosphorylation semble être un processus exigé pour l'activation de la NADPH-oxydase. Même si nous n'avons pu mettre en évidence que l'importance de la voie PKA dans l'exocytose des granules secondaires, nous ne pouvons exclure la participation d'autres kinases dans l'exocytose des granules aussi bien dans les neutrophiles humains que dans les neutrophiles murins.

II-3-Implication de la voie PLC et du calcium dans la stimulation WKYMVm

Suite à une stimulation par un peptide N-formylé, la phospholipase C va hydrolyser le PIP2 et libérer du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol triphosphate (IP₃). La voie du DAG et la voie de l'IP₃ agissent de façon synergiques sur leurs cibles. Ces deux molécules vont faire office de seconds messagers :

- le DAG va activer les protéines kinases C (PKC) qui vont ensuite phosphoryler diverses protéines cellulaires et ainsi les activer.
- l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) qui est libéré dans le cytoplasme est reconnu par un récepteur situé dans les membranes du réticulum endoplasmique. Ces membranes au repos pompent les ions Ca²⁺ du cytoplasme vers la lumière du réticulum (cisternes), créant une réserve de Ca²⁺ séquestré. Lorsque le récepteur-canal reconnaît l'IP₃, il s'ouvre, libérant les ions Ca²⁺, dont la concentration cytoplasmique augmente alors fortement et active diverses protéines. L'épuisement de ces réserves calciques intracellulaires déclenche un afflux de calcium extracellulaire à travers la membrane plasmique, un mécanisme connu sous le nom d'influx calcique capacitif. Ce courant calcique capacitif joue un important rôle dans le remplissage des réserves calciques intracellulaires et active divers processus physiologiques. En dépit d'efforts considérables, la nature moléculaire du canal capacitif et de la voie de signalisation qui l'active restent encore inconnus (Dutta, 2000).

Pour la première fois, nous sommes en mesure de démontrer l'importance de la phospholipase C et de l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire dans l'exocytose des granules de neutrophiles de souris comme cela a été mis en évidence chez l'Homme (Elzi *et al.*, 2001).

II-3-A-La voie de la phospholipase C

L'activité phospholipasique de cette protéine est donc impliquée dans la voie de signalisation aboutissant à la sécrétion des granules suite à une stimulation par le peptide WKYMVm comme cela l'a été démontré chez l'Homme et la souris suite à une stimulation par le fMLF (Wu *et al.*, 2000).

En présence d'un inhibiteur de la PLC (U-73122), nous pouvons mettre en évidence une inhibition de la sécrétion des granules primaires et des granules secondaires. Nous pouvons également démontré que les résultats observés sont effectivement dus à l'effet inhibiteur de l'U-73122 sur la PLC. Cette protéine est donc impliquée dans la voie de signalisation aboutissant à la sécrétion des granules suite à une stimulation par le peptide WKYMVm comme cela l'a été démontré chez l'Homme et la souris suite à une stimulation par le fMLF (Wu *et al.*, 2000).

Tout se passe donc comme si la sécrétion des granules primaires était dépendante à la fois de la PI3-kinase et de la PLC mais ni de la PKA, de la PKC ou de la MAPK. De plus, les voies PI3-kinase et PLC semblent agir simultanément car l'interruption de l'une d'elle, inhibe la quasi-totalité de la sécrétion des granules primaires.

Par contre, en ce qui concerne la sécrétion des granules secondaires, ce phénomène dépendrait à la fois des voies de la PI3-kinase, de la PKA et de la PLC mais pas de celle de la PKC. Contrairement à ce que nous avons pu observer pour la sécrétion des granules primaires et pour la production d'anions superoxydes, la sécrétion des granules secondaires ne semble pas pouvoir être inhibé dans sa totalité par l'interruption d'une seule voie. Si l'on bloque l'une d'elle, la sécrétion d'une partie de ces granules peut néanmoins avoir lieu. Tout se passe comme si la cellule avait mis au point un système de sauvegarde permettant la sécrétion des granules spécifiques par l'une ou l'autre voie. Cependant, pour observer une réponse maximale, toutes ces voies doivent être fonctionnelles.

II-3-B-Le calcium

Nous avons précédemment montré que l'ionophore calcique A23187, bien que moins puissant que le fMLF, est un agoniste efficace de la sécrétion des granules primaires et secondaires des neutrophiles murins (Boxio *et al.*, 2004). Un afflux massif de calcium semble donc être suffisant pour induire la sécrétion de ces granules. D'autre part, en utilisant des inhibiteurs calcique extracellulaire tels que l'EGTA ou des inhibiteurs des canaux calciques membranaires tels que le SKF-96365 et le chlorure de lanthane, nous démontrons l'importance de cet influx calcique extracellulaire lors de la sécrétion de ces granules.

Par contre, il semblerait que l'afflux de calcium induit uniquement par la libération des stocks intracellulaire sous l'action de la thapsigargine soit insuffisant pour provoquer une libération efficace des granules primaires. Il semble qu'il manque un 2nd signal qui pourrait permettre la libération d'un plus grand nombre de ces granules. Cette constatation ressemble étroitement à ce qui a pu être observé dans les neutrophiles humains et les cellules HL-60 (Wenzel-Seifert *et al.*, 1996; Nusse *et al.*, 1997; Foyouzi-Youssefi *et al.*, 1997).

La thapsigargine est reconnue pour être un activateur d'exocytose moins efficace que le fMLF, et s'avère incapable d'activer la NADPH-oxydase. Cependant, cette molécule est considérée comme un "primer" des réponses microbicides au même titre que le PAF ou le LTB₄ (Wenzel-Seifert *et al.*, 1996). Pour notre part, nous n'avons pu constater cet effet de préactivation. En effet, la présence de thapsigargine dans le milieu réactionnel lors d'une stimulation par le WKYMVm, perturbait la sécrétion normale des granules primaires.

De telles similitudes dans les voies de signalisation entre les neutrophiles murins et humains démontrent que la souris est un bon modèle animal pouvant être aisément utilisé pour étudier l'effet de médicaments ciblant les fonctions bactéricides des neutrophiles, telles que des inhibiteurs de l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire (Li *et al.*, 2002). De plus, ces animaux pouvant être génétiquement modifiés, les souris transgéniques présentant des mutations de ces voies de signalisation fourniront des informations extrêmement utiles en ce qui concerne les fonctions des neutrophiles.

III-Etude des récepteurs mis en jeu par le fMLF et par le WKYMVm

Nos travaux nous ont permis de constater que la présence de N-t-Boc-MLF (inhibiteur du récepteur FPR1) n'inhibait pas totalement la sécrétion des granules primaires et secondaires en réponse à une stimulation par le fMLF. En présence de 100 µM de N-t-Boc-MLF, nous pouvons constater une inhibition de 90 % de la sécrétion des granules primaires mais seulement de 50 % de celle des granules secondaires. Il semblerait donc que le peptide fMLF puisse activer un autre récepteur que FPR1, c'est-à-dire FPRL1. Cette hypothèse est en accord avec la littérature. En effet, FPRL1 est un récepteur de faible sensibilité pour le fMLF car son activation, in-vitro, nécessite de forte concentration de ce peptide (de l'ordre du µM) (Prossnitz et Ye, 1997). L'activation de ce récepteur de faible sensibilité permettrait l'exocytose des granules du neutrophile.

En réponse au peptide WKYMVm, la présence de N-t-Boc-MLF inhibe faiblement la sécrétion des granules primaires et absolument pas celle des granules secondaires, malgré la présence de fortes concentrations de cet inhibiteur. En accord avec les travaux de Bylund, nous en avons conclu qu'un récepteur distinct de FPR (mFPR1) est responsable de la majorité de la réponse au WKYMVm (Bylund *et al.*, 2003). La sensibilité du WKYMVm pour le récepteur mFPR1 est faible, la majorité du signal induite par le WKYMVm transite via un autre récepteur : le FPRL1 (Fpr-rs1/-rs2).

Le fait que seule la sécrétion des granules primaires, en réponse au peptide WKYMVm, soit altérée par la présence de N-t-Boc-MLF, nous permet de supposer que la sécrétion des granules primaires dépend en partie (pour 1/5 de la réponse optimale) de la stimulation du récepteur FPR1. De la même façon, lors de l'utilisation de N-t-Boc-MLF en présence de fMLF, nous avons également constaté que la sécrétion des granules primaires était plus inhibée que celle des secondaires. Ces résultats nous mènent à penser que la sécrétion des granules primaires, en réponse au fMLF ou au WKYMVm, semble partiellement dépendante de l'activation du récepteur FPR1.

L'étude des effets du peptide C2 (inhibiteur de FPRL1) nous a apporté des données complémentaires semblant étayer cette supposition. La présence de peptide C2 avant une stimulation par le WKYMVm, nous a permis de constater que l'exocytose des granules des neutrophiles était inhibée. Le peptide C2 est un inhibiteur du récepteur FPRL1 humain donc des récepteurs Fpr-rs1/-rs2 murins. En accord avec la littérature, ces résultats nous portent à croire que le peptide WKYMVm stimule les neutrophile murins via l'activation des récepteurs Fpr-rs1/-rs2 (Bylund *et al.*, 2003).

D'autre part, nous pouvons noter que la sécrétion des granules primaires semble légèrement moins inhibée que celle des secondaires (figures 89 et 90). Ceci pourrait être expliqué par le fait que la sécrétion des granules primaires, contrairement à celles des secondaires, soit en partie sous le contrôle du récepteur mFPR1 et que ce récepteur soit insensible à l'effet inhibiteur du peptide C2.

Bien qu'inactif par lui même, le peptide C2 s'est révélé être un excellent "primer" de la sécrétion des granules primaires des neutrophiles murins en réponse à une stimulation par le fMLF. Par contre, il est un inhibiteur de la sécrétion des granules secondaires en réponse à ce même tripeptide. Ces constatations sont en accord avec notre hypothèse : la sécrétion des granules primaires nécessite l'activation du récepteur FPR1 alors que la sécrétion des granules secondaires semble dépendre de l'activation des récepteurs FPR-rs1/-rs2. Nous savons que le

fMLF active faiblement le récepteur FPRL1. La présence du peptide C2 lors d'une stimulation par le fMLF, va bloquer les récepteurs FPRL1 et donc inhiber une partie de la sécrétion des granules secondaires. Lors d'une stimulation par le fMLF, la sécrétion des granules primaires est entièrement dépendante du récepteur FPR1.

Il semble que la fixation du peptide C2 sur le récepteur FPRL1 ait un effet de priming sur la sécrétion des granules primaires. Il est possible, qu'en réponse au fMLF, le peptide C2 rende le récepteur mFPR1 plus affine pour le fMLF, soit directement en modifiant la conformation de mFPR1 par sa fixation, soit indirectement en générant des signaux intracellulaires lors de sa fixation sur FPRL-1 qui induiraient peut-être une augmentation du nombre de récepteurs au fMLF. La sécrétion des granules primaires étant dépendante du récepteur mFPR1, l'augmentation de la sensibilité de ce récepteur pour le fMLF augmenterait la sécrétion des granules primaires.

Parce que contrairement à C2, E11 n'a aucun effet sur la sécrétion des granules primaires en présence de WKYVMm mais préactive la sécrétion de ces mêmes granules suite à une stimulation fMLF, ces deux peptides ne semblent pas se fixer sur le même récepteur. Ces deux peptides semblent néanmoins capables d'activer tous deux la réponse au fMLF.

Les deux peptides mis au point par Leroy *et al.* sont des inhibiteurs du récepteur humain FPRL1. Par contre, ces deux peptides réagissent différemment sur les récepteurs murins Fpr-rs1/-rs2. Il est possible que ces peptides soient spécifiques de l'un ou l'autre des ces récepteurs. Ainsi, il semblerait que l'un de ces deux récepteurs (sensible au peptide C2) soit responsable de la sécrétion des granules, le rôle du second restant inconnu. Puisque le peptide WKYVMm semble se lier avec une meilleure sensibilité à Fpr-rs2 (Bylund *et al.*, 2003), que contrairement au peptide E11, la présence du peptide C2 inhibe l'effet de WKYVMm, il est possible que le peptide C2 se lie à Fpr-rs2 alors que le peptide E11 se lierait à Fpr-rs1.

IV-Conclusion

La littérature actuelle ainsi que nos données prouvent que le peptide WKYVMm est un agoniste efficace des fonctions microbicides des neutrophiles humains aussi bien que murins. En ce qui concerne la diversité des fonctions activées, il est au moins aussi efficace que le fMLF. Les voies de signalisation qu'il emprunte ressemblent à celle utilisées par le fMLF.

**Etude de la viabilité et des
voies de signalisations
associées**

Résultats

I-Comparativement aux neutrophiles issus de la moelle osseuse, les neutrophiles sanguins présentent une viabilité réduite

I-1-Etude de la viabilité des neutrophiles

Puisque nos préparations de neutrophiles de moelle osseuse semblent être essentiellement constituées de cellules différenciées tant du point de vue morphologique que fonctionnel, nous avons voulu comparer leur durée de demi-vie par rapport à leur homologue sanguins. Pour étudier la viabilité des neutrophiles de moelle osseuse et de sang, ces deux populations ont été incubées dans des conditions de culture cellulaire standards et identiques (Matériel et Méthodes, § III).

Afin d'évaluer le nombre de cellules viables au sein des deux populations de neutrophiles étudiées, la quantification de l'ATP intracellulaire a été effectuée à plusieurs temps d'incubation jusqu'à un temps de culture cellulaire de 48 h. Ce test de viabilité est basé sur la titration de la bioluminescence naturelle de l'ATP intracellulaire. L'ATP est un signal de l'activité métabolique des cellules, son taux reste constant dans les cellules vivantes et ne varie pas en fonction de l'activation ou du métabolisme de la cellule. Il peut donc être utilisé comme marqueur de titration de la viabilité cellulaire. Le réactif utilisé lyse les cellules puis génère un signal luminescent proportionnel à la quantité d'ATP intracellulaire produit par les cellules vivantes donc proportionnel au nombre de cellules vivantes (Crouch *et al.*, 1993).

La figure 96 révèle une décroissance exponentielle du nombre de cellules viables au cours de temps. Cette décroissance est sensiblement plus rapide pour les neutrophiles du sang. Nous avons ainsi pu constater qu'après 24 h, tous les neutrophiles sanguins étaient morts alors que 25 % des neutrophiles de la moelle osseuse étaient encore viables.

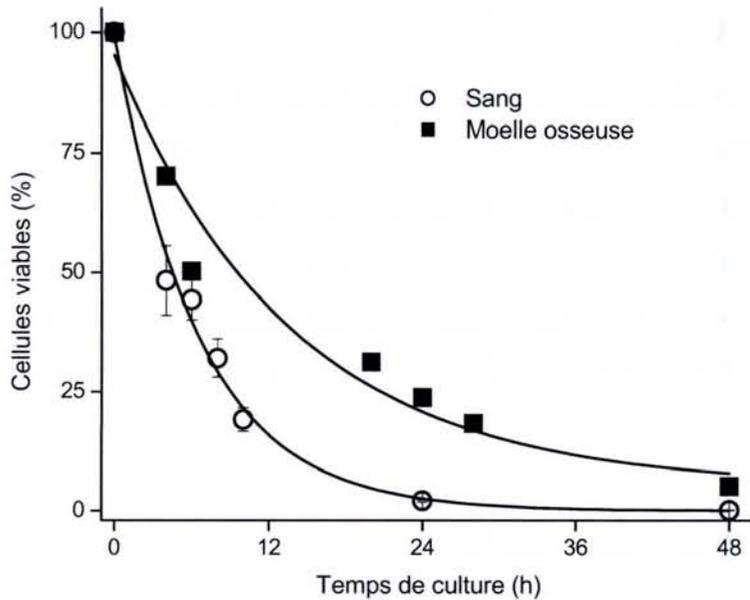


Figure 96 : Etude de la viabilité des neutrophiles de moelle et du sang en fonction du temps dans des conditions de culture identiques. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules viables par rapport au nombre de cellules ensemencées selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n \geq 3$). Les lignes représentent un ajustement exponentiel des données.

À partir de l'ajustement exponentiel des données au cours de temps observé sur ce graphique, la demi-vie des deux populations de neutrophiles murins a pu être déterminé par la formule : $t_{1/2} = 0,693 \times \tau$ où τ représente le temps constant de mort exponentiel (figure 97).

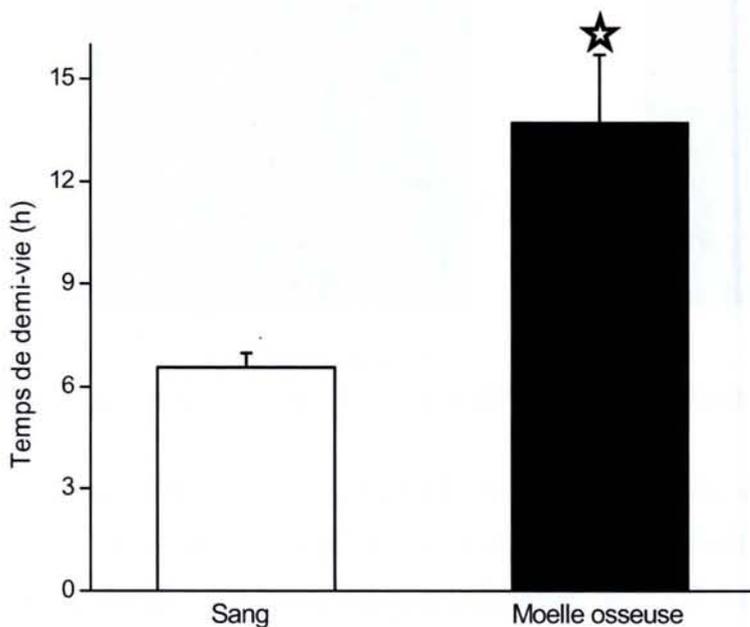


Figure 97 : Temps de demi-vie moyen des neutrophiles issus du sang et de la moelle osseuse en culture cellulaire standard. La différence entre ces deux populations cellulaires est statistiquement significative ($n \geq 3$, $p < 0,05$). Ces données sont exprimées en tant que moyenne \pm écart-type moyen.

Comme le montre cette figure, en culture cellulaire standard, les neutrophiles issus de la moelle osseuse ($13,7 \pm 1,9$ h) présente un temps de demi-vie deux fois plus important que celui des neutrophiles sanguins ($6,5 \pm 0,4$ h).

Les neutrophiles de moelle osseuse sont aussi fonctionnels, plus nombreux (cf. Résultats, 1^{ère} partie) et possèdent une plus longue demi-vie que leurs homologues sanguins. Afin de faciliter nos recherches, les expériences suivantes ont donc été réalisées avec des neutrophiles de moelle osseuse.

I-2-Déterminer le type de mort cellulaire

Les expériences de viabilité cellulaire, nous ont permis de mettre en évidence une mort cellulaire physiologique du neutrophile en fonction du temps. Nous avons donc cherché à explorer quels mécanismes étaient mis en jeu dans cette mort cellulaire.

Il a été ainsi démontré que, dans des conditions de culture cellulaire standards, les neutrophiles humains présentaient les caractéristiques morphologiques de l'apoptose (cf. Introduction, figure 15) (Lundqvist-Gustafsson et Bengtsson, 1999; Maianski *et al.*, 2004a).

I-2-A-Caractéristique morphologique du noyau

A l'aide de l'incorporation nucléaire du DAPI, nous avons étudié la morphologie nucléaire des neutrophiles de moelle osseuse afin d'observer une éventuelle condensation de la chromatine caractéristique de l'apoptose et d'identifier ainsi le type de mort cellulaire mis en jeu chez les neutrophiles murins.

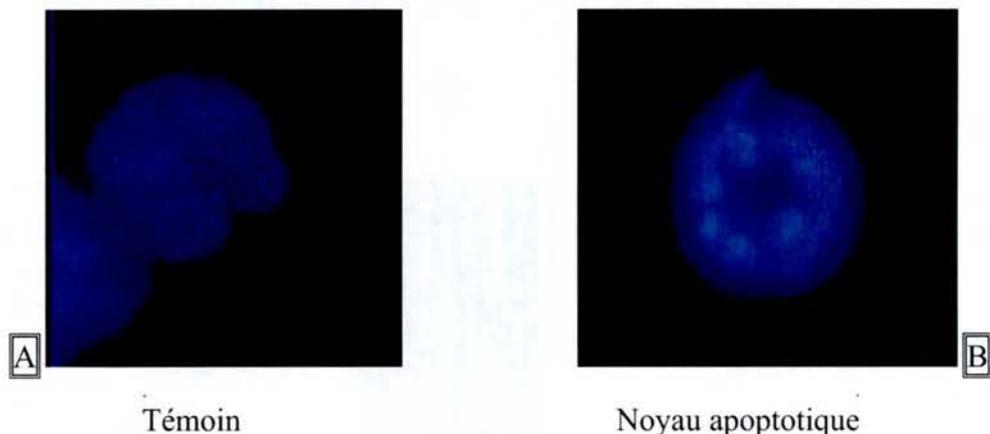


Figure 98 : Marquage des noyaux de neutrophiles murins de moelle osseuse au DAPI.

Avant ensemencement en culture, les noyaux observés à l'aide de l'incorporation du DAPI, présentent la forme caractéristique des noyaux de neutrophiles murins (en "doughnut" ou en fer à cheval, figure 98 A). L'analyse morphologique de neutrophiles, ensemencés dans des conditions de cultures cellulaires standard, a révélé au cours du temps, une condensation de la chromatine caractéristique d'un processus apoptotique (figure 98 B). Les neutrophiles murins, comme leurs homologues humains, meurent donc par apoptose.

I-2-B-Dénombrement des noyaux apoptotiques

Afin de s'assurer que toutes les cellules présentes dans nos cultures mourraient par apoptose, nous avons étudié le pourcentage de noyaux apoptotiques au cours du temps. A

différents temps de culture, les cellules encore présentes dans le milieu ont été étudiées comme décrit dans le protocole (Matériel et méthodes, V-1-A-b). En se basant sur les critères morphologiques précédemment décrits (cf. Introduction, figure 15), le nombre de noyaux apoptotiques sera comptabilisé et ramené en pourcentage par rapport au nombre total de noyaux (figure 99).

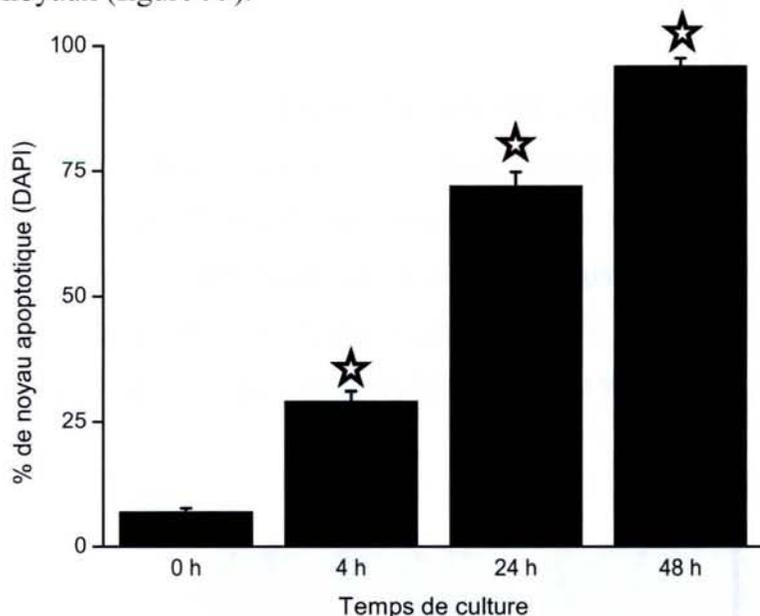


Figure 99 : Détermination du nombre de cellules apoptotiques au cours du temps. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules apoptotiques par rapport au nombre de cellules encore présentes selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n \geq 7$, $p < 0,05$).

Comme le montre cette figure, le nombre de neutrophiles apoptotiques augmente au cours du temps de façon inversement proportionnelle à la viabilité cellulaire. Dès la fin de leur purification, 7 % de ces cellules présentent déjà les caractéristiques morphologiques de l'apoptose. Après 48 h, tous les noyaux montrent les signes de l'apoptose. Toutes les cellules de nos suspensions de neutrophiles meurent effectivement par apoptose. Ce phénomène semble s'activer rapidement après la purification des cellules tel que cela a été mis en évidence chez le neutrophile humain (Maianski *et al.*, 2004a).

I-3-Les neutrophiles meurent par apoptose via la perte du potentiel mitochondrial

Au niveau intracellulaire, il existe deux voies apoptotiques parallèles : une voie mitochondriale qui met en jeu les protéines de la famille Bcl2 et la caspase-9 et une voie directe via les récepteurs de mort cellulaire (ex, récepteur au TNF), les caspases initiatrices (comme les caspases 8 et 10). Ces deux voies aboutissant à l'activation des caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7) et par la suite, à la mort cellulaire par apoptose.

La voie mitochondriale ayant été récemment impliqué dans l'apoptose du neutrophile humain (Maianski *et al.*, 2004a; Maianski *et al.*, 2004b; Taneja *et al.*, 2004), nous avons

choisi d'étudier l'importance de la voie mitochondriale dans l'apoptose du neutrophile de souris. Cette voie se caractérise par une perte du potentiel transmembranaire mitochondriale. Ce phénomène est l'un des événements intracellulaires qui se produit le plus précocement après induction de l'apoptose.

I-3-A-Caractéristique morphologique des mitochondries

Pour mettre en évidence ce phénomène, nous avons utilisé un kit de coloration cationique, le MitoCapture™. Dans les cellules saines, ce réactif s'accumule dans les mitochondries et émet une fluorescence rouge tandis que le cytoplasme émet une fluorescence verte. Dans les cellules apoptotiques, le réactif ne peut s'agréger dans les mitochondries à cause de la perte de potentiel membranaire mitochondrial ; il reste ainsi dans le cytoplasme et émet une fluorescence verte.

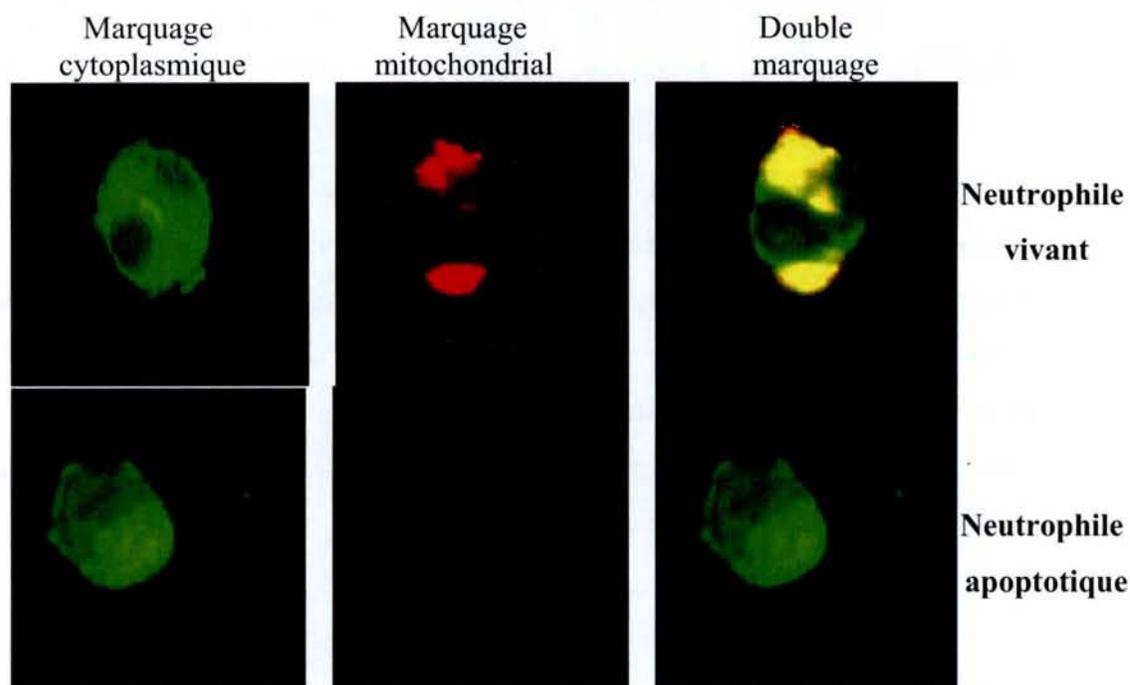


Figure 100: Marquage des mitochondries de neutrophiles murins de moelle osseuse par le kit MitoCapture™. Cette coloration permet d'observer la perte du potentiel membranaire mitochondrial, phénomène précoce et caractéristique de l'apoptose cellulaire mitochondriale. Les photos de la partie supérieure montrent une cellule dont l'activité mitochondriale est préservée. Les photos inférieures montrent une cellule sans marquage mitochondrial.

L'étude des mitochondries des neutrophiles, ensemencés dans des conditions de cultures cellulaires standard, révèle une perte du potentiel mitochondrial. Les neutrophiles murins, comme leurs homologues humains, entrent dans un programme de mort cellulaire par apoptose via la voie mitochondriale.

I-3-B-Dénombrement des cellules perdant leur potentiel mitochondriale membranaire

Comme pour le marquage nucléaire au DAPI, nous avons cherché à savoir si toutes les cellules présentes dans nos cultures mourraient par apoptose via la voie mitochondriale. Pour cela, nous avons étudié le pourcentage de cellules présentant une perte du potentiel mitochondrial au cours du temps. A différents temps de culture, les cellules encore présentes dans le milieu ont été étudiées comme décrit dans le protocole (Matériel et méthodes, V-1-B).

En se basant sur les critères colorimétriques précédemment décrits (figure 100), le nombre de cellules apoptotiques est comptabilisé et ramené en pourcentage par rapport au nombre total de noyaux. Le nombre de cellules totales correspond au nombre de cellules vertes. Les cellules définies comme viables sont celles qui présentent le double marquage vert/rouge car leurs membranes mitochondriales sont intactes ce qui permet au réactif Mitocapture de s'agréger dans ces membranes. Une fois le nombre de cellules vertes déterminé, les cellules présentant le double marquage sont comptabilisées et la différence entre ces deux populations, détermine le nombre de cellules ayant perdu leur potentiel membranaire mitochondriale donc les cellules en apoptose.

La position du marquage mitochondrial varie d'une cellule à l'autre mais ce marquage répond à la loi du tout ou rien : lorsque l'on constate le découplage des membranes mitochondriales, toutes les mitochondries sont touchées.

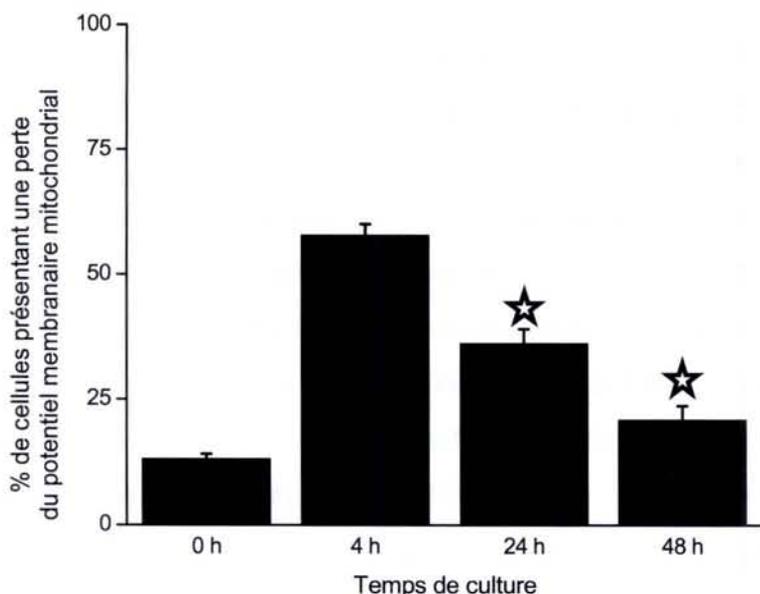


Figure 101 : Détermination du nombre de cellules présentant une perte du potentiel mitochondrial au cours du temps. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules apoptotiques par rapport au nombre total de cellules selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n \geq 7$, $p < 0,05$ par rapport au temps 0 h).

Dès la fin de leur purification, 13 % des cellules ont perdu leur potentiel membranaire mitochondrial alors que seules 7 % présentent une condensation chromatinienne (tableau 19).

La perte du potentiel membranaire est un événement précoce de l'apoptose, il est observable avant la condensation de la chromatine. Ainsi, 6 % des cellules ont perdu leur

potentiel membranaire mitochondrial mais ne présentent pas encore de changement morphologique du noyau. De la même façon, nous pouvons noter qu'après 4 h, 70 % de ces cellules sont encore viables et parmi elles, 58 % ont perdu leur potentiel membranaire mitochondrial mais seulement 29 % montrent une condensation de la chromatine.

temps de culture	nombre de cellules viables	cellules présentant une perte du potentiel membranaire mitochondrial	cellules présentant un noyau apoptotique
0 h	20 000	2 600 soit 13 %	1 400 soit 7 %
4 h	14 045 (70 %)	8 146 soit 58 %	4 073 soit 29 %
24 h	4 768 (24 %)	1 716 soit 36 %	3 433 soit 72 %
48 h	1 034 (5 %)	217 soit 21 %	993 soit 96 %

Tableau 19 : Récapitulatif chiffré des figures 96, 99 et 101.

Il est également important de noter qu'après 48 h de culture cellulaire, seulement 5 % des cellules sont encore viables. Parmi elles, 96 % présentent un changement morphologique du noyau mais seulement 21 % ont perdu leur potentiel membranaire mitochondrial. Ceci signifie que parmi les 20 000 cellulesensemencées, 776 neutrophiles (soit 3,8 %) meurent par apoptose qui ne dépendrait pas de la voie mitochondriale.

II-Effets de l'addition d'agoniste sur le temps de survie des neutrophiles murins

Nous connaissons désormais le temps de demi-vie de nos préparations cellulaires et nous savons, de plus, que les neutrophiles murins meurent par apoptose après avoir perdu leur potentiel membranaire mitochondrial.

Nous avons ensuite choisi d'étudier le temps de viabilité et les modifications intracellulaires (condensation chromatinienne et potentiel membranaire mitochondrial) de nos cellules suite à une stimulation par différentes concentrations de peptides chimioattractants. Notre but était de mettre en évidence d'éventuelles modifications dans la durée de vie ou dans le processus apoptotiques de nos cellules suite à ces stimulations.

Nous savons que le nombre de neutrophiles viables présente une décroissance exponentielle au cours du temps et que la majorité de ces cellules entament leur processus apoptotiques avant 4 h d'incubation. Nous avons donc choisi de centrer nos expériences sur un temps d'incubation de 4 h. Les tests statistiques ont été effectués par comparaison aux valeurs obtenues pour les "témoins 4 h".

II-1-Etude de la viabilité des neutrophiles

II-1-A-Effet du peptide fMLF sur la viabilité des neutrophiles

De nombreux auteurs dont Edwards ont décrit que la réponse microbicide du neutrophile (chimiotactisme, production d'anions superoxydes, exocytose,...) à une stimulation par le fMLF dépend de la concentration à laquelle il est utilisé (Edwards, 1994). A partir de leurs travaux ainsi que de nos résultats (cf. Résultats, 1^{ère} partie), nous avons choisi plusieurs concentrations de ce peptide afin d'étudier leurs effets sur la durée de vie du neutrophile (figure 102).

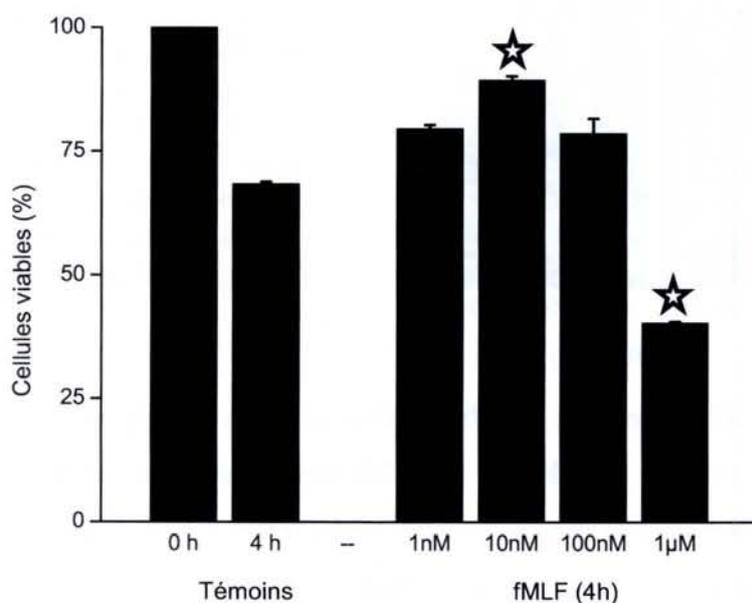


Figure 102 : Etude de la viabilité des neutrophiles de moelle en présence de différentes concentrations de fMLF. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules viables par rapport au nombre de cellulesensemencées selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n \geq 3$, $p < 0,05$).

Cette figure montre que la viabilité du neutrophile dépend de la concentration de fMLF mis en jeu. En présence de faibles doses de fMLF, comparativement au témoin 4 h, nous remarquons une augmentation du nombre de cellules viables. Cependant, cette différence n'est significative que pour une concentration de 10 nM de fMLF. A cette concentration nous constatons une augmentation de la viabilité cellulaire de 21 % par rapport au "témoin 4 h". Des doses plus faibles n'ont pas eu d'effet significatif sur la viabilité de ces cellules. Des concentrations de fMLF connues pour être chimioattractantes (≤ 100 nM,) semblent donc retarder la mort cellulaire du neutrophile.

De plus, nous pouvons constater qu'une dose suffisante pour induire les fonctions microbicides du neutrophile (1 μ M de fMLF) induit une mort cellulaire significativement plus importante. A cette concentration nous constatons une diminution de la viabilité cellulaire de 28 % par rapport au "témoin 4 h".

II-1-B-Effet du peptide WKYMVm sur la viabilité des neutrophiles

La même expérience a été effectuée en présence du peptide WKYMVm qui active les mêmes fonctions que le fMLF mais agit via un autre récepteur de la famille des FPR (figure 103).

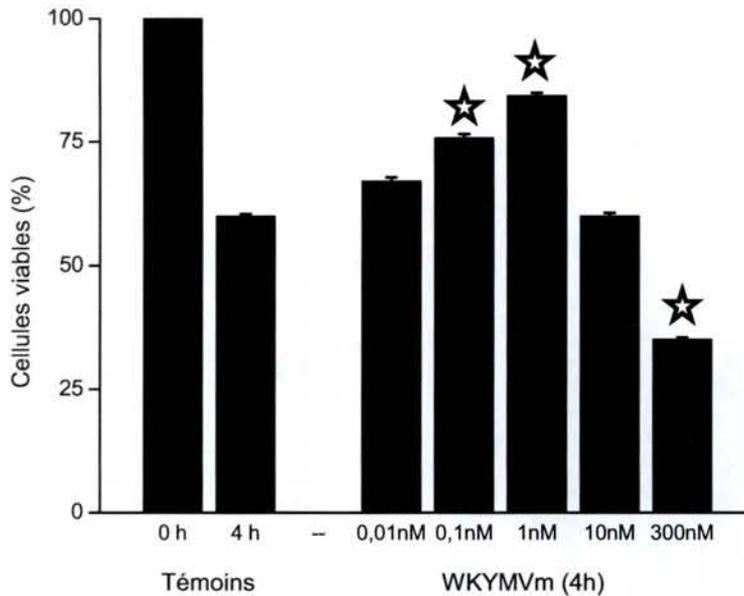


Figure 103 : Etude de la viabilité des neutrophiles de moelle en présence de différentes concentrations de WKYMVm. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules viables par rapport au nombre de cellulesensemencées selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n \geq 3$, $p < 0,05$).

Cette figure est en accord avec les résultats obtenus dans la figure 102. Des concentrations chimioattractantes de ce peptide (0,1 et 1 nM) augmentent significativement le nombre de cellules viables (+ 24 %), des doses inférieures n'ayant pas d'effet significatif. De la même façon, une concentration capable d'activer les fonctions bactéricides induit une mort cellulaire significativement plus importante (- 25%).

Comparativement au fMLF, des concentrations dix fois moins fortes de WKYMVm permettent d'aboutir aux mêmes impacts (retardant ou activant) sur la mort cellulaire.

II-1-C-Effet de l'IL-8 sur la viabilité des neutrophiles

Nous avons ensuite étudié l'influence d'une molécule endogène de l'organisme, l'IL-8, sécrétée lors d'une réaction inflammatoire, dans le but de comparer ses effets à ceux obtenus en présence de peptides bactériens (figure 104).

Indépendamment d'être un activateur efficace du chimiotactisme des neutrophiles humains, l'IL-8 peut également induire le dégranulation et la production de métabolite réactifs dérivés de l'oxygène par les neutrophiles (Van Damme *et al.*, 1990). Les concentrations d'IL-8 utilisées, néanmoins reconnues pour être chimioattractante, ne modifient pas la viabilité des neutrophiles murins. Une légère tendance à augmenter la viabilité de ces cellules est

cependant observée pour 50 nM d'IL-8 mais cette différence n'est pas significative. Dès lors, nous n'avons pas mené plus avant l'étude de l'effet de cette molécule sur nos cellules.

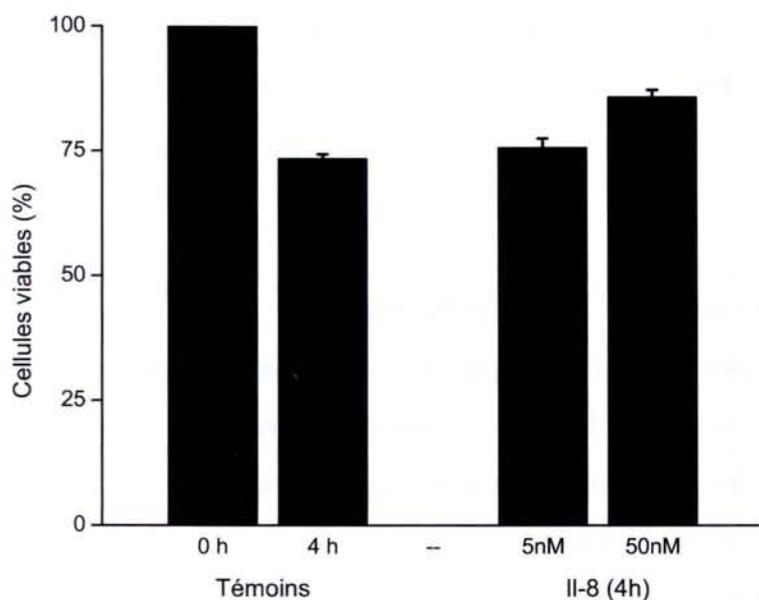


Figure 104 : Etude de la viabilité des neutrophiles de moelle en présence de différentes concentrations d'IL-8. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules viables par rapport au nombre de cellulesensemencées selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n \geq 4$).

II-1-D-Effet du PMA sur la viabilité des neutrophiles

Nos expériences se sont ensuite poursuivies par l'étude de l'effet de l'ester de phorbol, activateur de la PKC : le PMA dont nous nous sommes servis lors de nos différents tests fonctionnels (figure 105).

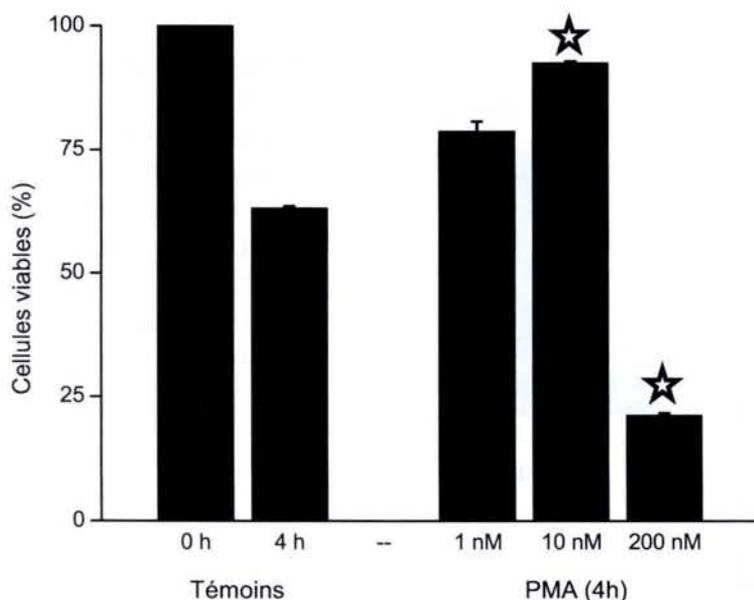


Figure 105 : Etude de la viabilité des neutrophiles de moelle en présence de différentes concentrations de PMA. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules viables par rapport au nombre de cellulesensemencées selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n \geq 5$, $p < 0,05$).

Comme le fMLF ou le WKYMVm, le PMA influence la durée de vie des neutrophiles : à 10 nM, il semble capable d'induire un retard de la mort cellulaire ; à 200 nM, il active les fonctions bactéricides des neutrophiles et réduit leurs viabilités. La voie de la PKC semble donc être impliquée dans la balance vie/mort du neutrophile de souris.

A travers toutes ces expériences, nous avons pu déterminer des doses optimales d'agonistes capables d'augmenter la viabilité des neutrophiles : fMLF 10 nM, WKYMVm 1nM et PMA 10 nM. Nous avons également montré qu'une concentration d'agoniste suffisante pour induire les fonctions bactéricides du neutrophile, réduit significativement la durée de vie de ces cellules.

II-2-Dénombrement des noyaux apoptotiques

Nous avons précédemment montré que dans des conditions de cultures cellulaires standard et en absence de toutes stimulations, les neutrophiles meurent par apoptose. Nous savons également qu'en fonction de la concentration d'agoniste ajoutée dans le milieu de culture, nous pouvons moduler la viabilité de ces cellules.

Nous avons cherché à savoir si cette modulation interférait sur le type de mort cellulaire mis en jeu. Le but étant de comprendre à quel niveau intervenaient les signaux intracellulaires induit par les peptides fMLF et WKYMVm.

II-2-A-Effet du fMLF sur la morphologie nucléaire des neutrophiles

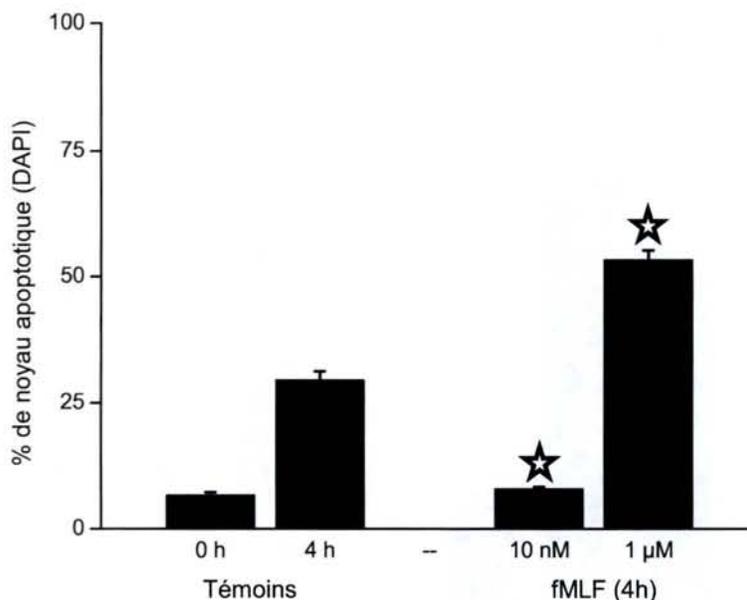


Figure 106 : Détermination du nombre de cellules présentant une morphologie nucléaire apoptotique en présence de différentes concentrations de fMLF. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules apoptotiques par rapport au nombre total de cellules selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n \geq 6$, $p < 0,05$).

Comme le montre cette figure, une dose chimioattractante de fMLF (10 nM) réduit le nombre de cellules apoptotiques. Les signaux induits par une faible concentration de ce peptide agissent sur la cellule avant les changements morphologiques du noyau. Par contre, une dose stimulant la réponse microbicide augmente le nombre de cellules apoptotiques.

II-2-B-Effet du WKYMVm sur la morphologie nucléaire des neutrophiles

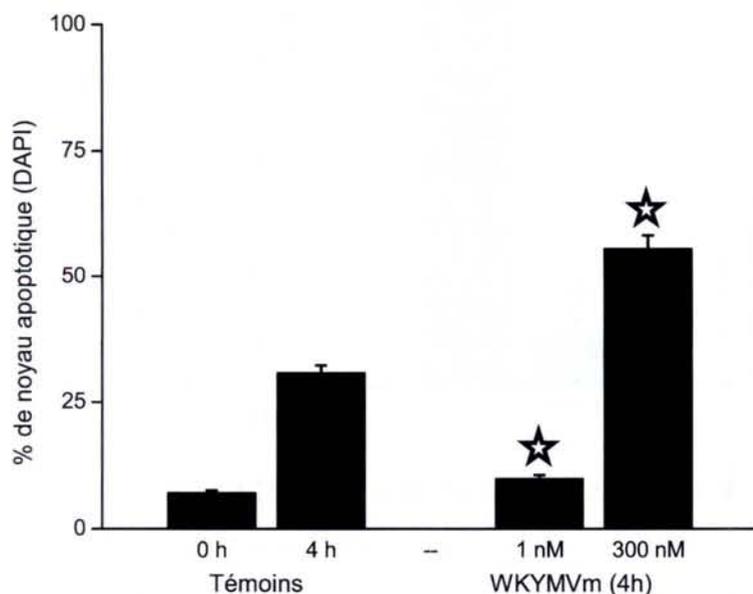


Figure 107 : Détermination du nombre de cellules présentant une morphologie nucléaire apoptotique en présence de différentes concentrations de WKYMVm. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules apoptotiques par rapport au nombre total de cellules selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n \geq 8$, $p < 0,05$).

Comme nous l'avons montré pour le fMLF, une dose chimioattractante de WKYMVm (1 nM) réduit le nombre de cellules apoptotiques. L'action de faible concentration de ce peptide sur les neutrophiles se produit également avant les changements morphologiques du noyau. De la même façon, une dose stimulant les fonctions bactéricides augmente le nombre de cellules apoptotiques. Les effets de ces deux peptides chimioattractants sur la viabilité cellulaire des neutrophiles passent par une modulation du processus apoptotique.

II-3-Dénombrement des cellules perdant leur potentiel membranaire mitochondrial

Après 4 h d'incubation dans des conditions de culture cellulaires standards (en absence de tout agoniste), 58 % des cellules encore viables montrent une perte du potentiel mitochondrial membranaire. Le but était maintenant de situer plus précisément l'action de ces diverses concentrations de peptides. Des doses chimioattractantes agissent-elles avant ou après la perte de potentiel membranaire ? Des doses effectrices induisant l'apoptose, ces signaux passent-ils également par la voie mitochondriale ?

II-3-A-Effet du peptide fMLF sur la perte du potentiel membranaire mitochondrial

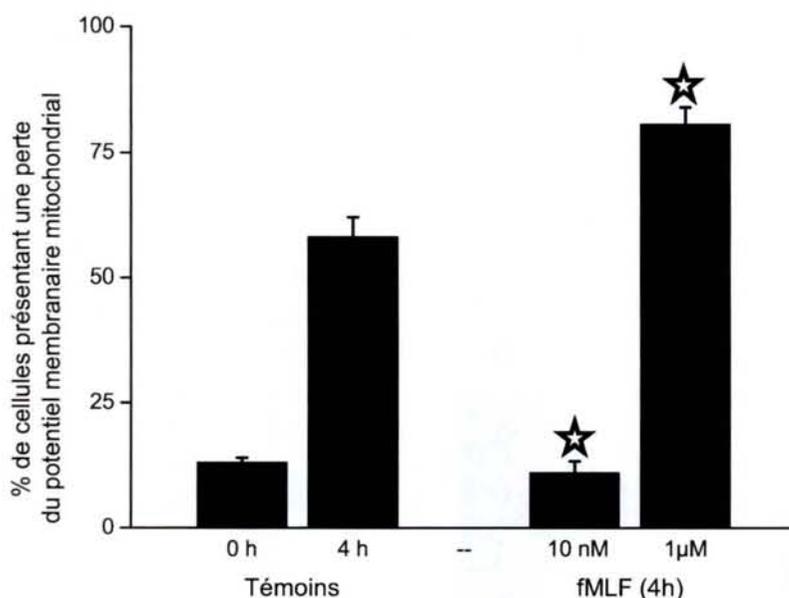


Figure 108 : Détermination du nombre de cellules présentant une perte du potentiel mitochondrial en présence de différentes concentrations de fMLF. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules apoptotiques par rapport au nombre total de cellules selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n \geq 13$, $p < 0,05$).

Cette figure nous permet de penser que de faibles doses de fMLF agissent très en amont du processus apoptotique. En effet, le nombre de cellules ayant perdu leur potentiel mitochondrial est significativement plus faible (11 % des cellules). 10 nM de fMLF permet donc de sauvegarder le potentiel membranaire mitochondrial. Par contre, une dose plus forte de fMLF augmente la perte du potentiel mitochondrial.

La modulation du processus apoptotique par le fMLF emprunte donc la voie mitochondriale.

II-3-B-Effet du peptide WKYMVm sur la perte du potentiel membranaire mitochondrial

Le WKYMVm agit-il de la même façon que le fMLF sur la perte du potentiel mitochondrial ? (figure 109)

Contre toute attente, le WKYMVm n'agit pas sur les neutrophiles de la même façon que le fMLF. En effet, même à faible dose (1 nM), ce peptide ne permet pas d'éviter la perte du potentiel mitochondrial. De la même façon, à forte dose, nous n'avons pas pu constater d'augmentation du nombre de cellules ayant perdu leur potentiel mitochondrial pourtant, nous avons remarqué une augmentation du nombre de cellules présentant une morphologie nucléaire apoptotique. Contrairement au fMLF, le WKYMVm n'interférerait donc pas sur la voie mitochondriale pour moduler l'apoptose des neutrophiles.

A travers ces expériences, nous avons pu montrer que ces deux peptides, bien que présentant les mêmes propriétés d'action sur le neutrophile, ne transitent pas par les mêmes voies de signalisation. Certes, ils permettent tous deux (à dose chimioattractante) de retarder l'apoptose cellulaire mais le fMLF agit avant la perte de potentiel membranaire, le

WKYMVm après la perte de potentiel membranaire mitochondrial. De même (à forte dose), le fMLF induit l'apoptose par la voie mitochondriale contrairement au WKYMVm.

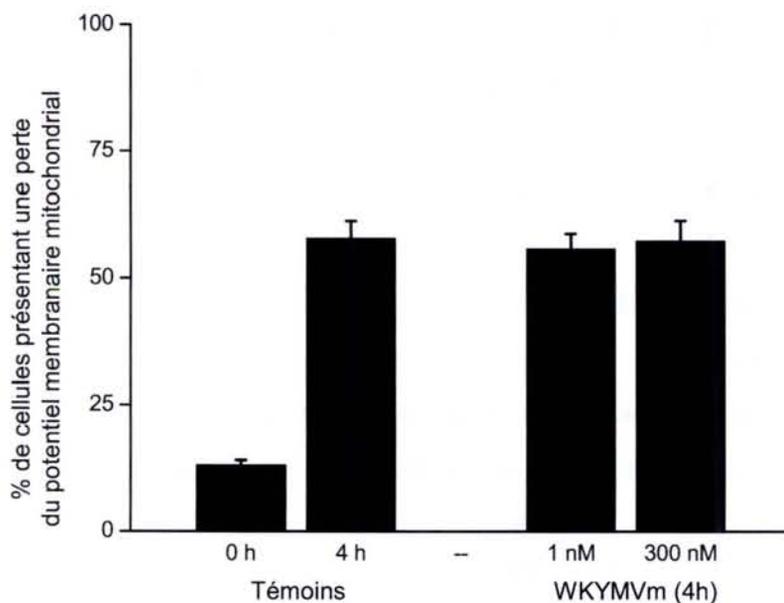


Figure 109 : Détermination du nombre de cellules présentant une perte du potentiel mitochondrial en présence de différentes concentrations de WKYMVm. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules apoptotiques par rapport au nombre total de cellules selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n \geq 11$).

II-4-Etude des protéines pro-apoptotiques : Bad, Bax et caspase-9

Les résultats précédents nous laissent penser que les signaux anti-apoptotiques ou pro-apoptotiques, générés par une stimulation fMLF ou WKYMVm ne transitent pas par les mêmes voies de signalisation. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons choisi d'étudier le degré d'expression de trois protéines pro-apoptotiques impliquées dans la voie mitochondriale de transduction du signal apoptotique : les protéines Bad, Bax et la caspase-9. Le but de ces expériences était de mettre en évidence une éventuelle modification du niveau d'expression de ces protéines suite à une stimulation par le fMLF ou par le WKYMVm.

Ces immunoempreintes ont été effectuées selon le protocole décrit dans le chapitre Matériel et méthodes (§ V-2). Les cellules de moelle osseuse de plusieurs souris ont été mélangées afin d'obtenir une quantité suffisante de protéine et de pallier les problèmes de variabilité individuelle.

II-4-A-Etude du clivage de la Caspase-9

Suite à l'activation de la voie apoptotique, le cytochrome c libéré par les mitochondries induit le clivage de la procaspase-9 en caspase-9 active (35 kDa). Cette unité active ensuite d'autres membres de la famille des caspases appelées caspases effectrices, dont la caspase-3 et la caspase-7, menant ainsi à la mort programmée de la cellule.

Nous savons que des doses chimioattractantes de fMLF et de WKYMVm ralentissent la mort cellulaire et interfèrent avec le processus de condensation de la chromatine. Nous savons

également que cette concentration de fMLF, contrairement au WKYMVm, permet de sauvegarder le potentiel membranaire mitochondrial. Le WKYMVm permet donc la survie cellulaire sans sauvegarder l'intégrité mitochondriale. Trois hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène : les signaux protecteurs générés par une stimulation WKYMVm agiraient soit

- dans la voie mitochondriale après l'étape mitochondrial c'est-à-dire après la perte du potentiel membranaire mitochondrial,
- via une autre voie comme la voie directe,
- simultanément dans ces deux voies.

Pour cerner plus précisément son action, nous avons voulu savoir si les signaux de survie émis par ce peptide avaient une influence sur le clivage de la caspase-9 (figure 110).

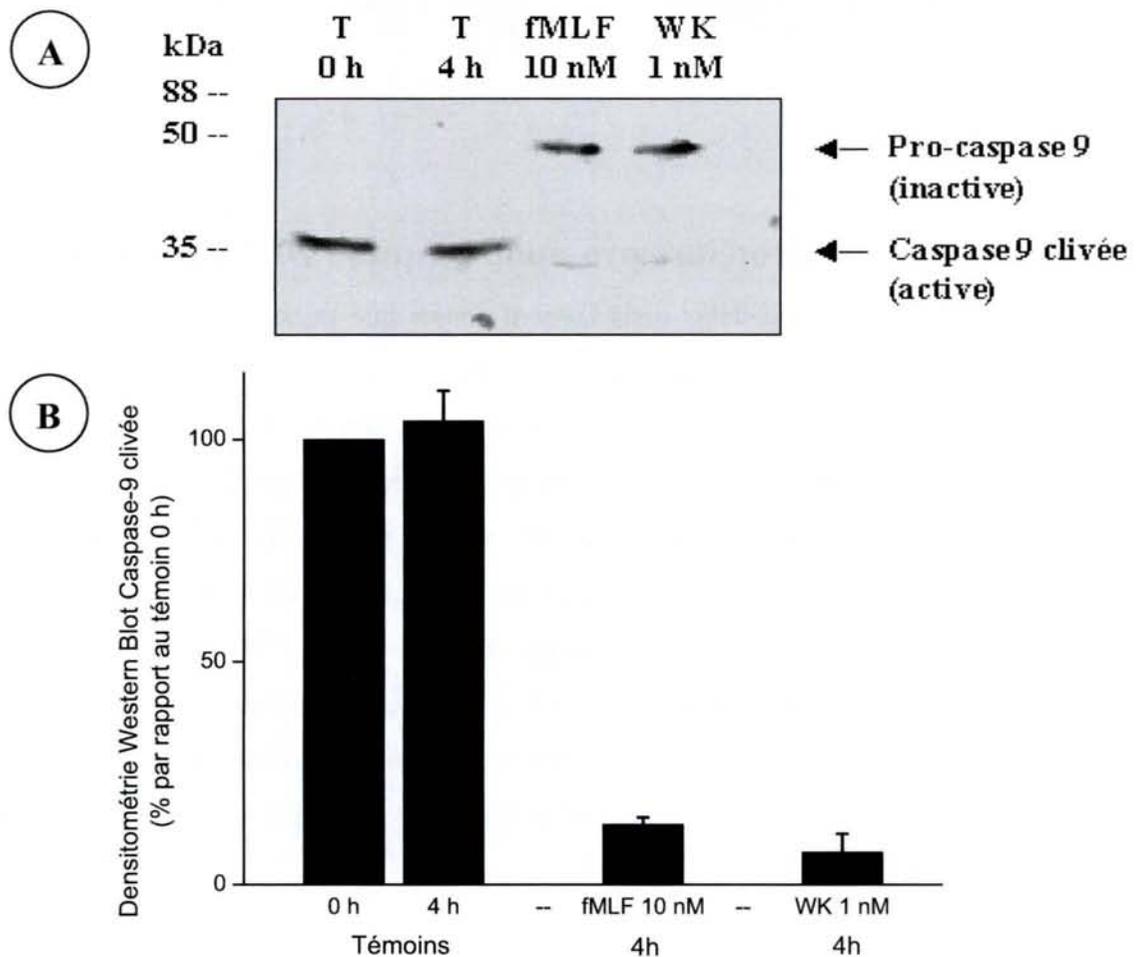


Figure 110: Etude du clivage de la protéine Caspase-9 en présence de fMLF et de WKYMVm.

A : Analyse de l'expression de la protéine Caspase-9 par western-blotting.

B : Résultat des quantifications par densitométrie. L'expression de cette protéine est exprimée en pourcentage par rapport au témoin 0 h (n = 2).

Ces immunoempreintes ont permis de mettre en évidence l'éventuel clivage de la protéine Caspase 9, caspase initiatrice de la voie mitochondriale de l'apoptose. Ce clivage traduit une entrée en apoptose des cellules via la voie mitochondriale. Comme le montre cette

figure, la caspase-9 est exprimée et clivée constitutivement chez le neutrophile et son expression n'augmente pas au cours du temps. Des concentrations chimioattractantes de fMLF et WKYMVm inhibent le clivage de la caspase-9. En sauvegardant le potentiel mitochondrial, le fMLF ne permet pas la libération de cytochrome c et inhibe, de façon indirecte, le clivage de cette caspase. Puisque le WKYMVm ne sauvegarde pas l'intégrité mitochondriale, il est probable qu'il module la voie mitochondriale de l'apoptose après l'étape mitochondriale en inhibant le clivage de la procaspase-9 en sa forme active.

II-4-B-Etude de l'expression de Bad

Nous avons poursuivi nos expériences par l'étude de l'expression d'une protéine responsable de la perte du potentiel transmembranaire : Bad (figure 111).

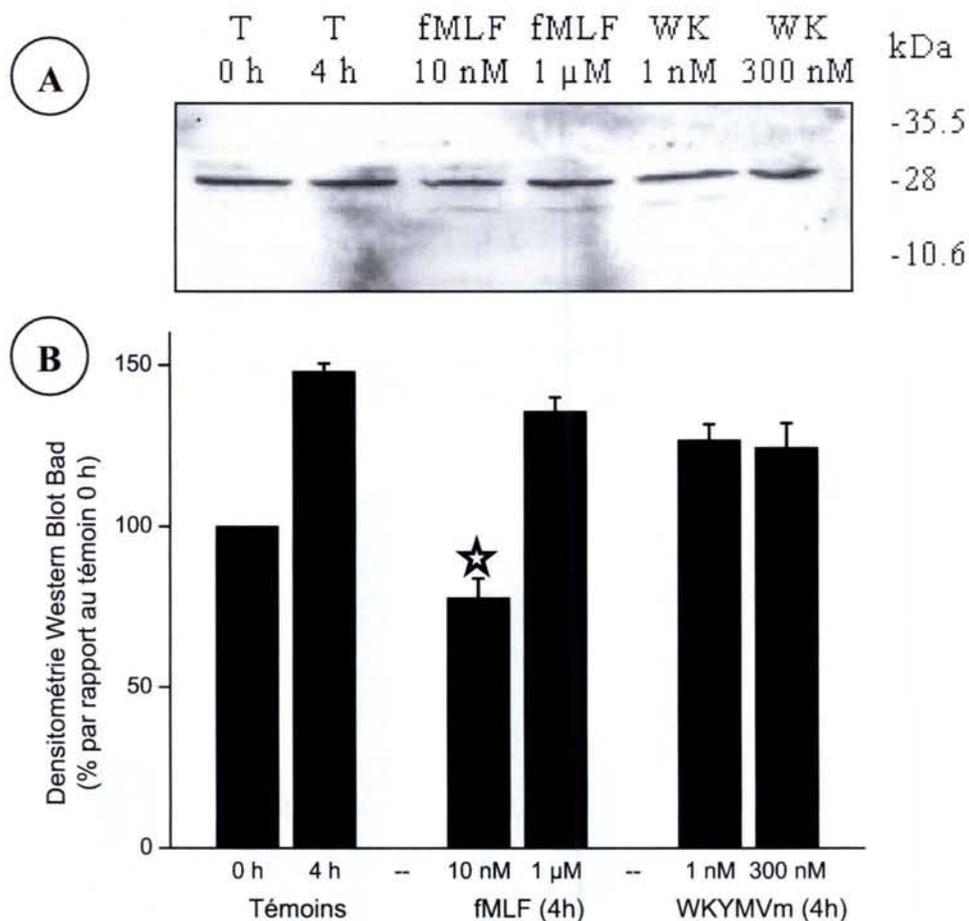


Figure 111 : Etude de l'expression de la protéine Bad en présence de fMLF et de WKYMVm.

A : Analyse de l'expression de la protéine Bad par western-blotting.

B : Résultat des quantifications par densitométrie. L'expression de Bad est exprimée en pourcentage par rapport au témoin 0 h (n = 3, p < 0,05).

La protéine Bad est exprimée constitutivement par le neutrophile et son expression augmente avec le temps ce qui implique cette protéine dans l'apoptose physiologique, via la

voie mitochondriale, du neutrophile. Les signaux apoptotiques induits par de fortes concentrations de fMLF ou de WKYMVm n'influencent pas l'expression de cette protéine.

Nous avons remarqué que les signaux de survie engendrés par des concentrations chimioattractantes de fMLF ou de WKYMVm ne transitent pas par les mêmes voies de signalisations. La figure ci-dessus confirme cette hypothèse. En effet, suite à une stimulation par 1 nM de WKYMVm, l'expression de Bad reste inchangée par rapport au "témoin 4 h". Par contre, en présence de 10 nM de fMLF, nous constatons une diminution significative de l'expression de cette protéine. Ce peptide permet de sauvegarder le potentiel mitochondrial en inhibant, entre autre, l'expression de la protéine Bad.

II-4-C-Etude de l'expression de Bax

Comme Bad, Bax est une protéine pro-apoptotique responsable de la perte du potentiel mitochondrial. Nous savons que, contrairement au WKYMVm, 10 nM de fMLF réduit l'expression de Bad. Qu'en est-il pour Bax ? (figure 112)

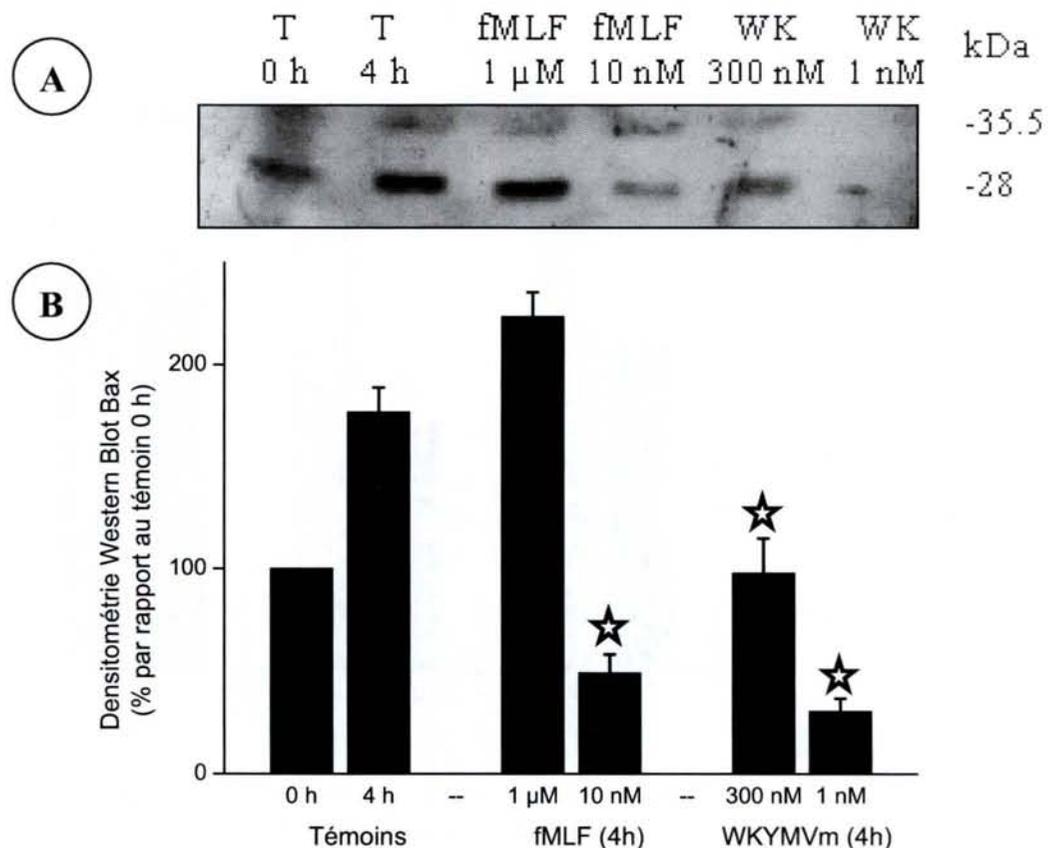


Figure 112 : Etude de l'expression de la protéine Bax en présence de fMLF et de WKYMVm.

A : Analyse de l'expression de la protéine Bax par western-blotting.

B : Résultat des quantifications par densitométrie. L'expression de Bax est exprimée en pourcentage par rapport au témoin 0 h (n = 3, p < 0,05).

Comme Bad, la protéine Bax est exprimée constitutivement par le neutrophile et son expression augmente avec le temps et la perte de viabilité cellulaire. Une concentration effectrice de fMLF n'augmente pas significativement son expression. Par contre, 10 nM de ce peptide inhibe son expression. Pour permettre à la cellule de sauvegarder son potentiel mitochondrial, le fMLF modère donc à la fois l'expression de Bad et de Bax.

Quelle que soit la concentration de WKYVM utilisé, nous pouvons remarquer que l'expression de Bax est significative réduite. Bien que ce peptide ne permette pas à la cellule de sauvegarder son potentiel membranaire, il semble qu'une stimulation par ce peptide ait une influence sur l'expression de cette protéine.

III-Identification des voies de signalisations intracellulaire impliquées dans le processus apoptotique du neutrophile murins.

Nous savons désormais que de faibles doses d'agoniste permettent de réduire la mortalité cellulaire. Nous savons également que le WKYVM et le fMLF n'interfèrent pas avec le processus apoptotique au même niveau. Notre but consistait alors à mettre en évidence les voies de signalisations qui permettent de moduler cette mortalité cellulaire.

Ces deux peptides stimulent des GPCR (récepteurs de la famille des FPR couplé à une protéine G). Nous avons précédemment étudié partiellement les voies de signalisation impliquées dans l'activation de ces récepteurs par le peptide WKYVM. Nous avons donc étudié l'implication des diverses protéines de cette voie de signalisation dans le processus apoptotiques du neutrophile. Nous nous sommes principalement intéressé aux protéines kinases PKA et p44/42 MAPK ainsi qu'à la lipide kinase PI3-kinase. Pour cela, nous avons utilisé des inhibiteurs dont nous avons testés l'efficacité dans le chapitre "Résultats, 2^{ème} partie", à savoir l'H-89 (inhibiteur de la PKA), le PD-98059 (inhibiteur de la p44/42 MAPK) ainsi que le Ly-294002 et la wortmannine (inhibiteurs de la PI3-K).

III-1-Effet des inhibiteurs seuls sur la viabilité des neutrophiles

Dans un premier temps, nous avons testé l'effet de ces inhibiteurs seuls sur la viabilité cellulaire afin d'évaluer leur éventuelle cytotoxicité.

III-1-A-Effet des inhibiteurs de la voie PI3-K sur la viabilité des neutrophiles

Pour étudier la transduction du signal via la PI3-kinase, nous avons testé deux inhibiteurs de cette protéine : la wortmannine (figure 113) et le LY-294002 (figure 114).

III-1-A-a-Effet de la wortmannine seule sur la viabilité des neutrophiles

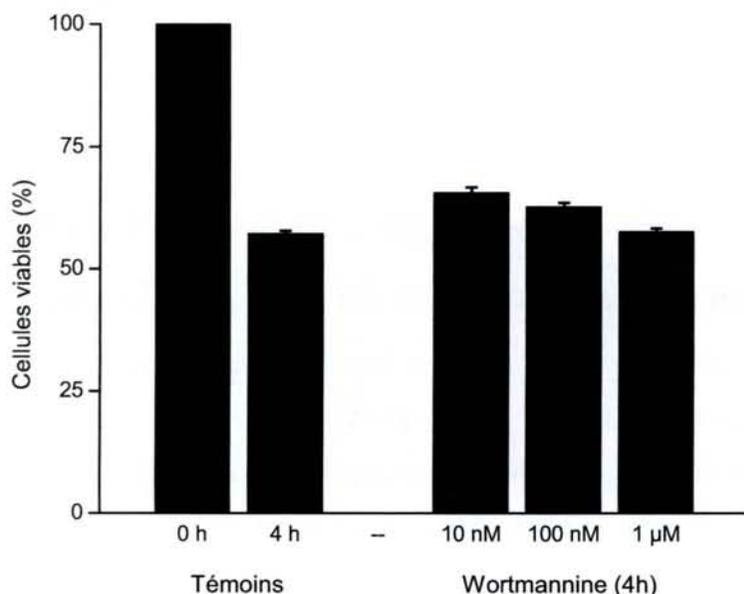


Figure 113 : Etude de la viabilité des neutrophiles de moelle en présence de différentes concentrations de wortmannine. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules viables par rapport au nombre de cellulesensemencées selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen (n = 6).

Cette figure nous montre que quelle que soit sa concentration, la wortmannine n'a aucun effet, par elle-même, sur la viabilité cellulaire.

III-1-A-b-Effet du LY-294002 seul sur la viabilité des neutrophiles

Nous avons complété cette expérience en utilisant un autre inhibiteur de la PI3-kinase structurellement différent de la wortmannine : le LY-294002 (figure 114).

Comme pour la wortmannine, quelle que soit la concentration de LY294002 testée, nous n'avons constaté aucune modification de la viabilité cellulaire.

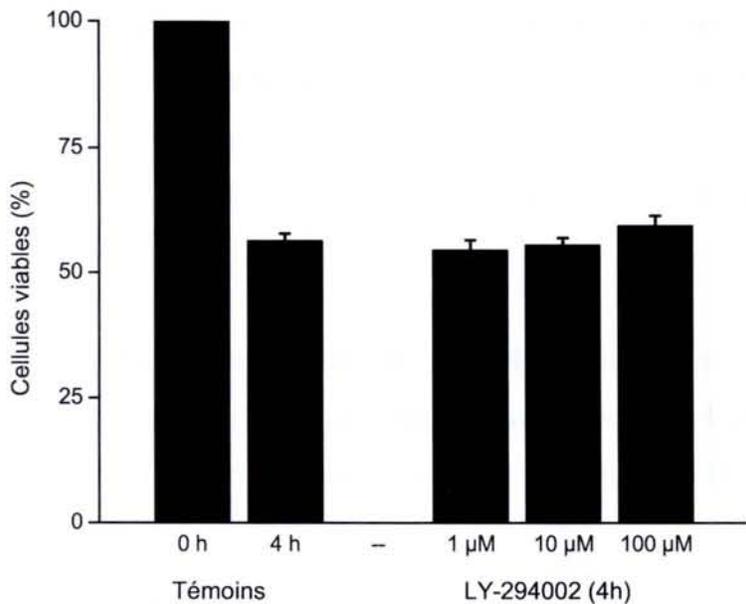


Figure 114 : Etude de la viabilité des neutrophiles de moelle en présence de différentes concentrations de LY294002. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules viables par rapport au nombre de cellulesensemencées selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen (n = 5).

III-1-B-Effet des inhibiteurs des voies p44/42 MAPK et PKA sur la viabilité des neutrophiles

III-1-B-a-Effet de l'inhibition de la voie p44/42 MAPK sur la viabilité des neutrophiles

Après la voie PI3-kinase, nos travaux ont ensuite porté sur la voie de la MAPK à l'aide d'un inhibiteur de cette protéine : le PD-98059. Pour cela une gamme de cet inhibiteur a été testée sur la viabilité cellulaire du neutrophile (figure 115).

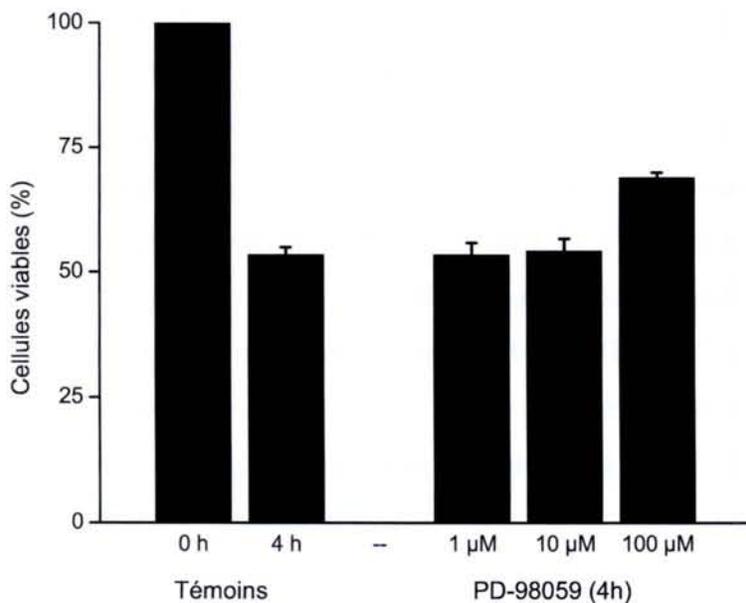


Figure 115 : Etude de la viabilité des neutrophiles de moelle en présence de différentes concentrations de PD-98059. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules viables par rapport au nombre de cellulesensemencées selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen (n = 4).

D'après cette figure, nous pouvons constater qu'une inhibition de la MAPK ne modifie pas la durée de vie des neutrophiles. Toutefois, bien que cette différence ne soit pas significative, 100 µM de PD-98059 montre une tendance à augmenter la viabilité cellulaire.

Cette tendance pourrait s'expliquer par l'action non spécifique de cet inhibiteur sur d'autres protéines que la MAPK, impliquées dans la mort cellulaire spontanée. En effet, pour beaucoup d'analyses, la valeur d'Ic₅₀ du PD-98059 se situe dans une gamme allant de 1 à 20 μM (Alessi *et al.*, 1995; Dudley *et al.*, 1995; Pang *et al.*, 1995; Dumont *et al.*, 1998).

III-1-B-a-Effet de l'inhibition de la voie PKA sur la viabilité des neutrophiles

Nous avons également étudié l'implication de la protéine PKA sur la viabilité cellulaire à l'aide d'une gamme d'un inhibiteur spécifique de cette protéine : le H-89 (figure 116).

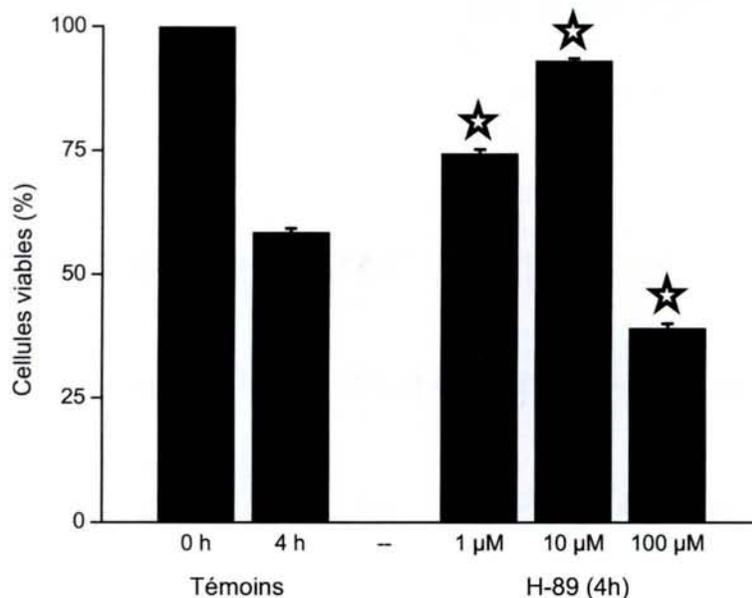


Figure 116 : Etude de la viabilité des neutrophiles de moelle en présence de différentes concentrations de H-89. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules viables par rapport au nombre de cellules ensemencées selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen (n = 5, p < 0,05).

A travers cette figure, nous pouvons remarquer que le H-89 module la viabilité cellulaire différemment selon la concentration à laquelle il est utilisé. En effet, à 1 ou 10 μM , cet inhibiteur permet la survie des cellules. Tout se passe comme si, à ces concentrations, le H-89 en inhibant la PKA, inhibait l'apoptose passive des neutrophiles. Il semblerait donc que la PKA soit active constitutivement et joue un rôle dans la mortalité spontanée de ces cellules. L'inhibition de cette protéine ralentirait la mort cellulaire.

A plus forte concentration (100 μM), le H-89 montre un rôle opposé et réduit la viabilité cellulaire. A cette concentration, il est fort possible que cet inhibiteur n'agisse plus spécifiquement sur la PKA mais aussi probablement sur d'autres protéines intracellulaires importantes pour la survie cellulaire.

III-2-Effet des agonistes en présence d'inhibiteurs sur la viabilité des neutrophiles

A l'aide de ces inhibiteurs, nous avons voulu étudier les différentes voies de signalisations pouvant être impliquées dans le phénomène d'apoptose retardée que nous avons mis en évidence avec l'utilisation de faibles doses d'agonistes.

Nous avons donc étudié l'effet de ces inhibiteurs sur la viabilité cellulaire suite à une stimulation par le fMLF, le WKYMVm ou le PMA.

En accord avec la littérature existante pour les neutrophiles humains et à partir de nos résultats, nous avons choisi de travailler avec 1 μ M de wortmannine, 10 μ M de LY294002, 10 μ M de PD-98059 ou 10 μ M de H-89 (Cowburn *et al.*, 2002; Perianayagam *et al.*, 2002).

III-2-A-Etude des voies de signalisations impliquées dans la viabilité des neutrophiles suite à une stimulation fMLF

Nous savons que 10 nM de fMLF induit une augmentation de la durée de vie des cellules. Lors d'une stimulation par une concentration chimioattractante de fMLF, les protéines PI3-kinase, PKA et MAPK sont-elles impliquées dans ce signal de survie ? (figure 117)

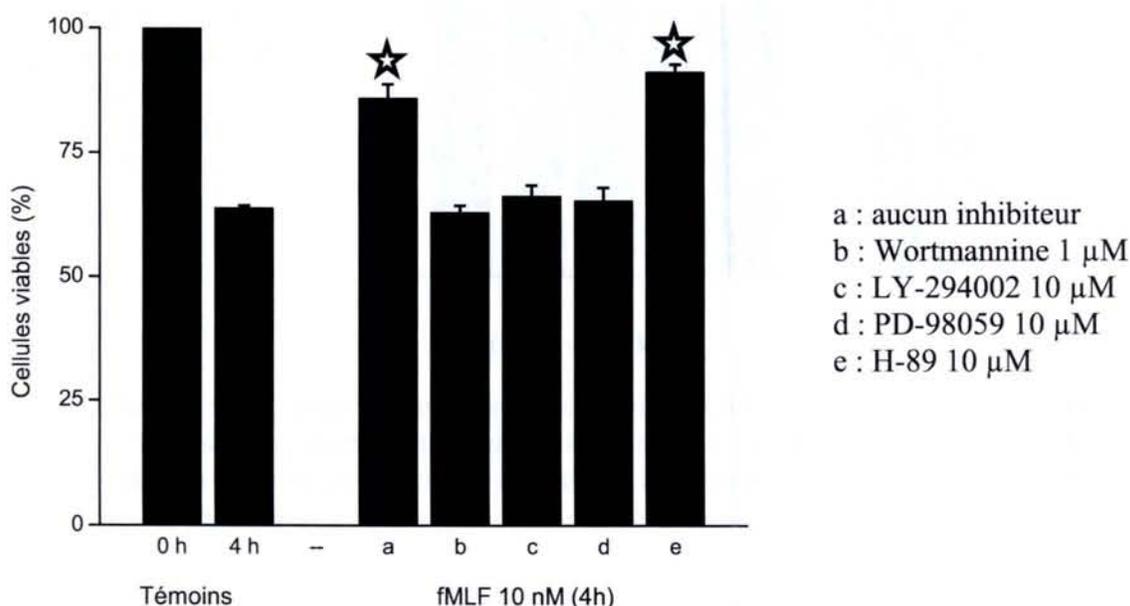


Figure 117 : Etude de la viabilité des neutrophiles de moelle suite à une stimulation par 10 nM de fMLF en présence de différents inhibiteurs des voies de signalisation. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules viables par rapport au nombre de cellules ensemencées selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen (n = 3, p < 0,05).

Au vu de ce résultat, nous constatons que la présence de wortmannine, de LY-294002 ou de PD-98059 ramène la viabilité cellulaire à son niveau témoin. Les signaux de survie émis par le fMLF semblent contrecarrés par l'inactivation des protéines PI3-kinase et MAPK. Ces protéines, activés suite à la stimulation fMLF, semblent donc impliqués dans la transduction du signal permettant de retarder l'apoptose des neutrophiles.

Par contre, nous remarquons que les cellules mises en présence de H-89 et de fMLF survivent aussi longtemps que celles soumis au fMLF seul. Les signaux de survie générés par une stimulation fMLF ne semblent donc pas nécessiter l'activation de la voie PKA.

III-2-B-Etude des voies de signalisations impliquées dans la viabilité des neutrophiles suite à une stimulation WKYMVm

La même expérience a été menée en stimulant les cellules par 1 nM de WKYMVm (figure 118).

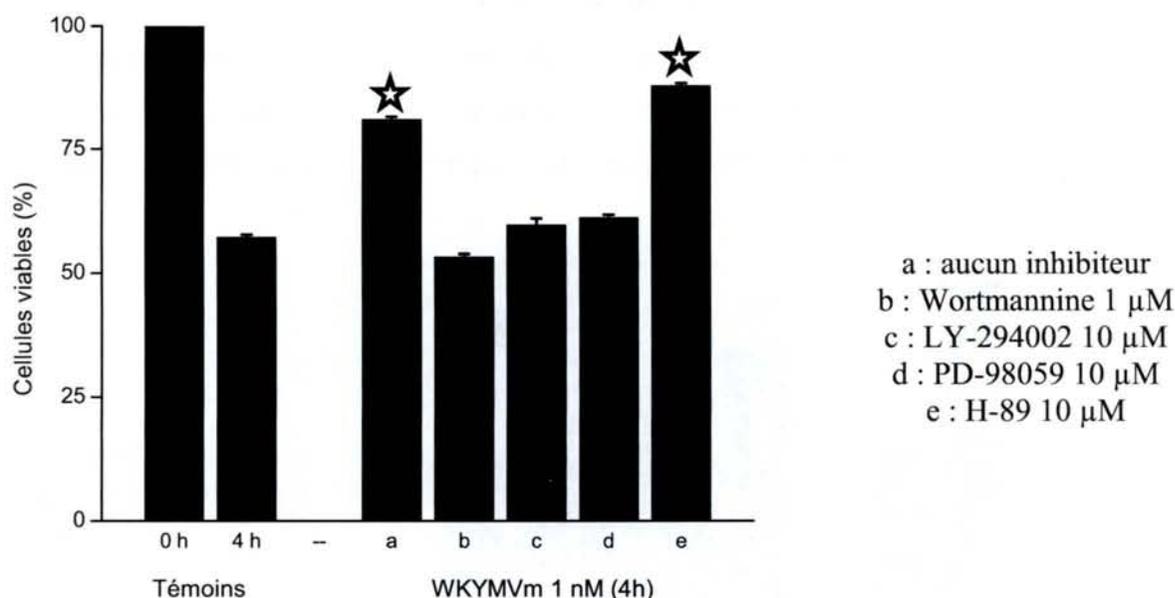


Figure 118 : Etude de la viabilité des neutrophiles de moelle suite à une stimulation par 1 nM de WKYMVm en présence de différents inhibiteurs des voies de signalisation. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules viables par rapport au nombre de cellules ensemencées selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n \geq 4$, $p < 0,05$).

Cette figure confirme les résultats précédents. Les signaux de survie dus à une stimulation par une concentration chimioattractante de WKYMVm se propagent par les protéines PI3-kinase et MAPK mais ne semblent pas nécessiter l'activation de la voie PKA.

Contrairement à la PKA, les protéines PI3-kinase et p44/42 MAPK semblent être activées par les signaux de survie et ainsi être associées à la transduction du signal permettant de retarder l'apoptose des neutrophiles.

III-2-C-Etude des voies de signalisations impliquées dans la viabilité des neutrophiles suite à une stimulation PMA

Les protéines impliquées dans la transduction des signaux de survie induits par une stimulation par ces peptides sont-elles également mises en jeu lors d'une stimulation par le PMA ? (figure 119)

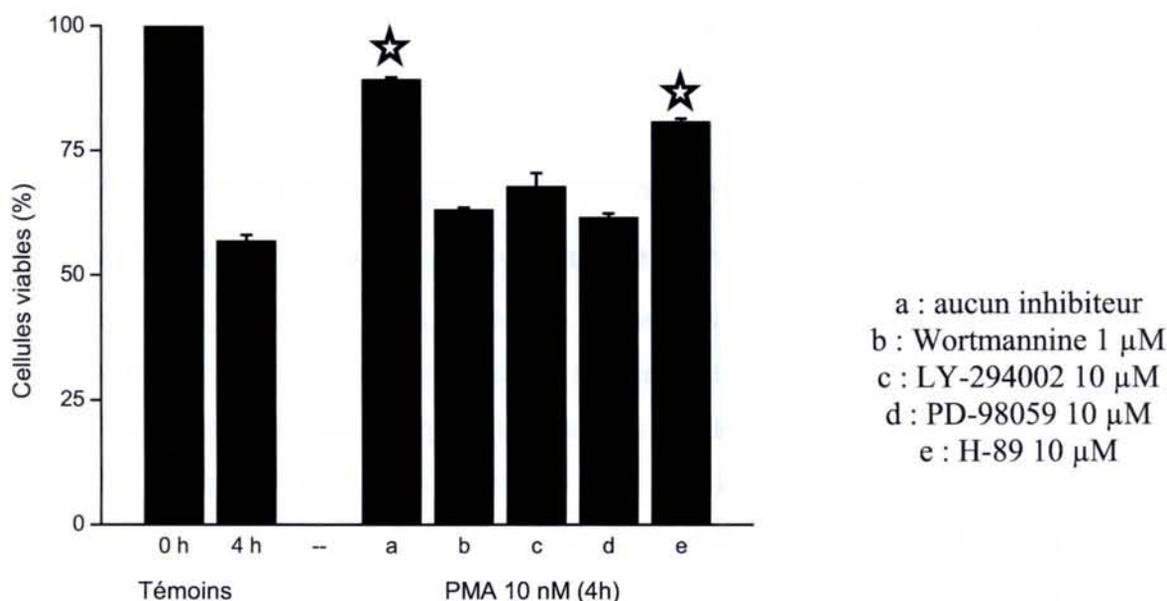


Figure 119 : Etude de la viabilité des neutrophiles de suite à une stimulation par 10 nM de PMA en présence de différents inhibiteurs des voies de signalisation. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules viables par rapport au nombre de cellulesensemencées selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n \geq 4$, $p < 0,05$).

En ce qui concerne la PI3-kinase et la MAPK, nous observons les mêmes résultats que précédemment. Les signaux de survie dus à une stimulation 10 nM de cet ester de phorbol transisent eux aussi par ces protéines.

Par contre, nous observons une légère différence sur les résultats obtenus en présence de H-89. Nous constatons sur la figure ci-dessus que cette viabilité est inférieure à celle observée en présence de 10 nM de PMA. La présence de PMA dans le milieu réactionnel semble réduire l'efficacité du H-89 ou inversement, la présence de H-89 dans le milieu réactionnel semble réduire l'efficacité du PMA.

Deux hypothèses peuvent donc être posées :

- soit le PMA contrecarrerait les effets du H-89 en activant partiellement la PKA via la PKC. La PKA étant moins fonctionnelle, inhibée par la présence de H-89, les signaux de survie dus à une stimulation par 10 nM de PMA se trouverait également modulés.
- soit le H-89 inhibe de façon non spécifique et partiellement, la PKC.

III-3-Dénombrement des noyaux apoptotiques

Nous avons porté la suite de notre étude sur l'influence des protéines PI3-kinase et MAPK dans le processus apoptotiques. Le but était de déterminer si, suite à une stimulation par le fMLF ou le WKYMVm, l'inactivation de ces protéines inhibait le phénomène de condensation chromatinienne. Ces expériences confirmeraient ainsi la position de ces protéines dans la cascade de signalisation aboutissant à l'apoptose cellulaire.

III-3-A-Etude des voies de signalisations impliquées dans les modifications de la morphologie nucléaire des neutrophiles suite à une stimulation fMLF

Nous avons précédemment démontré que les signaux de survie générés par 10 nM de fMLF augmentent la viabilité cellulaire et inhibent la condensation chromatinienne. Nous savons également que ces signaux transitent via les protéines PI3-kinase, MAPK et PKA. Concernant la morphologie nucléaire, quel est le rôle de ces voies de signalisation mises en jeu dans l'effet protecteur du fMLF ? (figure 120)

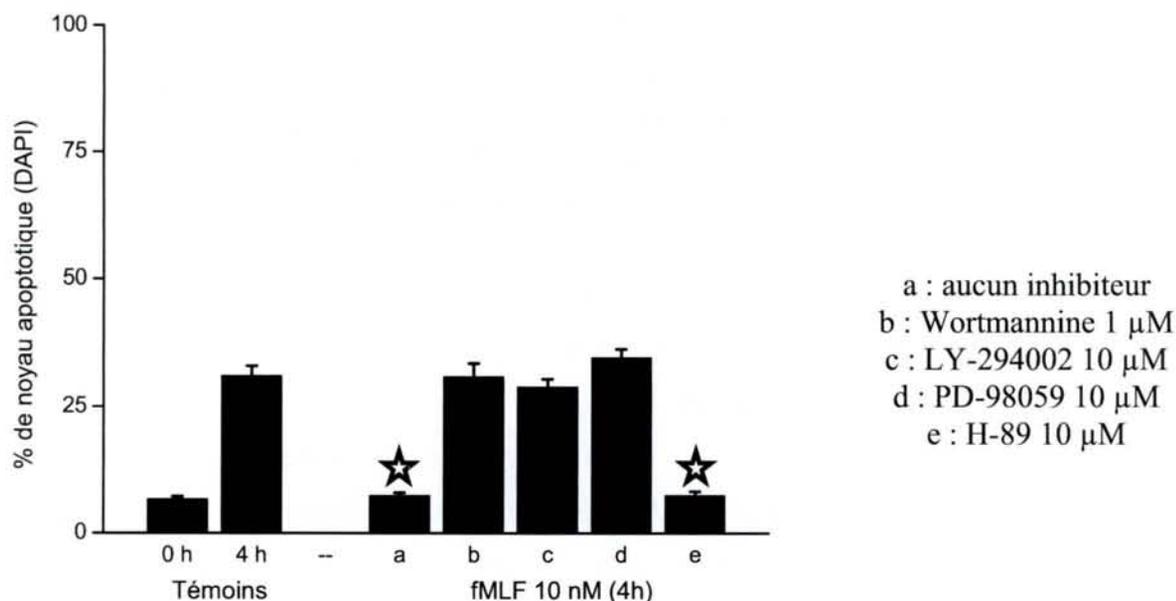


Figure 120 : Détermination du nombre de cellules apoptotiques suite à une stimulation par 10 nM de fMLF en présence de différents inhibiteurs des voies de signalisation. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules apoptotiques par rapport au nombre total de cellules selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n = 10$, $p < 0,05$).

Comme le montre cette figure, la présence d'inhibiteurs de la PI3-kinase et de la MAPK ne permet plus aux cellules de sauvegarder leur morphologie nucléaire malgré la présence de fMLF. Dans la cascade de transduction des signaux de survie, ces deux protéines interviennent avant l'étape de condensation chromatinienne.

En présence de H-89 et de fMLF ou de fMLF seul, le nombre de cellules présentant ce caractère apoptotique est le même. Soit la voie PKA n'est pas impliquée dans la transduction des signaux de survie lors d'une stimulation fMLF (ce qui confirmerait les résultats précédents), soit l'inactivation de la PKA suffit à inhiber ce phénomène de condensation chromatinienne.

III-3-B-Etude des voies de signalisations impliquées dans les modifications de la morphologie nucléaire des neutrophiles suite à une stimulation WKYMVm

Comme le fMLF, le WKYMVm augmente la viabilité cellulaire et agit avant que l'étape de condensation chromatinienne ne soit engagée. Ces signaux transitent via la PI3-kinase et la MAPK. Quel est l'impact de ces signaux sur la condensation chromatinienne ? (figure 121)

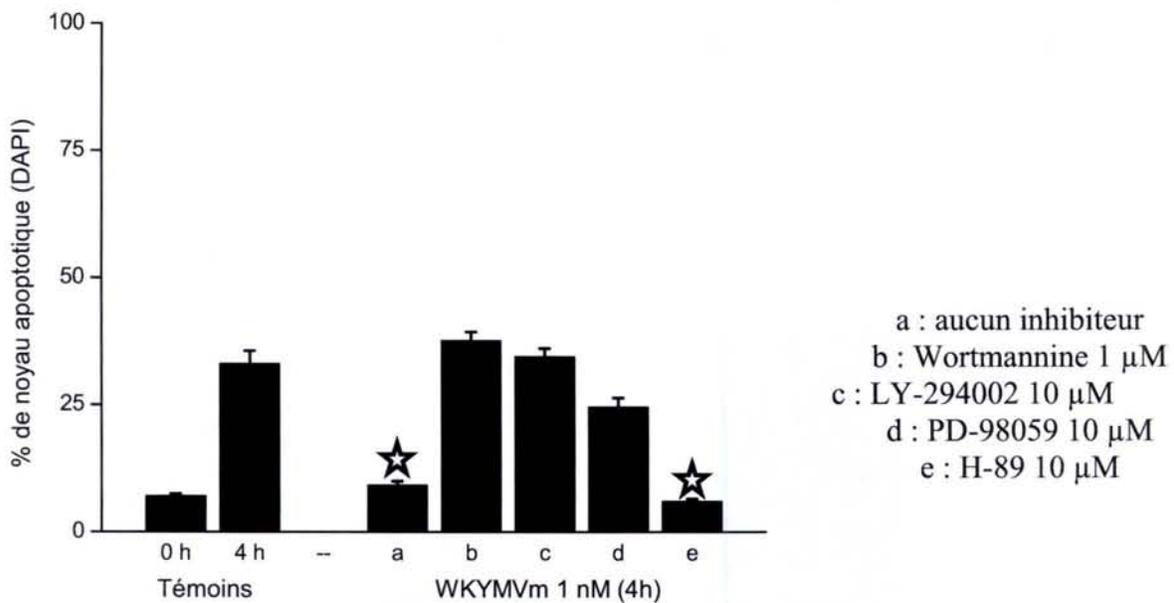


Figure 121 : Détermination du nombre de cellules apoptotiques suite à une stimulation par 1 nM de WKYMVm en présence de différents inhibiteurs des voies de signalisation. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules apoptotiques par rapport au nombre total de cellules selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n \geq 8$, $p < 0,05$).

Comme pour le fMLF, nous pouvons remarquer que l'inactivation de la PI3-kinase et de la MAPK ne permet plus de transduire les signaux de survie. Le processus d'apoptose passive se poursuit et la condensation chromatinienne apparaît. De nouveau, nous ne pouvons conclure quant à l'importance de la voie PKA dans la transduction de ces signaux de survie.

III-4-Dénombrément des cellules perdant leur potentiel mitochondriale membranaire en présence d'inhibiteurs

Nous avons mis en évidence une différence entre les signaux de survie provenant d'une stimulation fMLF et ceux provenant d'une stimulation WKYMVm. En effet, contrairement au WKYMVm, le fMLF agit sur les cellules avant la perte de potentiel transmembranaire mitochondrial tandis que le WKYMVm ne préserve pas les cellules de cette perte. Nous avons alors voulu tester l'impact de ces inhibiteurs des voies de signalisation sur ce processus.

III-4-A-Importance de la voie PKA dans la perte du potentiel membranaire mitochondrial des neutrophiles

Dans un premier temps, nous avons cherché à comprendre l'importance de la PKA dans ce processus apoptotique. Nous savons que son inhibition par le H-89 augmente la viabilité cellulaire. Nous aimerions maintenant situer plus précisément son action (figure 122).

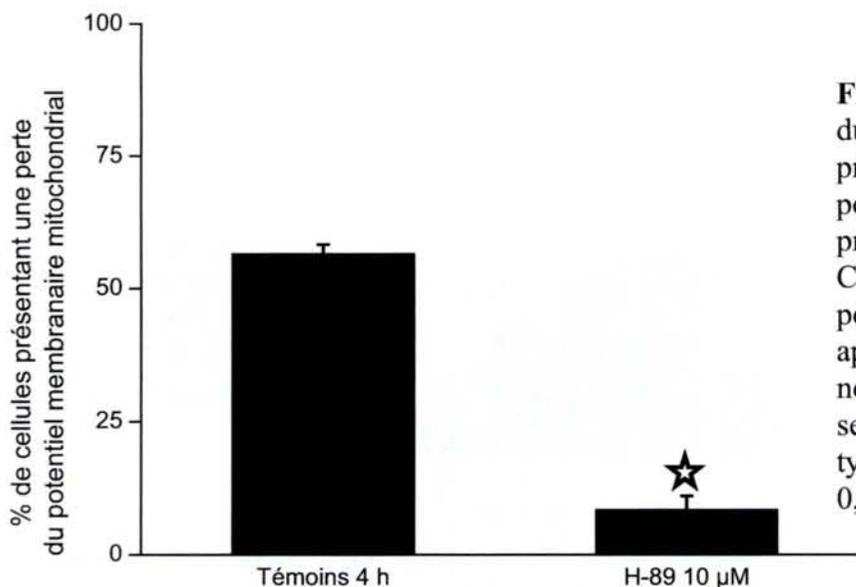


Figure 122: Détermination du nombre de cellules présentant une perte du potentiel mitochondrial en présence de 10 µM de H-89. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules apoptotiques par rapport au nombre total de cellules selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n = 13$, $p < 0,05$).

En présence de H-89, nous pouvons remarquer que le potentiel mitochondrial de nos cellules est sauvé. La PKA semble donc impliquée dans les stades précoces de l'apoptose.

III-4-B-Etude des voies de signalisations impliquées dans la perte du potentiel membranaire mitochondrial des neutrophiles suite à une stimulation fMLF

Une stimulation par 10 nM de fMLF inhibe la condensation chromatiniennne et ces signaux transitent via la PI3-kinase et la MAPK mais pas via la PKA. Nous savons également que cette concentration permet de sauvegarder le potentiel membranaire mitochondrial. Le but de cette expérience consiste maintenant à déterminer plus précisément à quel stade du processus apoptotiques interviennent ces kinases (figure 123)

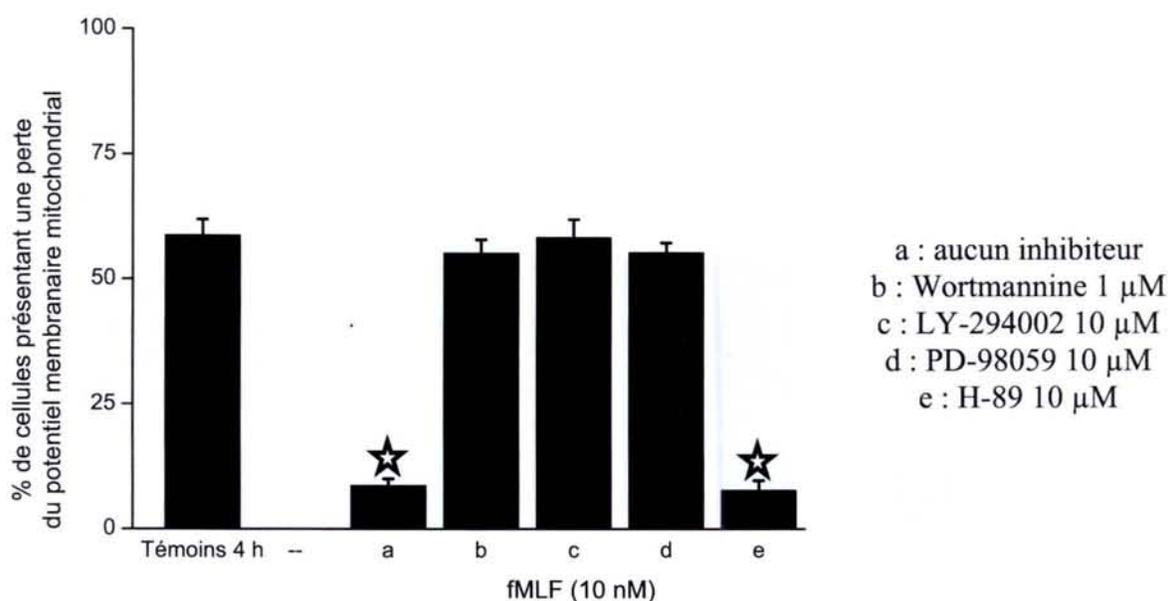


Figure 123: Détermination du nombre de cellules présentant une perte du potentiel mitochondrial suite à une stimulation par 10 nM de fMLF en présence de différents inhibiteurs des voies de signalisation. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules apoptotiques par rapport au nombre total de cellules selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n = 13$, $p < 0,05$).

D'après cette figure, nous pouvons remarquer qu'une inhibition des voies PI3-kinase et MAPK ne permet plus de sauvegarder le potentiel membranaire mitochondrial par le fMLF. Ces kinases semblent agir sur les protéines impliquées dans la voie mitochondriale. Inhibées, ces kinases ne permettent plus d'inactiver des protéines pro-apoptotiques de la voie mitochondriale telles que Bax ou Bad. Le processus de suicide cellulaire est enclenché, les cellules présentent des caractères morphologiques de l'apoptose et meurent.

En présence de H-89, les cellules ne perdent pas leur potentiel mitochondrial. Comme nous l'avons auparavant expliqué, l'inhibition de la PKA par elle-même, protège les cellules de la perte de potentiel membranaire mitochondrial.

III-4-C-Etude des voies de signalisations impliquées dans la perte du potentiel membranaire mitochondrial des neutrophiles suite à une stimulation WKYMVm

Une stimulation par 1 nM de WKYMVm inhibe la condensation chromatinienne et ces signaux transitent via la PI3-kinase et la MAPK mais pas via la PKA. Cependant, cette stimulation ne permet pas de sauvegarder le potentiel membranaire mitochondrial alors qu'elle aboutit à une inhibition du clivage de la pro-caspase-9. Son action est donc plus tardive (figure 124).

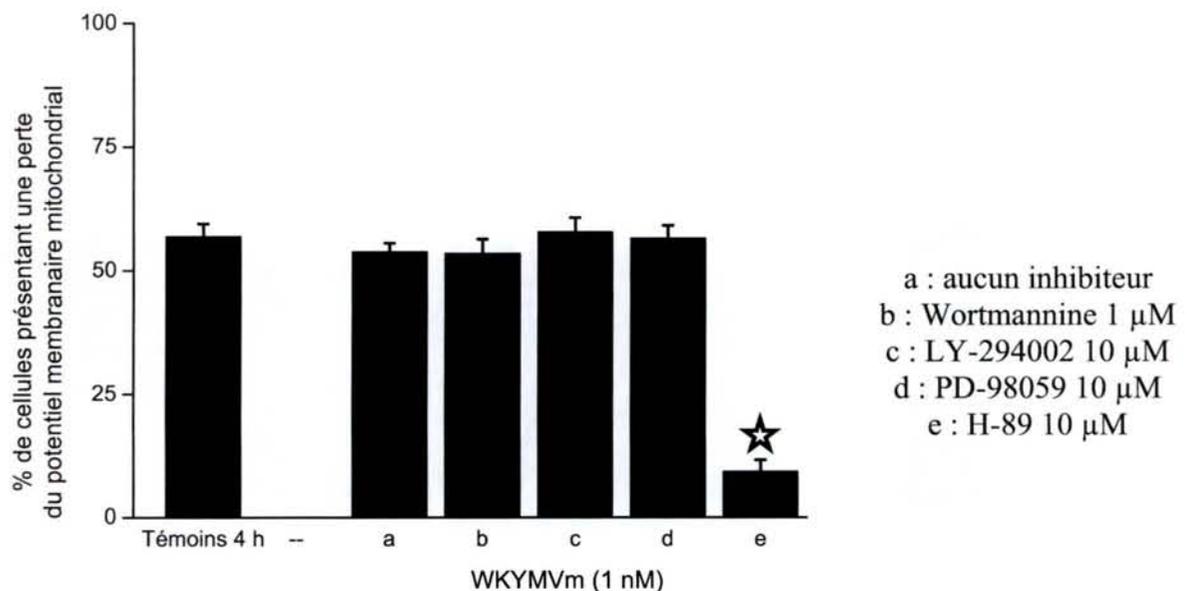


Figure 124: Détermination du nombre de cellules présentant une perte du potentiel mitochondrial suite à une stimulation par 1 nM de WKYMVm en présence de différents inhibiteurs des voies de signalisation. Chaque point est exprimé en pourcentage de cellules apoptotiques par rapport au nombre total de cellules selon leur moyenne \pm l'écart-type moyen ($n = 13$, $p < 0,05$).

Comme attendu, les inhibiteurs des voies PI3-kinase et MAPK n'ont aucun impact sur la sauvegarde du potentiel membranaire mitochondrial. Ces résultats confirment ceux obtenus auparavant en présence de WKYMVm seul. Le seul effet remarqué concerne le H-89 et semble être dû à la seule inhibition de la PKA.

III-5-Etude des voies de signalisations impliquées dans le processus apoptotique par immunoempreinte

Nous avons montré qu'une stimulation par 10 nM de fMLF permet d'inhiber les protéines pro-apoptotiques de la voie mitochondriale telle que Bad, Bax et la caspase-9. De la même façon, nous savons qu'une stimulation par 1 nM de WKYMVm inhibe le clivage de la

pro-caspase-9. Nous savons également que l'effet de ces deux peptides chimioattractants transiente par les voies PI3-kinase et MAPK. Nous avons choisi d'analyser la voie PI3-kinase en étudiant la phosphorylation de la protéine Akt.

La protéine Akt peut être activée, via la voie PI3-kinase, par phosphorylation en deux points de sa séquence (Ser473 ou Thr308). Les fonctions d'Akt dépendent de la position de la phosphorylation. Cette protéine est notamment capable de phosphoryler la pro-forme de la caspase-9 et inhiber ainsi son clivage. Nos travaux ont porté sur l'étude de la phosphorylation du site Ser473 (figure 125).

Ces immunoempreintes ont été effectuées selon le protocole décrit dans le chapitre Matériel et méthodes (§ V-2). Les cellules de moelle osseuse de plusieurs souris ont été mélangées afin d'obtenir une quantité suffisante de protéine et de pallier les problèmes de variabilité individuelle.

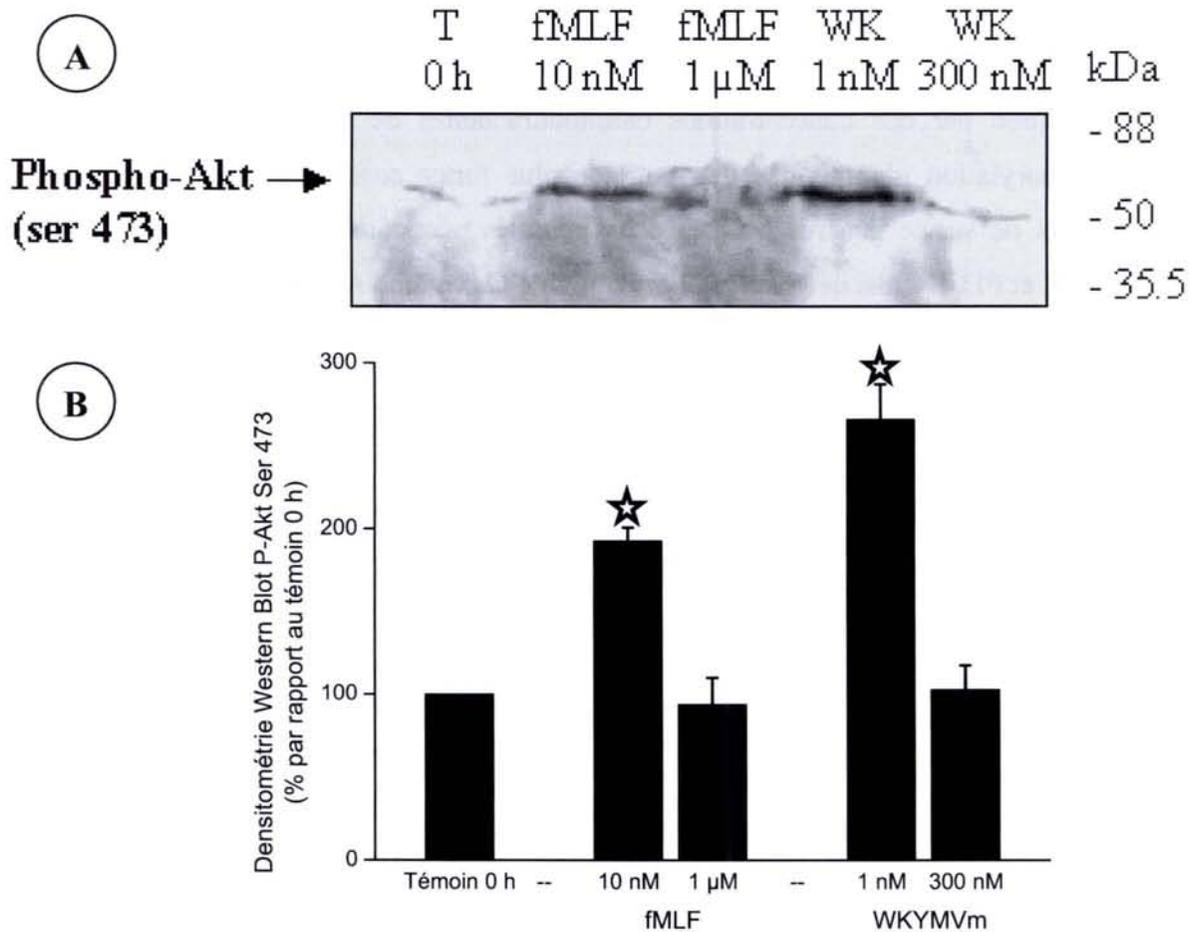


Figure 125 : Etude de la phosphorylation de la protéine Akt (Ser473) en présence de fMLF et de WKYMVm.

A : Analyse de l'expression de la protéine Akt (Ser473) par western-blotting.

B : Résultat des quantifications par densitométrie. La quantité de protéine Akt (Ser473) phosphorylée est exprimée en pourcentage par rapport au témoin 0 h (n = 3, p < 0,05).

Cette figure nous montre qu'une faible phosphorylation de Akt (Ser473) apparaît dès la fin de la purification cellulaire. De fortes doses de fMLF ou de WKYMVm ne modifient pas la quantité de protéine Akt (Ser473) phosphorylée. A ces concentrations, bien qu'activée, la PI3-kinase n'induit pas une plus grande phosphorylation de protéine Akt (Ser473).

Par contre, pour des concentrations de fMLF et de WKYMVm chimioattractantes, nous remarquons une augmentation de la quantité de protéine Akt (Ser473) phosphorylée. Cette augmentation est d'un facteur 2 pour le fMLF (10 nM) et d'un facteur 2,6 pour le WKYMVm (1 nM). Contrairement aux fortes concentrations, les faibles doses de fMLF et de WKYMVm semblent activer la PI3-kinase de façon telle que celle-ci induise la phosphorylation de plus de protéine Akt sur la position 473.

Nous savons que Akt est massivement phosphorylée en position Ser473 suite à une stimulation par des concentrations chimioattractantes de fMLF et de WKYMVm. Cette phosphorylation n'aurait pas lieu pour de plus fortes concentrations de ces peptides. Les signaux de survie générés par ces deux peptides nécessitent donc l'intervention des voies MAPK et PI3-K ainsi que la phosphorylation de la protéine Akt en position 273.

Discussion

I-Les neutrophiles murins meurent par apoptose

I-1-Les neutrophiles sanguins présentent une viabilité réduite

Nous avons démontré précédemment que la moelle osseuse de souris semble être un réservoir de neutrophiles morphologiquement et fonctionnellement matures non seulement pour remplacer les neutrophiles périphériques mais aussi, peut-être, pour accroître leur nombre lors d'une demande accrue de l'organisme. Nous savons désormais que le temps de demi-vie des neutrophiles de la moelle osseuse ($13,7 \pm 1,9$ h) est deux fois supérieur à celui des cellules du sang périphérique ($6,5 \pm 0,4$ h). Libérés dans le flux sanguin, des neutrophiles présentant une plus longue durée de vie pourrait donc être une manière efficace d'augmenter le nombre de neutrophiles circulants. Il est cependant possible que les temps de demi-vie de ces deux populations cellulaires soient plus importants dans des conditions trophiques naturelles, c'est-à-dire en présence entre autres de facteurs de croissances tels que ceux présents dans la moelle osseuse.

La littérature suggère que les neutrophiles meurent par apoptose et que leur durée de vie dépend de l'équilibre entre les protéines pro- et anti-apoptotique et que cet équilibre serait sous l'influence de signaux extracellulaires (Akgul *et al.*, 2001). Le fait que les neutrophiles de moelle osseuse présentent un plus longue demi-vie conforte l'idée que les neutrophiles reçoivent des signaux anti-apoptotiques dans la moelle. Ces signaux seraient moins présents voir même absents dans le flux sanguin tel que le G-CSF ou le GM-CSF bien que le GM-CSF ait un effet moins prononcé sur la granulopoïèse des neutrophiles de souris que le G-CSF (Lord *et al.*, 1991).

Le temps de demi-vie des neutrophiles murins étant relativement court dans le sang circulant, l'ampleur de leur remplacement journalier est considérable (Babior et Golde, 2001). En effet, une souris d'une masse corporelle de 25 g possède environ 50×10^6 neutrophiles mûres dans sa moelle osseuse et $2,3 \times 10^6$ neutrophiles dans son sang (volume approximatif de 1,9 ml) (Chervenick *et al.*, 1968). Les neutrophiles sanguins ayant une demi-vie de 6 h, la moelle osseuse doit produire quotidiennement environ 10×10^6 neutrophiles afin de maintenir leur concentration sanguine. Dans des conditions normales, la réserve médullaire murine correspond à 5 jours de production de neutrophile, ceci sans prendre en compte les demandes accrues lors d'infection. Cette réserve pourrait également servir tel un amortisseur, si un

incident venait à se produire lors de la granulopoïèse des neutrophiles (10 à 14 jours chez l'Homme (Cowland et Borregaard, 1999)).

Le temps de demi-vie des neutrophiles sanguins humains en culture est de 24 h donc sensiblement plus long que celui de la souris (Savill *et al.*, 1989) ce qui expliquerait la plus forte proportion de neutrophiles circulants (5-25% selon la souche de souris contre 60 % des leucocytes humains pour le même pourcentage de globules blancs totaux) et le fait que, comparativement à la souris, l'Homme dispose d'une plus importante réserve médullaire.

La souris posséderait cependant une très importante réserve médullaire de neutrophiles fonctionnellement matures car la durée de vie de ces cellules dans le sang circulant est très brève (environ 6 h). La maturation de ces cellules dans la moelle osseuse, dans des conditions de facteurs trophiques idéales, pourrait être une "gestion" du temps de vie de ces cellules.

Chez le rat comme chez l'Homme, des études ont suggéré que la moelle pourrait jouer un rôle dans la séquestration des neutrophiles matures circulants (Saverymuttu *et al.*, 1985; Lovas *et al.*, 1996). Il est communément admis que la moelle osseuse joue un rôle important dans l'élimination des érythroblastes (De Maria *et al.*, 1999) et des lymphocytes B (Osmond *et al.*, 1994) au cours de l'hématopoïèse. Elle serait également un lieu de stockage et d'éventuelle recirculation des lymphocytes B (Nitschke *et al.*, 1999) mais de rétention et d'élimination des érythrocytes (Hudson et Shortland, 1980).

Des travaux chez les souris suggèrent qu'une fraction substantielle des neutrophiles seraient détruits dans la moelle (Metcalf *et al.*, 1995) au cours de la granulopoïèse, et qu'un grand nombre de neutrophiles matures circulants seraient détruits dans la moelle murine au cours du développement fœtal (Sasaki *et al.*, 1995). Ces observations suggèrent donc que la moelle osseuse puisse participer plus activement à la régulation des neutrophiles circulants que ce qui l'a été suggéré jusqu'à présent. La moelle osseuse est non seulement capable d'approvisionner l'organisme en neutrophiles matures mais elle peut aussi répondre à des conditions inflammatoires en libérant des neutrophiles immatures (Suratt *et al.*, 2001).

Alors que le déplacement des neutrophiles vers les autres sites d'élimination que sont le foie, la rate et les sites d'inflammation locaux soit connu pour être unidirectionnel, il semblerait que la moelle osseuse puisse séquestrer de façon réversible les neutrophiles circulants mais aussi participer à l'élimination des neutrophiles sénescents. En effet, des neutrophiles de moelle osseuse purifiés puis injectés dans une souris se retrouvent séquestrés dans la moelle osseuse puis mobilisés vers un site inflammatoire (Suratt *et al.*, 2001). Le rôle de la moelle osseuse dans la régulation des neutrophiles sanguins semble donc être complexe.

Cette hypothèse suggère que nos préparations de neutrophiles de moelle osseuse contiennent un grand nombre de cellules plus âgées donc ayant une durée de vie réduite. Or nous constatons que la demi vie de ces cellules en culture est deux fois plus longue que celle des neutrophiles du sang. La phagocytose du neutrophile par le macrophage étant un événement extrêmement rapide, il est très possible que les neutrophiles sénescents de retour dans la moelle osseuse soit très rapidement reconnus et séquestrés par les macrophages ce qui expliquerait pourquoi nous n'avons pas observé de décroissance rapide de la durée de vie des neutrophiles issus de la moelle osseuse. Il est également possible que ces neutrophiles sénescents ne possèdent plus la même densité que les neutrophiles matures et soient éliminés lors de la purification sur gradient de Percoll.

Pour être efficacement éliminés par les macrophages, les neutrophiles doivent exprimer à leur surface des molécules telles que la phosphatidylsérine. Ces molécules ne sont exprimées que lorsque le neutrophile entre dans un processus de mort cellulaire programmée comme cela a été démontré pour les neutrophiles humains (Akgul *et al.*, 2001).

I-2-Perte du potentiel membranaire mitochondrial et caractéristiques morphologiques nucléaires de l'apoptose

Dans chaque type cellulaire, il y a deux voies principales d'apoptose : une voie dite extrinsèque, agissant via des récepteurs de mort cellulaire tel que les récepteurs au ligand Fas ou au TNF, et une voie intrinsèque, mitochondriale (Cory et Adams, 2002). Bien que moins étudiée, la voie apoptotique mitochondriale semble être la voie d'apoptose majeure car les neutrophiles circulants tendent vers une mort rapide spontanément même chez des souris déficientes pour le récepteur de mort cellulaire Fas (Fecho et Cohen, 1998; Villunger *et al.*, 2000; Maianski *et al.*, 2004a).

Comme ces auteurs, nous avons pu constater l'existence d'une mort passive, spontanée dans nos neutrophiles de moelle osseuse de souris malgré des conditions de cultures cellulaires adaptées. En effet, dès la fin de leur purification, 13 % des cellules avaient déjà perdu leur potentiel membranaire mitochondrial alors que seules 7 % présentent une condensation chromatiniennne. Avant même que les cellules ne présentent les manifestations classiques de l'apoptose nucléaire, elles subissent une diminution du potentiel transmembranaire de la mitochondrie, dissipant le potentiel de membrane que crée l'expulsion permanente de protons hors de la matrice mitochondriale, d'où l'arrêt de la synthèse d'ATP (Halestrap *et al.*, 2002).

Morphologiquement, les neutrophiles murins présentent non seulement une condensation nucléaire comme il est décrit pour les neutrophiles humains apoptotiques mais aussi une perte du potentiel membranaire mitochondrial (Cowburn *et al.*, 2002). Cependant, une minorité des cellules semblent entrer en apoptose par une voie non mitochondriale (3,8 %). L'apoptose "physiologique" du neutrophile murin semble emprunter deux voies: une élimination rapide (24h) qui se fait majoritairement par la voie mitochondriale, et une voie minoritaire de mort cellulaire indépendante de la mitochondrie (48h). Deux hypothèses peuvent alors être posées : soit nous sommes en présence de deux populations de neutrophiles (présentes toutes deux dans la moelle osseuse avec une densité similaire), soit il s'agit de cellules autres que des neutrophiles (lymphocytes, monocytes, etc...). La dernière hypothèse semble cependant la plus probable. En effet, lors de la numération effectuée juste après la purification cellulaire, nous montrons une pureté de nos préparations de neutrophiles de plus de 95 %. Nous admettons que ces 3,8 % de cellules en apoptose dépendant de la voie non mitochondriale, peuvent être les cellules présentes dans nos préparations que nous n'avons pas identifiées en tant que neutrophiles pour diverses raisons (notamment la forme de leur noyau) (Biermann *et al.*, 1999).

Dans des conditions physiologiques, afin de lui permettre de migrer à travers les tissus et atteindre sa cible, la survie du neutrophile dépend de facteurs trophiques et/ou stimulant capables de retarder cette mort physiologique. Nos observations sont ainsi en accord avec les travaux d'autres auteurs, les neutrophiles murins comme leurs homologues humains, meurent par apoptose passive via la voie mitochondriale en absence de signaux de survie extracellulaire (Fossati *et al.*, 2003).

II-L'apoptose est un phénomène influençable

II-1-Modulation de la durée de vie des neutrophiles

Pour migrer vers le site inflammatoire et combattre une infection bactérienne, l'entrée en apoptose des neutrophiles doit être sensiblement retardée (Ward *et al.*, 2000). En effet, les neutrophiles qui entrent dans un processus apoptotique perdent leur capacité de chimiotactisme, de phagocytose, de production de dérivés oxygénés mais aussi de sécrétion de leurs granules par la perte de leurs récepteurs de surface et la perturbation des voies de signalisation intracellulaires (Whyte *et al.*, 1993; Dransfield *et al.*, 1995). C'est pourquoi, il

est nécessaire de retarder ce processus apoptotique afin que le neutrophile conserve intactes ses propriétés antimicrobiennes (Lee *et al.*, 1993).

Les substances chimioattractantes jouent en fait un double rôle sur le neutrophile : d'une part, l'attirer sur le site infectieux, d'autre part, retarder son apoptose passive. Un certain nombre de médiateurs et de mécanismes intracellulaires qui règlent l'apoptose du neutrophile ont été identifiés, mais le mécanisme complet reste toujours peu clair (Watson, 2002).

In vitro, l'apoptose du neutrophile humain est un événement influençable qui peut être modulé par une grande variété de molécules (Maianski *et al.*, 2004a; Akgul *et al.*, 2001). En général, il s'agit de facteurs de croissance ou de cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-8 et l'IL-1 β mais aussi la molécule C5a du système du complément, des peptides bactériens comme le LPS ou des glucocorticoïdes (Watson, 2002; Perianayagam *et al.*, 2002; Liles *et al.*, 1995).

Nous avons pu remarquer que des peptides chimioattractants tel que le fMLF, le WKYMVm ou l'activateur de la PKC : le PMA, modulent la réponse du neutrophile en fonction de la concentration à laquelle ils sont utilisés. Ainsi, à faibles concentrations, c'est-à-dire à des concentrations chimioattractantes mais incapables de produire une réponse microbicide, nous constatons une augmentation significative de la viabilité cellulaire des neutrophiles.

A l'inverse, pour des concentrations plus importantes, capables de déclencher la production d'anions superoxydes ou la sécrétion des granules (Boxio *et al.*, 2004), nous constatons une diminution de la viabilité cellulaire. Cette constatation est en accord avec la littérature. En effet, l'activation du neutrophile, la phagocytose de microorganismes ou la production de radicaux libres en réponse au PMA sont des phénomènes associés à une mort accélérée de cette cellule (Watson *et al.*, 1996; Lundqvist-Gustafsson et Bengtsson, 1999; Kobayashi *et al.*, 2002). L'activation de ces cellules induirait une cascade moléculaire qui accélérerait l'apoptose du neutrophile humain afin de faciliter la résolution de l'inflammation initiée par l'infection bactérienne (Kobayashi *et al.*, 2003).

Chez l'Homme, l'effet anti-apoptotique du fMLF n'a encore jamais été démontré et son effet pro-apoptotique reste encore très controversé. En effet, alors que les travaux de nombreux auteurs montrent que le fMLF (1, 5, 10 et 100 nM ou 1 μ M) est sans effet sur la viabilité cellulaire des neutrophiles humains (Brach *et al.*, 1992; Colotta *et al.*, 1992; Salamone *et al.*, 2001; Lundqvist-Gustafsson et Bengtsson, 1999), les recherches d'Hébert ont quant à eux permis de mettre en évidence un effet pro-apoptotique du fMLF (100 nM) (Hebert *et al.*,

1996). A notre connaissance, nos travaux mettent pour la première fois en évidence le rôle anti-apoptotique de concentrations chimioattractantes et l'effet pro-apoptotique de fortes concentrations de ce peptide dans les neutrophiles murins.

De la même façon, ce sont également les premiers travaux relatant les effets anti-et pro-apoptotique du WKYMVm sur les neutrophiles murins. En effet, excepté les travaux de Bae portant sur les monocytes humains et confirmant l'effet anti-apoptotique de concentrations chimioattractante du WKYMVm, aucune étude n'avait encore été faite concernant l'effet du peptide WKYMVm sur la viabilité cellulaire des neutrophiles (Bae *et al.*, 2002).

Contrairement au fMLF ou au WKYMVm, le PMA ne possède pas de récepteurs membranaires mais agit directement sur la PKC (cf. Introduction § V-3-A-a)

La PKC est impliqué dans l'activation de neutrophile et dans la régulation de l'apoptose dans une variété de cellules aussi bien d'origine myéloïde (Macfarlane et Manzel, 1994; Pongracz *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 1995) que lymphoïde (Knox *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1996). Les 11 isoenzymes de PKC semblent être différemment impliquées dans le contrôle du programme apoptotique (Deacon *et al.*, 1997). Ainsi il est établi que la PKC- δ est une isoenzyme pro-apoptotique dans les neutrophiles humains (Pongracz *et al.*, 1999) alors que la PKC- α serait une isoenzyme anti-apoptotique dans les lignées cellulaires Molt4 et Cos (Lee *et al.*, 1996; Whelan et Parker, 1998). La participation des autres isoenzymes de la PKC dans l'apoptose des neutrophiles n'a pas encore été établie. Ainsi, la survie ou la mort accélérée des neutrophiles dépendrait de l'isoenzyme activée par les signaux extracellulaires.

Selon sa concentration, le PMA est capable d'influencer la durée de vie des neutrophiles. O'Shea *et al.* ont proposé que des réactions de phosphorylation issues de la stimulation par le PMA, induisaient directement ou indirectement l'activation de récepteur CR1 et CR3 (O'Shea *et al.*, 1985). L'activation de ces récepteurs simulerait alors la fixation de la molécule C3b du complément. De cette façon, à 10 nM, le PMA serait capable d'induire un retard de la mort cellulaire en reproduisant indirectement l'action chimioattractante du C3b. A faible concentration (10 nM), il est possible que le PMA active la PKC- α et permettrait ainsi de retarder la mort cellulaire passive des neutrophiles. A l'inverse, à fortes concentrations (200 nM), il activerait également la PKC- δ ce qui induirait des signaux intracellulaires pro-apoptotiques.

II-2-Influence sur la voie apoptotique mitochondriale

Le fMLF et le WKYMVm sont reconnus pour être des peptides chimioattractants et de puissants agonistes des fonctions bactéricides des neutrophiles aussi bien murins qu'humains. Ces deux peptides se lient à des récepteurs de la famille des peptides N-formylés (FPR) et sont couplés à une protéine G de type Gi. Bien que le fMLF se lie préférentiellement au récepteur FPR (mFPR) alors que le WKYMVm semble quant à lui se lier avec plus de sensibilité aux récepteurs FPRL1 (FPR-rs1/-rs2), les signaux induits par ses deux peptides semblent emprunter les mêmes voies de signalisation intracellulaires (cf Résultats, 2^{ème} partie).

Nos résultats nous ont permis de constater qu'à doses chimioattractantes, ces deux peptides sont capables de retarder la mort cellulaire passive des neutrophiles murins. Ainsi, ces deux peptides permettraient une modulation du processus apoptotique mais n'entraîneraient pas de modification du type de mort cellulaire.

Toutefois, la suite de nos expériences nous a permis de mettre en évidence une différence dans le mode d'action des signaux de survie générés par ces peptides. En effet, contrairement au WKYMVm, les signaux générés par une stimulation fMLF influent sur la sauvegarde le potentiel membranaire mitochondrial. Alors qu'une faible concentration de ce peptide sauvegarde ce potentiel, à l'inverse une forte concentration induit une plus importante perméabilité membranaire mitochondrial : la modulation du processus apoptotique par le fMLF semble donc emprunter la voie mitochondriale.

L'état actuel des connaissances nous porte à croire que l'apoptose passive des neutrophiles humains serait due à un déséquilibre dans la synthèse des protéines pro- et anti-apoptotiques. En effet, il semblerait que ces cellules expriment de façon constitutive les protéines pro-apoptotiques (Bax, Bad, ...) mais n'exprimeraient les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Mcl-1, ...) qu'en présence de signaux de survie générés (entre autres) par les cytokines inflammatoires (Pryde *et al.*, 2000; Akgul *et al.*, 2001; Maiani *et al.*, 2002). En absence de signaux de survie, ce sont les protéines pro-apoptotiques qui prédominent et induisent une mort par apoptose (Akgul *et al.*, 2001).

Nos résultats complètent les travaux de ces auteurs. Ainsi, comme cela l'a été démontré chez l'Homme, nous avons pu constater que la caspase-9 comme les protéines pro-apoptotiques Bad et Bax sont exprimées constitutivement chez le neutrophile murin. La voie mitochondriale semble être majoritairement impliquée dans l'apoptose physiologique du neutrophile murin. Cependant, l'implication de la voie directe ne peut pas être exclue.

De nombreux auteurs ont supposé que, chez le neutrophile humain, l'action d'agonistes tel que le TNF, le MIF (Macrophage migration inhibitory factor) ou le G-CSF inhibait le clivage de la protéine pro-apoptotiques Bid et la translocation de Bax dans la membrane mitochondriale, permettant ainsi la sauvegarde du potentiel membranaire mitochondrial (Baumann *et al.*, 2004; Baumann *et al.*, 2003; Maianski *et al.*, 2004b). Ces résultats seraient ainsi en accord avec nos propres constatations. En ce qui concerne les protéines Bad et Bax, il semble que le fMLF, comme le G-CSF, soit capable d'inhiber leur expression (Cowburn *et al.*, 2002).

Par contre, la présence de WKYMVm dans le milieu de culture semble influencer l'expression de Bax bien que ce peptide ne permette pas à la cellule de sauvegarder son potentiel membranaire. Il est possible que la protéine Bax aurait d'autres rôles au sein du neutrophile. Bax pourrait intervenir à la fois dans une étape de l'apoptose mais aussi dans la réponse microbicide puisque les fortes comme les faibles concentrations de WKYMVm inhibent son expression. La diminution de l'expression de Bax serait-elle une condition ou une conséquence de l'activation des voies de signalisation intracellulaires par le WKYMVm ?

Dans les neutrophiles murins, la caspase-9 est présente sous forme active dès la fin de la purification cellulaire pourtant les cellules ne présentent pas les caractéristiques morphologiques de l'apoptose. Il y a donc une inhibition, certainement par Akt, de la forme active de la caspase-9. Comme cela a été publié dans les neutrophiles humains pour le G-CSF (Maianski *et al.*, 2004b) ou le C5a (Perianayagam *et al.*, 2002), nous avons pu montrer que chez le neutrophile murin, des concentrations chimioattractantes de fMLF et WKYMVm permettent d'inhiber le clivage de la procaspase-9 en sa forme active. Ainsi, en sauvegardant le potentiel membranaire mitochondrial, le fMLF ne permet plus la libération de cytochrome c et inhibe de cette façon le clivage de cette caspase. Par contre, le WKYMVm ne sauvegarde pas l'intégrité mitochondriale, il est donc probable qu'il module la voie mitochondriale de l'apoptose après l'étape mitochondriale en inhibant l'étape de clivage de la procaspase-9 en sa forme active via l'activation de Akt. Les signaux de survie générés par des concentrations chimioattractantes de fMLF et de WKYMVm peuvent intervenir, via Akt, non seulement sur le clivage de la caspase-9 mais aussi plus en aval sur les caspases effectrices.

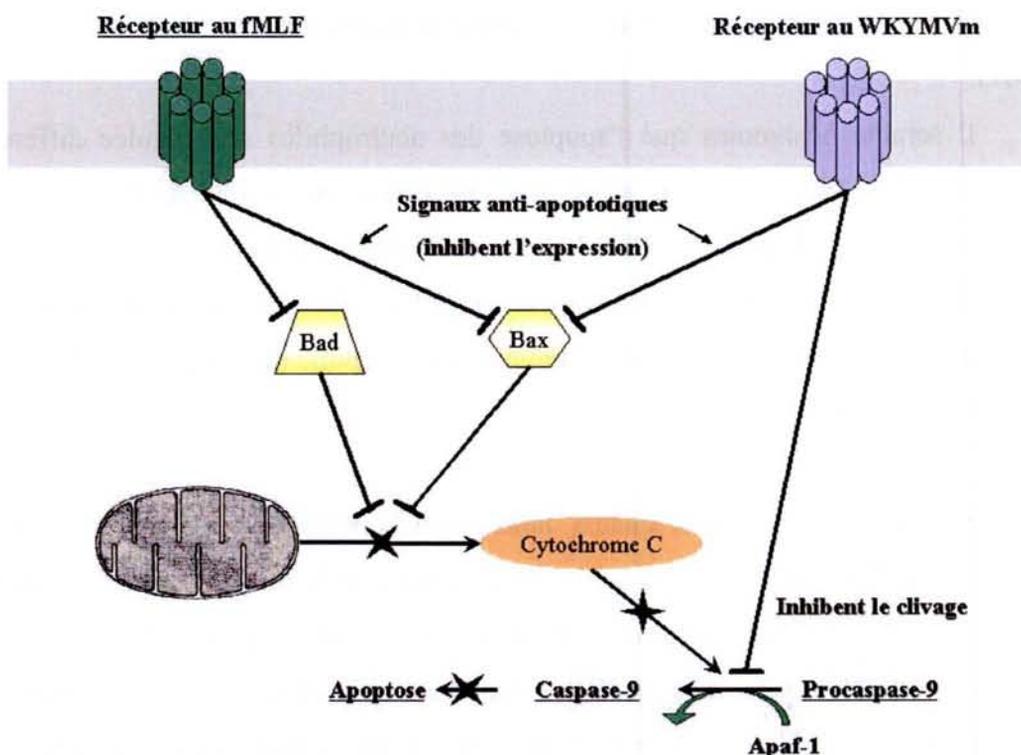


Figure 126 : Influence du fMLF et du WKYMVm sur la voie mitochondriale de l'apoptose.

III-Les voies de signalisations intracellulaires de l'apoptose

Au travers de nos résultats, nous avons pu démontrer que les neutrophiles de souris comme leurs homologues humains meurent par apoptose passive, perdent leur potentiel membranaire et présentent des signes morphologiques nucléaires caractéristiques de l'apoptose (Maianiski *et al.*, 2004a). Ce programme apoptotique constitutif peut cependant être ralenti par une variété de signaux qui sont associés à l'expression d'une réponse inflammatoire comme par exemple le G-CSF, les cytokines ou les produits bactériens comme le LPS, et désormais par le fMLF ou le WKYMVm. La survie de ces cellules est ainsi dépendante des signaux de l'environnement et intimement liée à l'activation de leur fonction (Watson *et al.*, 1998). Chez le neutrophile humain, l'inhibition de l'apoptose est un processus actif, qui dépend de la phosphorylation de protéines intracellulaires jusqu'ici encore incomplètement identifiées, de l'activation du facteur nucléaire de transcription NF- κ B, et de la synthèse de nouvelle protéine notamment des protéines anti-apoptotiques tels que A1 ou Bcl-2 (Watson *et al.*, 1998).

Toutefois, les voies de signalisation intracellulaires qui commandent ce processus sont toujours en grande partie inconnue. Il est clair que les cascades de phosphorylation, impliquant la phosphorylation de résidus tyrosine, sérine et thréonine, sont importantes.

Cependant, les cibles de ces kinases ne sont pas encore clairement identifiées (Akgul *et al.*, 2001).

Il semble néanmoins que l'apoptose des neutrophiles soit régulée différemment des autres types cellulaires. Ainsi, alors que l'élévation du taux d'AMPc, du calcium libre intracellulaire ou l'hypoxie accélère l'apoptose d'autres types cellulaires, ces agents tendent à retarder celle des neutrophiles (Akgul *et al.*, 2001). De la même façon, l'inhibition de la synthèse protéique active la mort cellulaire des neutrophiles mais retarde celle des thymocytes (Rossi *et al.*, 1995).

En accord avec d'autres auteurs, nous avons constaté que la présence de wortmannine, de Ly-294402 ou de PD-98059 seuls, n'influence pas la durée de vie des neutrophiles de moelle osseuse de souris en culture cellulaire. Ceci signifie que ni la PI3-kinase, ni la p44/42 MAPK ne semblent activées constitutivement dans ces cellules et ne semblent pas impliquées dans la régulation de la mort spontanée des neutrophiles (Pongracz *et al.*, 1999).

Par contre, nous avons pu montrer que la présence de H-89 augmente cette viabilité cellulaire. La PKA serait activée de façon constitutive dans le processus apoptotique du neutrophile murin. Ce résultat corrobore les travaux de Kimura *et al.* En effet, ces derniers ayant démontré, dans les cellules des ailes de drosophile, qu'une perte de fonction de la PKA ne permet plus l'entrée en apoptose de ces cellules (Kimura *et al.*, 2004). L'inactivation de la PKA suffirait donc à inhiber le phénomène apoptotique. Dans le cas des neutrophiles murins, l'activation constitutive de cette protéine pourrait jouer un rôle soit dans l'inactivation des protéines anti-apoptotiques, soit dans l'activation des protéines pro-apoptotiques qui interviennent dans la voie mitochondriale. Parce que l'inactivation de la PKA permet de sauvegarder le potentiel membranaire mitochondrial, il semblerait que cette kinase intervienne dans les étapes précoces du phénomène apoptotique. A ce jour, aucune étude n'avait encore mis en évidence le rôle de la PKA dans l'apoptose du neutrophile.

Plusieurs papiers ont récemment rapporté qu'il existerait sur Bad un site supplémentaire de phosphorylation, qui serait potentiellement phosphorylé par la PKA plutôt que par la voie PI3-K/Akt. D'autre part, leurs travaux ne mettent pas en évidence un effet significativement inhibiteur de H-89 seul dans la transmission des signaux de survie générés par le GM-CSF (Cowburn *et al.*, 2002).

Comme nous l'avons noté précédemment, les signaux de survie générés par des concentrations chimioattractantes de fMLF et de WKYMVm ne semblent pas moduler le processus apoptotique de la même façon. Le fMLF et le WKYMVm inhibent le clivage de la

pro-caspase-9 en sa forme active mais seul le fMLF semble capable d'inhiber l'expression des protéines pro-apoptotiques (Bad et Bax). Cependant, la cascade de signalisation permettant de moduler ce processus apoptotique mise en jeu par ces deux peptides nécessitent la présence des voies MAPK et PI3-Kinase/Akt (Ser473).

La voie de signalisation intracellulaire de la PI3-K est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires, y compris celle de l'apoptose (Franke *et al.*, 1997). Cette voie mène à l'activation d'Akt, une serine/thréonine kinase cytosolique, qui agit en aval de la PI3-K. L'activation de la PI-3K produit le PIP3 qui induit la translocation d'Akt à la membrane plasmique. Ces phosphoinositides activent également les phosphoinositide-dépendante kinases 1 (PDK1) et 2 (PDK2) qui phosphorylent Akt en position Thr-308 et Ser-473, respectivement (Rane *et al.*, 2003).

Akt agit en tant qu'effecteur de la PI3-K pour inhiber le processus apoptotique spontanée des cellules (Datta *et al.*, 1999; Bonni *et al.*, 1999). Une fois activée, Akt serait capable d'inhiber le processus apoptotique aussi bien en amont qu'en aval de l'étape mitochondriale. Elle inhiberait l'activité de la caspase-9, serait responsable de la phosphorylation des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 tels que le Bad, mais aussi de la régulation des facteurs de transcription tels que NF- κ B (Du et Montminy, 1998; Datta *et al.*, 1999; Kandel et Hay, 1999; Gardai *et al.*, 2004a).

Nos données indiquent que la voie de signalisation intracellulaire PI3-K/Akt serait impliquée dans la survie des neutrophiles suite à une stimulation fMLF ou WKYMVm. Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui ont montré que de nombreux médiateurs de l'inflammation, connus pour retarder l'apoptose spontanée des neutrophiles humains, emploient principalement la voie de signalisation PI3-K/Akt et seraient liés à l'inactivation des protéines pro-apoptotiques (Bad, Bax, Caspase-9). Ceci a été démontré pour le C5a, le PAF, le LPS, les cytokines et les facteurs de croissance hématopoïétiques (Klein *et al.*, 2000; Perianayagam *et al.*, 2002; Khreiss *et al.*, 2004).

Akt possède plusieurs sites de phosphorylation (Ser473 et Thr308) (Yang *et al.*, 2003). Nos expériences nous ont permis de constater que les signaux de survie générés par une stimulation fMLF ou WKYMVm, passent par la phosphorylation du site Ser473 de cette kinase. Cette constatation est en accord avec les travaux de Perianayagam qui ont démontré une phosphorylation du site Ser473 d'Akt en présence de faibles concentrations de C5a chez le neutrophile humain (Perianayagam *et al.*, 2002). A l'inverse, nous avons constaté que des concentrations de fMLF et de WKYMVm, capables d'induire une réponse microbicide, augmentent la mortalité cellulaire en induisant une apoptose accélérée et que ces signaux activateurs ne transitent pas via la phosphorylation de ce site. Nous ne pouvons cependant pas

exclure l'implication d'autre(s) site(s) de phosphorylation d'Akt dans la transduction des signaux induits par ces fortes concentrations de peptides.

La PI3-K γ semble jouer un rôle important dans la modulation des fonctions des neutrophiles *in vivo*. De récentes études effectuées chez des souris déficientes pour le gène PI3-K γ ont montré que les neutrophiles de ces animaux ne peuvent pas activer Akt lorsque ces cellules sont stimulées par les agonistes de récepteur couplé à une protéine G tels que le fMLF, le C5a ou l'I1-8 (Sasaki *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Hirsch *et al.*, 2000). Chez ces souris, Akt ne pouvait plus être phosphorylé en position Ser473 (Yang *et al.*, 2003).

Les travaux de Bae ont démontré que, dans les monocytes humains stimulés par le peptide WKYMVm, l'activation d'Akt nécessitait l'activation de la PKC (Bae *et al.*, 2002). Ceci ne minimise en rien la nécessité de la voie PI3-K. En effet, pour être activée par la PKC qui est activée par le DAG au niveau de la membrane, Akt doit être déplacée vers la membrane d'où l'importance du PIP3 produit par la PI3-K.

Il est possible que ces deux peptides qui se lient à des récepteurs différents bien qu'appartenant à la même famille, génèrent des signaux intracellulaires qui activent à la fois la PI3-K et différentes isoformes de PKC et par suite, la phosphorylation d'Akt(Ser473) mais que la stimulation fMLF induise la phosphorylation d'un site supplémentaire d'Akt. Ceci expliquerait le découplage des signaux générés par le fMLF et le WKYMVm.

Ainsi, les signaux de survie induits par le fMLF (figure 128) ne transitent pas via les mêmes isoformes de PKC, ils n'interfèrent pas sur les mêmes protéines que les signaux générés par le WKYMVm (figure 127). Ceci pourrait expliquer pourquoi le fMLF contrairement au WKYMVm, permet la sauvegarde du potentiel mitochondrial.

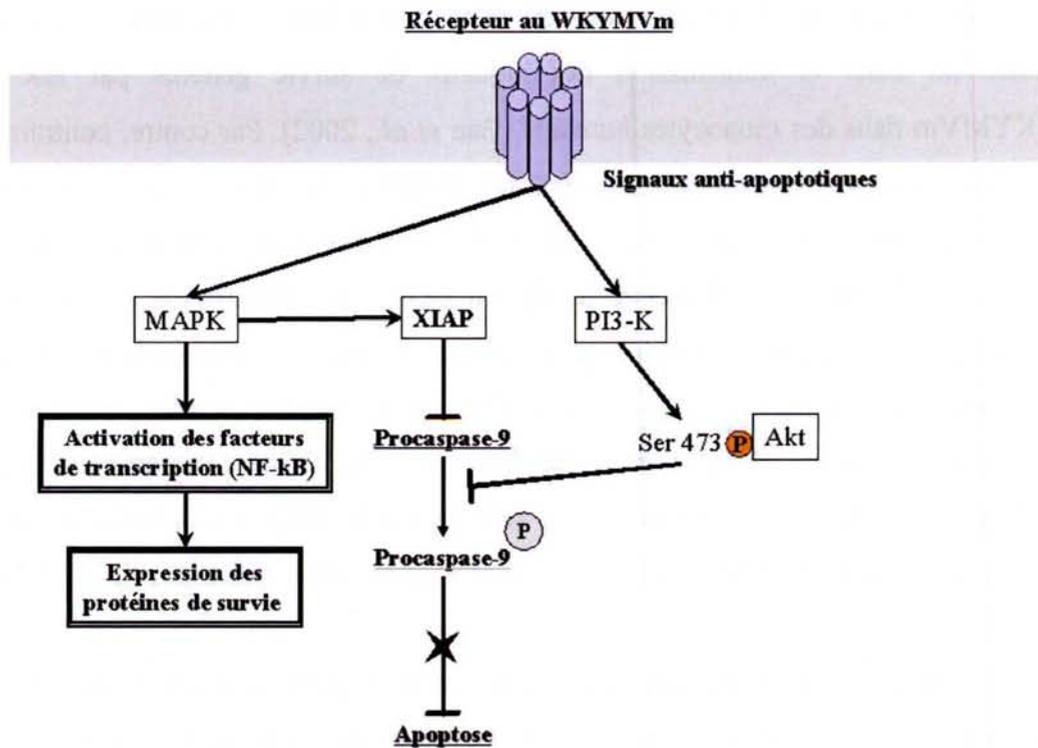


Figure 127 : Possibles rôles de la p44/42 MAPK et de la PI3K dans la régulation du processus apoptotique suite à une stimulation par le WKYMVm (Akgul *et al.*, 2001; Gardai *et al.*, 2004b).

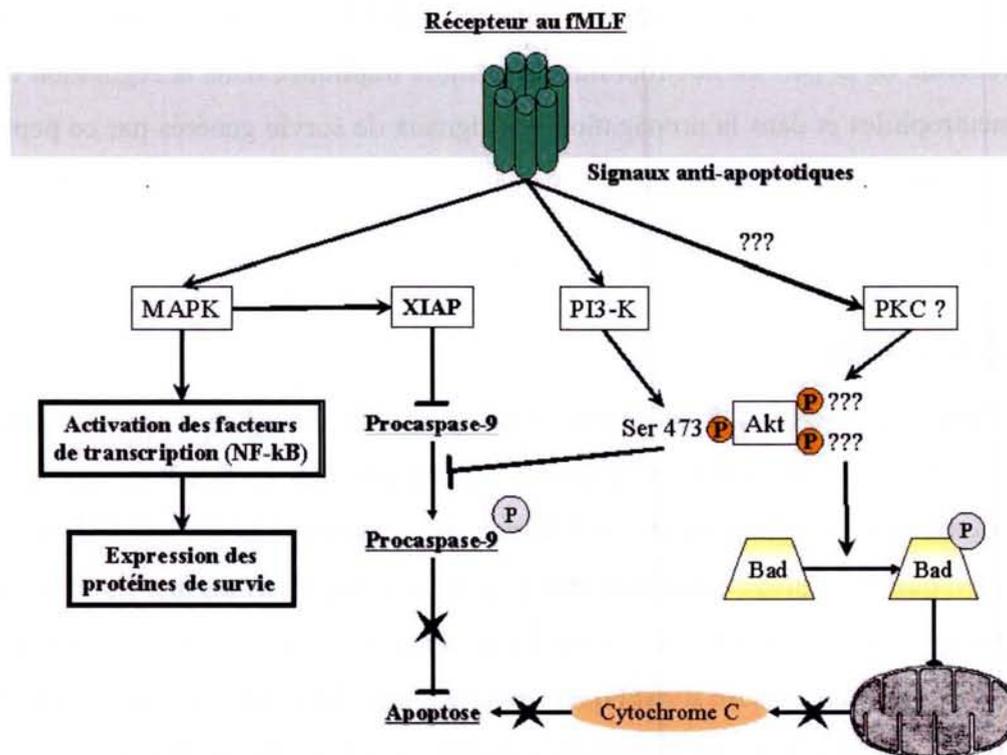


Figure 128 : Possibles rôles de la p44/42 MAPK, de la PI3K, de la PLC et de la PKC dans la régulation du processus apoptotique suite à une stimulation par le fMLF (Akgul *et al.*, 2001; Gardai *et al.*, 2004b).

Les travaux de Bae ont permis de mettre en évidence l'importance de la voie PI3-kinase/Akt dans la transmission des signaux de survie générés par une stimulation WKYMVm dans des monocytes humains (Bae *et al.*, 2002). Par contre, contrairement à nos travaux, ces signaux de survie ne seraient pas perturbés par la présence de PD-98059 dans le milieu de culture. De la même façon, les recherches de Cowburn ne mettent pas en évidence d'effet significativement inhibiteur du PD-98059 dans la transmission des signaux de survie générés par le GM-CSF (Cowburn *et al.*, 2002). Pourtant, de nombreuses autres études ont aussi démontré l'importance de l'activation de la p44/42 MAPK dans la survie des neutrophiles humains (Klein *et al.*, 2000; Watson *et al.*, 1998). Comme pour le GM-CSF, le TNF- α et le LPS, les signaux de survie générés par le fMLF ou le WKYMVm nécessitent l'activation de la p44/42 MAPK (Waterman et Sha'afi, 1995; Nahas *et al.*, 1996; Gardai *et al.*, 2004b).

Les MAPK sont impliquées dans le contrôle de l'apoptose et interviennent sur 3 points : elles jouent un rôle non seulement dans la régulation de l'activité des kinases en aval et des facteurs de transcription tels que NF- κ B mais elles sont également impliquées dans l'expression de protéines de survie tels que XIAP (Gardai *et al.*, 2004b). XIAP est une protéine de la famille des IAP (inhibitor of apoptosis), qui est capable de se lier aux caspases 3, 7 et 9 et d'inhiber leur activation. Ainsi, bien que la p44/42 MAPK ne semble pas impliquée dans la transduction des signaux WKYMVm qui conduisent à une réponse microbicide de la part du neutrophile, elle semble impliquée dans la régulation de l'apoptose des neutrophiles et dans la propagation des signaux de survie générés par ce peptide même si ce rôle est encore controversé.

IV-Conclusion

Nous avons ainsi mis en évidence des points de divergence dans la transduction des signaux pro- ou anti-apoptotiques issus de stimulation par le fMLF ou par le WKYMVm. Leurs cascades de signalisations ne diffèrent pas seulement au niveau de leur récepteur. Ils semblent que les signaux intracellulaires générés n'activent pas les mêmes kinases. Toutefois, en dehors des hypothèses formulées sur l'intervention des isoformes des protéines PKC, nous ne sommes pas en mesure d'expliquer comment ces deux peptides, transitant par la même famille de récepteurs et apparemment capables d'activer les mêmes kinases, modulent le processus apoptotique du neutrophile murin en deux points : pré et peut-être post-mitochondrial pour le fMLF mais uniquement post-mitochondrial pour le WKYMVm.

Conclusion

générale

et

perspectives

BRITISH LIBRARY

61

BRITISH LIBRARY

BRITISH LIBRARY

Conclusion générale

L'un des principaux problèmes concernant l'étude des neutrophiles murins vient du fait que contrairement à l'Homme, ces animaux contiennent peu de sang et que les neutrophiles y sont rares. Pour contourner cette difficulté, nous avons mis au point un protocole permettant d'isoler au sein de la moelle osseuse de ces animaux, une population de neutrophiles morphologiquement et fonctionnellement mature. Nos résultats suggèrent donc que la moelle de souris est un réservoir de neutrophiles fonctionnellement matures qui pourraient être aisément mobilisable. Cette réserve contient 23 fois plus de neutrophiles matures que le sang. Cette découverte va donc permettre d'élargir les possibilités d'application et d'études de ces cellules. Ainsi, pour de nombreuses expériences concernant les neutrophiles de souris, la moelle osseuse est une alternative attrayante et équivalente au sang périphérique. Néanmoins, des études nécessitant des prélèvements répétés sur le même animal, tels que le suivi de la réponse bactéricide des neutrophiles au cours d'une infection, de l'administration de médicaments ou le suivi d'un régime alimentaire particulier peuvent être réalisées sur des neutrophiles du sang.

Le fMLF étant un moins bon agoniste des neutrophiles murins que des neutrophiles humains, nos travaux se sont portés sur l'étude du WKYMVm : un peptide non formylé, connu pour activer un récepteur de la famille des "FPRs" et stimuler plus activement les réponses bactéricides des neutrophiles. L'étude de ce peptide nous a permis de constater qu'il était effectivement un plus puissant activateur des fonctions bactéricides des neutrophiles de souris. Il emploie les mêmes voies de signalisations que le fMLF, il active un récepteur de la même famille mais différent du récepteur au fMLF. En accord avec les travaux d'autres auteurs, nos expériences suggèrent que les récepteurs aux peptides N-formylés humains (FPR et FPRL1) comme leurs orthologues murins (mFPR, Fpr-rs1/-rs2) présentent des capacités de signalisation très semblables. Si ces récepteurs présentent une activité semblable, quels sont leurs ligands naturels et quelle est leur fonction in-vivo ?

Ces récepteurs de la famille des FPR (récepteurs aux peptides N-formylés) révèlent des sensibilités différentes pour les mêmes ligands tels que le fMLF et le WKYMVm (Le *et al.*, 2002). Ces récepteurs sont rapidement inactivés après la stimulation (Le *et al.*, 2001). Ainsi, posséder plusieurs récepteurs avec des sensibilités différentes pour le même ligand permet de maintenir la stimulation cellulaire en présence de fortes concentrations d'agonistes : les récepteurs de plus faibles sensibilités prenant le "relais" des récepteurs de fortes sensibilités rapidement désensibilisés (Lavigne *et al.*, 2002). Le plein potentiel de ces récepteurs, aussi

bien que leurs limites, deviendra évident chez des souris transgéniques pour ces récepteurs (FRPL1^{-/-} mais aussi FPR^{-/-} - FRPL1^{-/-}).

Parce que le récepteur FPRL1 présente des sensibilités pour des ligands liés à un grand nombre de maladies tels que des protéines de l'enveloppe du virus du SIDA, le prion (Creutzfeldt-Jacob) ou l'amyloïde β (Alzheimer), un inhibiteur spécifique de ce récepteur pourrait avoir des effets thérapeutiques bénéfiques. Ainsi, les recherches semblent maintenant se diriger vers la découverte de molécules capables d'inhiber ce récepteur sans induire la désensibilisation des autres récepteurs cellulaires, notamment FPR1. Bae *et al.* ont dernièrement découvert plusieurs peptides, notamment le HEYLP (Bae *et al.*, 2003b) et le WRWWW ou WRW⁴ qui inhibent efficacement et spécifiquement le récepteur FPRL1 exprimé dans les cellules RBL (Bae *et al.*, 2004). C'est également dans cet objectif que l'équipe de Leroy a mis au point les peptides C2 (WPLTHTLRHTIW) et E11 (FPSIHTIRLTQF) à l'aide d'une banque de bactériophages et de cellules HEK-293 exprimant à leurs surfaces, le récepteur FPRL1 (Poirey *et al.*, 2003).

Au cours de nos expériences sur le modèle murin, nous avons pu constater que ces inhibiteurs ne sont ni complètement spécifiques du récepteur FPRL1, ni capables d'inhiber complètement l'exocytose des granules de neutrophiles. Ceci malgré l'utilisation de concentrations capables d'inhiber totalement les signaux calciques induits par la stimulation de FPRL1 par le peptide WKYMVm dans les cellules HEK293-FPRL1 (IC₅₀ à 240 nM pour E11 et 300 nM pour C2). Ainsi, malgré la présence de 10 μ M de peptide C2, nous ne pouvons inhiber environ que 50 % de la sécrétion maximale des granules aussi bien primaires que secondaires (IC₅₀ à 1,6 μ M sur l'exocytose des granules primaires).

Quant au peptide E11, quelle que soit la concentration testée, cet inhibiteur s'est révélé être sans aucun effet sur la sécrétion des granules suite à une stimulation par le WKYMVm. Nous avons donc émis l'hypothèse que le peptide E11 serait capable de se fixer au récepteur Fpr-rs1 et que le peptide C2 aurait, quant à lui, plus de sensibilité pour le récepteur Fpr-rs2 ce qui explique que seul le peptide C2 soit capable d'inhiber la stimulation WKYMVm.

Les différents agonistes des récepteurs de peptide N-Formylés semblent activer différentes réponses cellulaires (Bae *et al.*, 2003c). Ainsi l'exocytose des granules primaires et secondaires peut être régulée différemment (Bae *et al.*, 2003a; Bae *et al.*, 2003b). Par exemple, la lipoxine A4, un agoniste de FPRL1, est capable d'activer aussi bien que d'inhiber certaines fonctions des neutrophiles humains (Gewirtz *et al.*, 1999). Ceci semble pouvoir expliquer les effets paradoxaux du peptide C2, qui semble capable d'inhiber les réponses des neutrophiles suite à une stimulation par le WKYMVm mais préactive et inhibe à la fois, ces

cellules suite à une stimulation par le fMLF. Tout ceci nous laissant ainsi supposer la participation d'un troisième récepteur de peptide N-formylé.

Contrairement à l'Homme qui n'en possède que 3 (*FPRI*, *FPRL1* et *FPRL2*), la souris dispose d'au moins 8 gènes codant pour des récepteurs FPR (*Fpr1* et *Fpr-rs1* à *Fpr-rs7*) (Le *et al.*, 2002; Wang et Ye, 2002). Jusqu'à présent seuls l'ARN de *Fpr1* (\equiv FPR1), de *Fpr-rs1* et de *Fpr-rs2* (\equiv FPRL1) ont pu être mis en évidence dans les neutrophiles murins. Cependant, la participation d'autres récepteurs de cette famille pourrait également expliquer les effets de la lipoxine A4 (Dahlgren *et al.*, 2000). Les peptides comme le C2 peuvent donc s'avérer être très utiles pour élucider les rôles respectifs de ces récepteurs de peptide N-formylé.

Du point de vue thérapeutique, si les récepteurs de peptide N-formylé sont capables de se lier avec de nombreux peptides, ils peuvent également se lier avec des molécules médicamenteuses et de ce fait, provoquer des interférences dans le traitement. Par exemple, l'enfuvirtide qui est un inhibiteur de la fusion du VIH (T-20), se lie aux récepteurs des peptides N-formylés humains et murins. Les valeurs d' EC_{50} publiées pour cette molécule vont de 0,1 à 0,5 μ M (Le *et al.*, 2002), et sont bien au-dessous des concentrations utilisées pendant le traitement (injection de 1 ml à 20 mM de T-20) (Matthews *et al.*, 2004). Ainsi il est possible que l'activation des récepteurs de peptide N-formylé par l'enfuvirtide contribue aux réactions inflammatoires observées à l'emplacement de l'injection ou à l'éosinophilie accrue qui se produit pendant le traitement (Matthews *et al.*, 2004). Par contre, personne ne sait encore si l'action thérapeutique de l'enfuvirtide dépend de l'activation des récepteurs de peptide N-formylé par le T-20.

Enfin, nous avons pu démontrer que les neutrophiles de souris comme les neutrophiles humains meurent par apoptose passive, perdent leur potentiel membranaire mitochondrial et présentent des signes morphologiques nucléaires caractéristiques de l'apoptose.

Pour la première fois, nous avons pu mettre en évidence que des concentrations chimioattractantes de fMLF ou de WKYMVm permettent d'augmenter cette viabilité cellulaire du neutrophile. Cependant, seul le peptide fMLF qui est un peptide naturel, s'est révélé capable de préserver le potentiel membranaire mitochondrial. Pourtant la cascade de signalisation mise en jeu par ces deux peptides nécessite la présence des voies PI3-Kinase/Akt (Ser473) et MAPK. Bien qu'appartenant à la même famille, les récepteurs de ces peptides sont différents. Leurs voies de signalisation intracellulaire soient différentes au moins entre le récepteur et (peut-être) la PI3-K puis commune ensuite puisque ces deux peptides révèlent une action commune au niveau de la caspase-9.

A l'inverse, nous avons constaté que des concentrations de fMLF et de WKYMVm, capables d'induire une réponse microbicide, augmentent la mortalité cellulaire en induisant

une apoptose accélérée et que ces signaux ne transitent pas via la phosphorylation d'Akt (Ser473). Le site de phosphorylation de cette kinase semble donc varier selon deux paramètres : la nature et la concentration de l'agoniste utilisé.

Ces travaux nous ont donc permis d'une part de mettre en évidence un important réservoir de neutrophiles matures au sein de la moelle osseuse des souris. D'autre part, la découverte de nouvelles molécules visant à stimuler l'activité microbicide des neutrophiles (WKYMVm, peptide C2 ou E11 couplé à une stimulation fMLF) ainsi que l'étude des voies de signalisation intracellulaire aboutissant soit à l'activation de ces cellules, à leur survie ou à leur mort accélérée, nous ont permis de mieux comprendre le fonctionnement des neutrophiles murins. Appliquées à l'Homme, ces pistes pourraient ouvrir des voies de recherche à l'industrie pharmaceutique pour le développement de nouveaux médicaments.

Perspectives

Nous pensons qu'il serait intéressant d'étudier les capacités fonctionnelles des neutrophiles de moelle osseuse humaine. Il est possible que la moelle osseuse humaine contienne également une réserve de neutrophile morphologiquement et surtout fonctionnellement matures.

Pour compléter l'étude fonctionnelle des neutrophiles murins, nous pourrions également réaliser des expériences comparatives portant sur le chimiotactisme et sur la capacité de phagocytose sur les deux populations de neutrophile murins.

En ce qui concerne l'étude des récepteurs aux peptides N-formylés, nous pourrions étudier l'effet de l'inhibiteur N-t-Boc-MLF sur des cellules transfectées par le récepteur FPR et soumis à une stimulation fMLF ou WKYMVm. Nous pourrions également examiner plus précisément les effets inhibiteurs des peptides C2 et E11 sur des cellules transfectées soit avec le récepteur Fpr-rs1 ou FPR-rs2.

Enfin, afin de compléter les études portant sur l'apoptose des neutrophiles murins, il serait intéressant d'étudier la phosphorylation des autres sites d'Akt lors d'une stimulation par de faibles concentrations de fMLF et de WKYMVm. Il serait également intéressant d'examiner l'implication de la voie PKC lors de telles stimulations.

Bibliographie

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

1. Abdel-Latif D., Steward M., Macdonald D. L., Francis G. A., Dinauer M. C., and Lacy P. Rac2 is critical for neutrophil primary granule exocytosis. *Blood* .2004, 104[3]: p.832-839.
2. Adamczyk M., Kostka G., and Palut D. [The role of apoptosis in cell physiology and pathology]. *Rocz.Panstw.Zakl.Hig.*1998, 49[4]: p.415-432.
3. Ahluwalia J., Tinker A., Clapp L. H., Duchon M. R., Abramov A. Y., Pope S., Nobles M., and Segal A. W. The large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel is essential for innate immunity. *Nature* .2004, 427[6977]: p.853-858.
4. Ahmed M.U., Hazeki K., Hazeki O., Katada T., and Ui M. Cyclic AMP-increasing agents interfere with chemoattractant-induced respiratory burst in neutrophils as a result of the inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase rather than receptor-operated Ca²⁺ influx. *J.Biol.Chem.*1995, 270[40]: p.23816-23822.
5. Akgul C. and Edwards S. W. Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. *Cell Mol.Life Sci.*2003, 60[11]: p.2402-2408.
6. Akgul C., Moulding D. A., and Edwards S. W. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett.*2001, 487[3]: p.318-322.
7. Alarcon G.S. Epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum.Dis.Clin.North Am.*1995, 21[3]: p.589-604.
8. Alessi D.R., Cuenda A., Cohen P., Dudley D. T., and Saltiel A. R. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J.Biol.Chem.*1995, 270[46]: p.27489-27494.
9. Alessi D.R., Deak M., Casamayor A., Caudwell F. B., Morrice N., Norman D. G., Gaffney P., Reese C. B., MacDougall C. N., Harbison D., Ashworth A., and Bownes M. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. *Curr.Biol.*1997, 7[10]: p.776-789.
10. Ali H., Haribabu B., Richardson R. M., and Snyderman R. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. *Med.Clin.North Am.*1997, 81[1]: p.1-28.
11. Allport J.R., Lim Y. C., Shipley J. M., Senior R. M., Shapiro S. D., Matsuyoshi N., Vestweber D., and Lusinskas F. W. Neutrophils from MMP-9- or neutrophil elastase-deficient mice show no defect in transendothelial migration under flow in vitro. *J.Leukoc.Biol.*2002, 71[5]: p.821-828.
12. Ambruso D.R., Bentwood B., Henson P. M., and Johnston R. B., Jr. Oxidative metabolism of cord blood neutrophils: relationship to content and degranulation of cytoplasmic granules. *Pediatr.Res.*1984, 18[11]: p.1148-1153.
13. Ambruso D.R., Knall C., Abell A. N., Panepinto J., Kurkchubasche A., Thurman G., Gonzalez-Aller C., Hiestler A., deBoer M., Harbeck R. J., Oyer R., Johnson G. L., and Roos D. Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* .2000, 97[9]: p.4654-4659.
14. Anderle H. Detection of food irradiation with luminescence methods. Thèse d'Université, Vienne. 1997.
15. Anderson B.F., Baker H. M., Norris G. E., Rice D. W., and Baker E. N. Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. *J.Mol.Biol.*1989, 209[4]: p.711-734.
16. Antonsson B. and Martinou J. C. The Bcl-2 protein family. *Exp.Cell Res.*2000, 256[1]: p.50-57.
17. Aratani Y., Koyama H., Nyui S., Suzuki K., Kura F., and Maeda N. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect.Immun.*1999, 67[4]: p.1828-1836.
18. Arends M.J., Morris R. G., and Wyllie A. H. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am.J.Pathol.*1990, 136[3]: p.593-608.

19. Arroyo A.G., Taverna D., Whittaker C. A., Strauch U. G., Bader B. L., Rayburn H., Crowley D., Parker C. M., and Hynes R. O. In vivo roles of integrins during leukocyte development and traffic: insights from the analysis of mice chimeric for alpha 5, alpha v, et alpha 4 integrins. *J.Immunol.*2000, 165[8]: p.4667-4675.
20. Ashkenazi A. and Dixit V. M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* .1998, 281[5381]: p.1305-1308.
21. Babior B.M. NADPH oxidase: an update. *Blood* .1999, 93[5]: p.1464-1476.
22. Babior B.M. Phagocytes and oxidative stress. *Am.J.Med.*2000, 109[1]: p.33-44.
23. Babior B.M. and Golde D. W. Production, distribution, and fate of neutrophils. In Williams Hematology. Beutler E.; Coller B.S.; Lichtman M.A.; Kipps T.J.; Seligsohn U Editors. U. Mc Graw-Hill. New York. 2001, p.753-759.
24. Bae Y.S., Ju S. A., Kim J. Y., Seo J. K., Baek S. H., Kwak J. Y., Kim B. S., Suh P. G., and Ryu S. H. Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met stimulates superoxide generation and killing of *Staphylococcus aureus* via phospholipase D activation in human monocytes. *J.Leukoc.Biol.*1999a, 65[2]: p.241-248.
25. Bae Y.S., Kim Y., Kim J. H., Lee T. G., Suh P. G., and Ryu S. H. Independent functioning of cytosolic phospholipase A2 and phospholipase D1 in Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met-induced superoxide generation in human monocytes. *J.Immunol.*2000, 164[8]: p.4089-4096.
26. Bae Y.S., Kim Y., Kim Y., Kim J. H., Suh P. G., and Ryu S. H. Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met is a chemoattractant for human phagocytic cells. *J.Leukoc.Biol.*1999b, 66[6]: p.915-922.
27. Bae Y.S., Kim Y., Park J. C., Suh P. G., and Ryu S. H. The synthetic chemoattractant peptide, Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met, enhances monocyte survival via PKC-dependent Akt activation. *J.Leukoc.Biol.*2002, 71[2]: p.329-338.
28. Bae Y.S., Lee H. Y., Jo E. J., Kim J. I., Kang H. K., Ye R. D., Kwak J. Y., and Ryu S. H. Identification of peptides that antagonize formyl peptide receptor-like 1-mediated signaling. *J.Immunol.*2004, 173[1]: p.607-614.
29. Bae Y.S., Park J. C., He R., Ye R. D., Kwak J. Y., Suh P. G., and Ho R. S. Differential signaling of formyl peptide receptor-like 1 by Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-CONH2 or lipoxin A4 in human neutrophils. *Mol.Pharmacol.*2003a, 64[3]: p.721-730.
30. Bae Y.S., Song J. Y., Kim Y., He R., Ye R. D., Kwak J. Y., Suh P. G., and Ryu S. H. Differential activation of formyl peptide receptor signaling by peptide ligands. *Mol.Pharmacol.*2003b, 64[4]: p.841-847.
31. Bae Y.S., Yi H. J., Lee H. Y., Jo E. J., Kim J. I., Lee T. G., Ye R. D., Kwak J. Y., and Ryu S. H. Differential activation of formyl peptide receptor-like 1 by peptide ligands. *J.Immunol.*2003c, 171[12]: p.6807-6813.
32. Baek S.H., Bae Y. S., Seo J. K., Lee Y. H., Kim J. H., Kwun K. B., Suh P. G., and Ryu S. H. Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met activates mitogen-activated protein kinase via a PI-3 kinase-mediated pathway independent of PKC. *Life Sci.*1999, 65[17]: p.1845-1856.
33. Baek S.H., Seo J. K., Chae C. B., Suh P. G., and Ryu S. H. Identification of the peptides that stimulate the phosphoinositide hydrolysis in lymphocyte cell lines from peptide libraries. *J.Biol.Chem.*1996, 271[14]: p.8170-8175.
34. Bainton D.F. and Farquhar M. G. Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes. Two types derived from opposite faces of the Golgi complex in developing granulocytes. *J.Cell Biol.*1966, 28[2]: p.277-301.
35. Bainton D.F., Ulliyot J. L., and Farquhar M. G. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J.Exp.Med.*1971, 134[4]: p.907-934.

36. Barrowman M.M., Cockcroft S., and Gomperts B. D. Potentiation and inhibition of secretion from neutrophils by phorbol ester. *FEBS Lett.*1986, 201[1]: p.137-142.
37. Barton J.C., Parmley R. T., Butler T. W., Williamson S., MacKenzie S., Chandler D. B., Blackburn W., and Heck L. W., Jr. Neutrophil lactoferrin content: variation among mammals. *Anat.Rec.*1988, 221[2]: p.567-575.
38. Basu S., Hodgson G., Katz M., and Dunn A. R. Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood* .2002, 100[3]: p.854-861.
39. Baudevin P., Moret G., and Raynaud N. Sciences de la Vie et de la Terre, Classe de troisième. Edition Bréal Paris. 1999, Bréal.
40. Baumann R., Casaulta C., Simon D., Conus S., Yousefi S., and Simon H. U. Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway. *FASEB J.*2003, 17[15]: p.2221-2230.
41. Baumann R., Yousefi S., Simon D., Russmann S., Mueller C., and Simon H. U. Functional expression of CD134 by neutrophils. *Eur.J.Immunol.*2004, 34[8]: p.2268-2275.
42. Baumhueter S., Singer M. S., Henzel W., Hemmerich S., Renz M., Rosen S. D., and Lasky L. A. Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* .1993, 262[5132]: p.436-438.
43. Bengtsson T., Dahlgren C., Stendahl O., and Andersson T. Actin assembly and regulation of neutrophil function: effects of cytochalasin B and tetracaine on chemotactic peptide-induced O₂- production and degranulation. *J.Leukoc.Biol.*1991, 49[3]: p.236-244.
44. Bennett J.P., Cockcroft S., and Gomperts B. D. Use of cytochalasin B to distinguish between early and late events in neutrophil activation. *Biochim.Biophys.Acta* .1980, 601[3]: p.584-591.
45. Berkow R.L. and Dodson R. W. Purification and functional evaluation of mature neutrophils from human bone marrow. *Blood* .1986, 68[4]: p.853-860.
46. Betsuyaku T., Liu F., Senior R. M., Haug J. S., Brown E. J., Jones S. L., Matsushima K., and Link D. C. A functional granulocyte colony-stimulating factor receptor is required for normal chemoattractant-induced neutrophil activation. *J.Clin.Invest* .1999, 103[6]: p.825-832.
47. Biermann H., Pietz B., Dreier R., Schmid K. W., Sorg C., and Sunderkotter C. Murine leukocytes with ring-shaped nuclei include granulocytes, monocytes, and their precursors. *J.Leukoc.Biol.*1999, 65[2]: p.217-231.
48. Birr C. Aspects of the Merrifield peptide Synthesis. Springer-verlag, Berlin Editors. Heidelberg, New York. 1978.
49. Bokoch G.M. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood* .1995, 86[5]: p.1649-1660.
50. Bonni A., Brunet A., West A. E., Datta S. R., Takasu M. A., and Greenberg M. E. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* .1999, 286[5443]: p.1358-1362.
51. Boros P., Odin J. A., Muryoi T., Masur S. K., Bona C., and Unkeless J. C. IgM anti-Fc gamma R autoantibodies trigger neutrophil degranulation. *J.Exp.Med.*1991, 173[6]: p.1473-1482.
52. Borregaard N. and Cowland J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* .1997, 89[10]: p.3503-3521.
53. Borregaard N. and Herlin T. Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis. *J.Clin.Invest* .1982, 70[3]: p.550-557.
54. Borregaard N., Lollike K., Kjeldsen L., Sengelov H., Bastholm L., Nielsen M. H., and Bainton D. F. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur.J.Haematol.*1993, 51[4]: p.187-198.

55. Borregaard N., Sehested M., Nielsen B. S., Sengelov H., and Kjeldsen L. Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation. *Blood* .1995, 85[3]: p.812-817.
56. Boulay F., Tardif M., Brouchon L., and Vignais P. The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. *Biochemistry* .1990, 29[50]: p.11123-11133.
57. Boxio R., Bossenmeyer-Pourie C., Steinckwich N., Dournon C., and Nusse O. Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils. *J.Leukoc.Biol.*2004, 75[4]: p.604-611.
58. Brach M.A., deVos S., Gruss H. J., and Herrmann F. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood* .1992, 80[11]: p.2920-2924.
59. Brock J.H. The physiology of lactoferrin. *Biochem.Cell Biol.*2002, 80[1]: p.1-6.
60. Brown E.J. Adhesive interactions in the immune system. *Trends in Cell Biology* .1997, 7[7]: p.289-295.
61. Burg N.D. and Pillinger M. H. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin.Immunol.*2001, 99[1]: p.7-17.
62. Burgoyne R.D. and Morgan A. Ca²⁺ and secretory-vesicle dynamics. *Trends Neurosci.*1995, 18[4]: p.191-196.
63. Butcher E.C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* .1991, 67[6]: p.1033-1036.
64. Bylund J., Samuelsson M., Collins L.V., and Karlsson A. NADPH-oxidase activation in murine neutrophils via formyl peptide receptors. *Exp.Cell Res.*2003, 282[2]: p.70-77.
65. Cain K. Chemical-induced apoptosis: formation of the Apaf-1 apoptosome. *Drug Metab Rev.*2003, 35[4]: p.337-363.
66. Cameron R. and Feuer G. The effect of drugs and toxins on the process of apoptosis. *Drug Metabol.Drug Interact.*2001, 18[1]: p.1-32.
67. Campbell E.J. and Campbell M.A. Pericellular proteolysis by neutrophils in the presence of proteinase inhibitors: effects of substrate opsonization. *J.Cell Biol.*1988, 106[3]: p.667-676.
68. Cantin A. and Crystal R.G. Oxidants, antioxidants and the pathogenesis of emphysema. *Eur.J.Respir.Dis.Suppl* . 1985, 139: p.7-17.
69. Carafoli E. The ambivalent nature of the calcium signal. *J.Endocrinol.Invest* .2004, 27[6 Suppl]: p.134-136.
70. Caron E. and Hall A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* .1998, 282[5394]: p.1717-1721.
71. Chang H.Y. and Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*2000, 64[4]: p.821-846.
72. Chervenick P.A., Boggs D. R., Marsh J. C., Cartwright G. E., and Wintrobe M. M. Quantitative studies of blood and bone marrow neutrophils in normal mice. *Am.J.Physiol* .1968, 215[2]: p.353-360.
73. Chou J.J., Li H., Salvesen G. S., Yuan J., and Wagner G. Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell* .1999, 96[5]: p.615-624.
74. Chou J.J., Matsuo H., Duan H., and Wagner G. Solution structure of the RAIDD CARD and model for CARD/CARD interaction in caspase-2 and caspase-9 recruitment. *Cell* .1998, 94[2]: p.171-180.

75. Christophe T., Karlsson A., Dugave C., Rabiet M. J., Boulay F., and Dahlgren C. The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH₂ specifically activates neutrophils through FPRL1/lipoxin A₄ receptors and is an agonist for the orphan monocyte-expressed chemoattractant receptor FPRL2. *J.Biol.Chem.*2001, 276[24]: p.21585-21593.
76. Clark R.A., Stone P. J., El Hag A., Calore J. D., and Franzblau C. Myeloperoxidase-catalyzed inactivation of alpha 1-protease inhibitor by human neutrophils. *J.Biol.Chem.* 1981, 256[7]: p.3348-3353.
77. Clark R.A., Volpp B. D., Leidal K. G., and Nauseef W. M. Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation. *J.Clin.Invest.* 1990, 85[3]: p.714-721.
78. Cockcroft S. G-protein-regulated phospholipases C, D and A₂-mediated signalling in neutrophils. *Biochim.Biophys.Acta.* 1992, 1113[2]: p.135-160.
79. Coeshott C., Ohnemus C., Pilyavskaya A., Ross S., Wieczorek M., Kroona H., Leimer A. H., and Cheronis J. Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1999, 96[11]: p.6261-6266.
80. Coeur P. Ces cellules que l'on appelle "sanguines". Cours d'hémobiologie. Faculté de Medecine Lyon Sud. <http://kowid.free.fr/pharmako/immuno/mo.htm> .1999.
81. Coffey P.J., Geijsen N., M'rabet L., Schweizer R. C., Maikoe T., Raaijmakers J. A., Lammers J. W., and Koenderman L. Comparison of the roles of mitogen-activated protein kinase kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signal transduction in neutrophil effector function. *Biochem.J.*1998, 329[Pt 1]: p.121-130.
82. Colditz I.G. and Movat H. Z. Kinetics of neutrophil accumulation in acute inflammatory lesions induced by chemotaxins and chemotaxinogens. *J.Immunol.*1984, 133[4]: p.2169-2173.
83. Colotta F., Re F., Polentarutti N., Sozzani S., and Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood.* 1992, 80[8]: p.2012-2020.
84. Corvera S. Phosphatidylinositol 3-kinase and the control of endosome dynamics: new players defined by structural motifs. *Traffic.*2001, 2[12]: p.859-866.
85. Cory S. and Adams J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat.Rev.Cancer.* 2002, 2[9]: p.647-656.
86. Cotter M.J., Norman K. E., Hellewell P. G., and Ridger V. C. A novel method for isolation of neutrophils from murine blood using negative immunomagnetic separation. *Am.J.Pathol.*2001, 159[2]: p.473-481.
87. Cowburn A.S., Cadwallader K. A., Reed B. J., Farahi N., and Chilvers E. R. Role of PI3-kinase-dependent Bad phosphorylation *et* altered transcription in cytokine-mediated neutrophil survival. *Blood.* 2002, 100[7]: p.2607-2616.
88. Cowland J.B. and Borregaard N. Isolation of neutrophil precursors from bone marrow for biochemical and transcriptional analysis. *J.Immunol.Methods.* 1999, 232[1-2]: p.191-200.
89. Crouch S.P., Kozlowski R., Slater K. J., and Fletcher J. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J.Immunol.Methods.* 1993, 160[1]: p.81-88.
90. Dahlgren C., Christophe T., Boulay F., Madianos P. N., Rabiet M. J., and Karlsson A. The synthetic chemoattractant Trp-Lys-Tyr-Met-Val-DMet activates neutrophils preferentially through the lipoxin A₄ receptor. *Blood.* 2000, 95[5]: p.1810-1818.
91. Dahlgren C. and Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils. *J.Immunol.Methods.* 1999, 232[1-2]: p.3-14.
92. Dang P.M., Hakim J., and Perianin A. Immunochemical identification and translocation of protein kinase C zeta in human neutrophils. *FEBS Lett.*1994, 349[3]: p.338-342.

93. Dang P.M., Morel F., Gougerot-Pocidallo M. A., and Benna J. E. Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67(PHOX) by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region. *Biochemistry* .2003, 42[15]: p.4520-4526.
94. Datta S.R., Brunet A., and Greenberg M. E. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.*1999, 13[22]: p.2905-2927.
95. De Fougerolles A.R., Qin X., and Springer T. A. Characterization of the function of intercellular adhesion molecule (ICAM)-3 and comparison with ICAM-1 and ICAM-2 in immune responses. *J.Exp.Med.*1994, 179[2]: p.619-629.
96. De Maria R., Testa U., Luchetti L., Zeuner A., Stassi G., Pelosi E., Riccioni R., Felli N., Samoggia P., and Peschle C. Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood* .1999, 93[3]: p.796-803.
97. Deacon E.M., Pongracz J., Griffiths G., and Lord J. M. Isoenzymes of protein kinase C: differential involvement in apoptosis and pathogenesis. *Mol.Pathol.*1997, 50[3]: p.124-131.
98. Degli E.M. Mitochondria in apoptosis: past, present and future. *Biochem.Soc.Trans.*2004, 32[Pt13]: p.493-495.
99. Delbosc S., Cristol J. P., Descomps B., Chenard J., and Sirois P. [Oxygen and the superoxide anion. Modulation of NADPH oxidase?]. *J.Soc.Biol.*2001, 195[4]: p.401-411.
100. Deriy L.V., Chor J., and Thomas L. L. Surface expression of lactoferrin by resting neutrophils. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*2000, 275[1]: p.241-246.
101. Dewald B., Thelen M., and Baggiolini M. Two transduction sequences are necessary for neutrophil activation by receptor agonists. *J.Biol.Chem.*1988, 263[31]: p.16179-16184.
102. Dewald B., Thelen M., Wymann M. P., and Baggiolini M. Staurosporine inhibits the respiratory burst and induces exocytosis in human neutrophils. *Biochem.J.*1989, 264[3]: p.879-884.
103. Dewas C., Fay M., Gougerot-Pocidallo M. A., and el Benna J. The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils. *J.Immunol.*2000, 165[9]: p.5238-5244.
104. Downey G.P., Butler J. R., Tapper H., Fialkow L., Saltiel A. R., Rubin B. B., and Grinstein S. Importance of MEK in neutrophil microbicidal responsiveness. *J.Immunol.*1998, 160[1]: p.434-443.
105. Dransfield I., Stocks S. C., and Haslett C. Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophil apoptosis. *Blood* .1995, 85[11]: p.3264-3273.
106. Du K. and Montminy M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J.Biol.Chem.*1998, 273[49]: p.32377-32379.
107. Dudley D.T., Pang L., Decker S. J., Bridges A. J., and Saltiel A. R. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* .1995, 92[17]: p.7686-7689.
108. Dumont F.J., Staruch M. J., Fischer P., DaSilva C., and Camacho R. Inhibition of T cell activation by pharmacologic disruption of the MEK1/ERK MAP kinase or calcineurin signaling pathways results in differential modulation of cytokine production. *J.Immunol.*1998, 160[6]: p.2579-2589.
109. Durstin M., Gao J. L., Tiffany H. L., McDermott D., and Murphy P. M. Differential expression of members of the N-formylpeptide receptor gene cluster in human phagocytes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*1994, 201[1]: p.174-179.
110. Dutta D. Mechanism of store-operated calcium entry. *J.Biosci.*2000, 25[4]: p.397-404.
111. Edwards S.W. *Biochemistry and physiology of the neutrophil.* Cambridge University Press, New York. 1994.

112. Ehrlich P. and Lazarus A. Histology of the Blood. Normal and Pathological. (Myers W [ed and trans]: Cambridge, MA, Cambridge, 1900), reprinted in Himmelweit F (ed): The Collected Papers of Paul Ehrlich. Vol 1. Histology, Biochemistry, and Pathology. New York, NY, Pergamon. 1956, p.181.
113. Elagoz A., Henderson D., Babu P. S., Salter S., Grahames C., Bowers L., Roy M. O., Laplante P., Grazzini E., Ahmad S., and Lembo P. M. A truncated form of CKbeta8-1 is a potent agonist for human formyl peptide-receptor-like 1 receptor. *Br.J.Pharmacol.*2004, 141[1]: p.37-46.
114. Elices M.J., Osborn L., Takada Y., Crouse C., Luhowskyj S., Hemler M. E., and Lobb R. R. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* .1990, 60[4]: p.577-584.
115. Ellison R.T., III and Giehl T. J. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J.Clin.Invest* .1991, 88[4]: p.1080-1091.
116. Ellson C.D., Anderson K. E., Morgan G., Chilvers E. R., Lipp P., Stephens L. R., and Hawkins P. T. Phosphatidylinositol 3-phosphate is generated in phagosomal membranes. *Curr.Biol.*2001, 11[20]: p.1631-1635.
117. Elzi D.J., Bjornsen A. J., MacKenzie T., Wyman T. H., and Silliman C. C. Ionomycin causes activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *Am.J.Physiol Cell Physiol* .2001, 281[1]: p.C350-C360.
118. Evan G.I. and Littlewood T. D. The role of c-myc in cell growth. *Curr.Opin.Genet.Dev.*1993, 3[1]: p.44-49.
119. Evans C.A., Lord J. M., Owen-Lynch P. J., Johnson G., Dive C., and Whetton A. D. Suppression of apoptosis by v-ABL protein tyrosine kinase is associated with nuclear translocation and activation of protein kinase C in an interleukin-3-dependent haemopoietic cell line. *J.Cell Sci.*1995, 108[Pt 7]: p.2591-2598.
120. Fadok V.A., Bratton D. L., and Henson P. M. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J.Clin.Invest* .2001, 108[7]: p.957-962.
121. Faurschou M. and Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes.Infect.*2003, 5[14]: p.1317-1327.
122. Faust L.R., el Benna J., Babior B. M., and Chanock S. J. The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *J.Clin.Invest* .1995, 96[3]: p.1499-1505.
123. Fecho K. and Cohen P. L. Fas ligand (gld)- and Fas (lpr)-deficient mice do not show alterations in the extravasation or apoptosis of inflammatory neutrophils. *J.Leukoc.Biol.*1998, 64[3]: p.373-383.
124. Feldmann G. [Apoptosis]. *Ann.Pharm.Fr.*1999, 57[4]: p.291-308.
125. Ferraro E., Corvaro M., and Cecconi F. Physiological and pathological roles of Apaf1 and the apoptosome. *J.Cell Mol.Med.*2003, 7[1]: p.21-34.
126. Ferretti M.E., Nalli M., Biondi C., Colamussi M. L., Pavan B., Traniello S., and Spisani S. Modulation of neutrophil phospholipase C activity and cyclic AMP levels by fMLP-OMe analogues. *Cell Signal.*2001, 13[4]: p.233-240.
127. Ferretti M.E., Spisani S., Pareschi M. C., Buzzi M., Cavallaro R., Traniello S., Reali E., Torrini I., Paradisi M. P., Zecchini G. P., and . Two new formylated peptides able to activate chemotaxis and respiratory burst selectively as tools for studying human neutrophil responses. *Cell Signal.*1994, 6[1]: p.91-101.
128. Fontecave M. and Pierre J. L. Iron metabolism: the low-molecular-mass iron pool. *Biol.Met.*1991, 4[3]: p.133-135.

129. Fossati G., Moulding D. A., Spiller D. G., Moots R. J., White M. R., and Edwards S. W. The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis. *J.Immunol.*2003, 170[4]: p.1964-1972.
130. Foyouzi-Youssefi R., Petersson F., Lew D. P., Krause K. H., and Nusse O. Chemoattractant-induced respiratory burst: increases in cytosolic Ca²⁺ concentrations are essential and synergize with a kinetically distinct second signal. *Biochem.J.*1997, 322 (Pt 3): p.709-718.
131. Franke T.F., Kaplan D. R., and Cantley L. C. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* .1997, 88[4]: p.435-437.
132. Freeman J.L., Abo A., and Lambeth J. D. Rac "insert region" is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65. *J.Biol.Chem.*1996, 271[33]: p.19794-19801.
133. Frenette P.S., Subbarao S., Mazo I. B., von Andrian U. H., and Wagner D. D. Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* .1998, 95[24]: p.14423-14428.
134. Froesch B.A., Aime-Sempe C., Leber B., Andrews D., and Reed J. C. Inhibition of p53 transcriptional activity by Bcl-2 requires its membrane-anchoring domain. *J.Biol.Chem.*1999, 274[10]: p.6469-6475.
135. Gao J.L. and Murphy P. M. Species and subtype variants of the N-formyl peptide chemotactic receptor reveal multiple important functional domains. *J.Biol.Chem.*1993, 268[34]: p.25395-25401.
136. Gardai S.J., Hildeman D. A., Frankel S. K., Whitlock B. B., Frasch S. C., Borregaard N., Marrack P., Bratton D. L., and Henson P. M. Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *J.Biol.Chem.*2004a, 279[20]: p.21085-21095.
137. Gardai S.J., Whitlock B. B., Xiao Y. Q., Bratton D. B., and Henson P. M. Oxidants inhibit ERK/MAPK and prevent its ability to delay neutrophil apoptosis downstream of mitochondrial changes and at the level of XIAP. *J.Biol.Chem.*2004b, 279[43]: p.44695-44703.
138. Garrido C., Schmitt E., Cande C., Vahsen N., Parcellier A., and Kroemer G. HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle* .2003, 2[6]: p.579-584.
139. Germain D., Gentilhomme O., Bryon P. A., and Coiffier B. Le polynucléaire neutrophile. In *Physiologie Humaine (cellules sanguines et organes hématopoïétiques)*. Edition SIMEP S.A., Villeurbanne. 1981a, p.137-158.
140. Germain D., Gentilhomme O., Bryon P. A., and Coiffier B. Moelle osseuse et tissu myéloïde. In *Physiologie Humaines: Cellules sanguines et organes hématopoïétiques*. Edition SIMEP S.A., Villeurbanne. 1981b, p.284.
141. Gewirtz A.T., Fokin V. V., Petasis N. A., Serhan C. N., and Madara J. L. LXA4, aspirin-triggered 15-epi-LXA4, and their analogs selectively downregulate PMN azurophilic degranulation. *Am.J.Physiol* .1999, 276[4 Pt 1]: p.C988-C994.
142. Gomperts B.D., Tatham P. E. R., and Kramer I. M. Phosphorylation and dephosphorylation: Protein kinases A and C. In *Signal Transduction*. Academic Press / Elsevier. 2002, p.189-217.
143. Gougerot-Pocidallo M.A. Le polynucléaire neutrophile. In *Biologie Médicale, Immunologie*, 3ème édition. Coordinateur Genetet N. Editions médicales internationales. 1997, p.51-65.
144. Gross A., McDonnell J. M., and Korsmeyer S. J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*1999, 13[15]: p.1899-1911.
145. Gschwendt M. Protein kinase C delta. *Eur.J.Biochem.*1999, 259[3]: p.555-564.
146. Gschwind M. and Huber G. Detection of apoptotic or necrotic death in neuronal cells by morphological, biochemical and molecular analysis. *Neuromethods* .1997, 29: p.13-31.

147. Halestrap A.P., McStay G. P., and Clarke S. J. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* .2002, 84[2-3]: p.153-166.
148. Hampton M.B., Kettle A. J., and Winterbourn C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* .1998, 92[9]: p.3007-3017.
149. Hancock W.S. and Battersby J. E. A new micro-test for the detection of incomplete coupling reactions in solid-phase peptide synthesis using 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid. *Anal.Biochem*.1976, 71[1]: p.260-264.
150. Hartt J.K., Barish G., Murphy P. M., and Gao J. L. N-formylpeptides induce two distinct concentration optima for mouse neutrophil chemotaxis by differential interaction with two N-formylpeptide receptor (FPR) subtypes. Molecular characterization of FPR2, a second mouse neutrophil FPR. *J.Exp.Med*.1999, 190[5]: p.741-747.
151. Haslett C., Jose P. J., Giclas P. C., Williams T. J., and Henson P. M. Cessation of neutrophil influx in C5a-induced acute experimental arthritis is associated with loss of chemoattractant activity from the joint space. *J.Immunol*.1989a, 142[10]: p.3510-3517.
152. Haslett C., Savill J. S., and Meagher L. The neutrophil. *Curr.Opin.Immunol*.1989b, 2[1]: p.10-18.
153. Hazen S.L., Hsu F. F., Mueller D. M., Crowley J. R., and Heinecke J. W. Human neutrophils employ chlorine gas as an oxidant during phagocytosis. *J.Clin.Invest* .1996, 98[6]: p.1283-1289.
154. Hebert M.J., Takano T., Holthofer H., and Brady H. R. Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxygenase-derived eicosanoids. *J.Immunol*.1996, 157[7]: p.3105-3115.
155. Heissig B., Hattori K., Dias S., Friedrich M., Ferris B., Hackett N. R., Crystal R. G., Besmer P., Lyden D., Moore M. A., Werb Z., and Rafii S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* .2002, 109[5]: p.625-637.
156. Henson P.M., Bratton D. L., and Fadok V. A. Apoptotic cell removal. *Curr.Biol*.2001, 11[19]: p.R795-R805.
157. Hirsch E., Katanaev V. L., Garlanda C., Azzolino O., Pirola L., Silengo L., Sozzani S., Mantovani A., Altruda F., and Wymann M. P. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* .2000, 287[5455]: p.1049-1053.
158. Horvitz H.R., Chalfie M., Trent C., Sulston J. E., and Evans P. D. Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* .1982, 216[4549]: p.1012-1014.
159. Hubbard R.C., Ogushi F., Fells G. A., Cantin A. M., Jallat S., Courtney M., and Crystal R. G. Oxidants spontaneously released by alveolar macrophages of cigarette smokers can inactivate the active site of alpha 1-antitrypsin, rendering it ineffective as an inhibitor of neutrophil elastase. *J.Clin.Invest* .1987, 80[5]: p.1289-1295.
160. Huber A.R. and Weiss S. J. Disruption of the subendothelial basement membrane during neutrophil diapedesis in an in vitro construct of a blood vessel wall. *J.Clin.Invest* .1989, 83[4]: p.1122-1136.
161. Hudson G. and Shortland J. R. Bone marrow macrophages. In: *The Reticuloendothelial System: A Complete Treatise*, edited by Carr I, and Daems WT.. New York: Plenum. 1980, p.329-360.
162. Hurley J.V. Termination of acute inflammation. I Resolution. In *Acute Inflammation*. JV Hurley Editor. 2nd edition. Churchill Livingstone. London. 1983, p.109-117.
163. Huynh M.L., Fadok V. A., and Henson P. M. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J.Clin.Invest* .2002, 109[1]: p.41-50.
164. Itoh N., Yonehara S., Ishii A., Yonehara M., Mizushima S., Sameshima M., Hase A., Seto Y., and Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* .1991, 66[2]: p.233-243.

165. Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. J., and . Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. Garland Science Publishing. 2001.
166. Janicke R.U., Sprengart M. L., Wati M. R., and Porter A. G. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J.Biol.Chem.*1998, 273[16]: p.9357-9360.
167. Janoff A. Elastases and emphysema. Current assessment of the protease-antiprotease hypothesis. *Am.Rev.Respir.Dis.*1985, 132[2]: p.417-433.
168. Johnson J.L., Moore E. E., Tamura D. Y., Zallen G., Biffl W. L., and Silliman C. C. Interleukin-6 augments neutrophil cytotoxic potential via selective enhancement of elastase release. *J.Surg.Res.*1998, 76[1]: p.91-94.
169. Kahler C.P. Evaluation of the use of the solvent dimethyl sulfoxide in chemiluminescent studies. *Blood Cells Mol.Dis.*2000, 26[6]: p.626-633.
170. Kandel E.S. and Hay N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp.Cell Res.*1999, 253[1]: p.210-229.
171. Kaplan G. Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages. *Scand.J.Immunol.*1977, 6[8]: p.797-807.
172. Karlsson A., Nixon J. B., and McPhail L. C. Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *J.Leukoc.Biol.*2000, 67[3]: p.396-404.
173. Kato M., Tanaka K., Muto Y, Watanabe K., and Ueno K. Effects of *Bacteroides* Phosphosphingolipids on Murine Neutrophils. *Anaerobe* .2002, 8[1]: p.23-28.
174. Kerr J.F., Harmon B., and Searle J. An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibers. *J.Cell Sci* .1974, 14[3]: p.571-585.
175. Kerr J.F., Wyllie A. H., and Currie A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* .1972, 26[4]: p.239-257.
176. Khreiss T., Jozsef L., Chan J. S., and Filep J. G. Activation of extracellular signal-regulated kinase couples platelet-activating factor-induced adhesion and delayed apoptosis of human neutrophils. *Cell Signal.*2004, 16[7]: p.801-810.
177. Kim C. and Dinauer M. C. Rac2 is an essential regulator of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation in response to specific signaling pathways. *J.Immunol.*2001, 166[2]: p.1223-1232.
178. Kimura K., Kodama A., Hayasaka Y., and Ohta T. Activation of the cAMP/PKA signaling pathway is required for post-ecdysial cell death in wing epidermal cells of *Drosophila melanogaster*. *Development* .2004, 131[7]: p.1597-1606.
179. Klebanoff S.J. and Clark R.X. The neutrophil: Function and Clinical Disorders. Amsterdam, North-Holland Publishing. 1978, p.313.
180. Klein J.B., Rane M.J., Scherzer J.A., Coxon P.Y., Kettritz R., Mathiesen J.M., Buridi A., and McLeish K.R. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J.Immunol.*2000, 164[8]: p.4286-4291.
181. Knall C., Young S., Nick J.A., Buhl A.M., Worthen G.S., and Johnson G.L. Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase pathway in human neutrophils. *J.Biol.Chem.*1996, 271[5]: p.2832-2838.

182. Knox K.A., Johnson G.D., and Gordon J. A study of protein kinase C isozyme distribution in relation to Bcl-2 expression during apoptosis of epithelial cells in vivo. *Exp.Cell Res.*1993, 207[1]: p.68-73.
183. Kobayashi S.D., Voyich J.M., Buhl C.L., Stahl R.M., and DeLeo F.R. Global changes in gene expression by human polymorphonuclear leukocytes during receptor-mediated phagocytosis: cell fate is regulated at the level of gene expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A .*2002, 99[10]: p.6901-6906.
184. Kobayashi S.D., Voyich J.M., and DeLeo F.R. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes.Infect.*2003, 5[14]: p.1337-1344.
185. Kolanus W. and Seed B. Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP3. *Curr.Opin.Cell Biol.*1997, 9[5]: p.725-731.
186. Konstan M.W. and Berger M. Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology. *Pediatr.Pulmonol.*1997, 24[2]: p.137-142.
187. Krause K.H., Van Delden C., Huggler E., Monod A., and Lew D. P. Differential effects on neutrophil activation of staurosporin and its protein kinase C-selective derivative cgp 41231. *Eur.J.Pharmacol.*1992, 227[2]: p.221-224.
188. Kuroki M. and O'Flaherty J. T. Differential effects of a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor on human neutrophil responses to chemotactic factors. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*1997, 232[2]: p.474-477.
189. Labouesse M. *C. elegans*, les promesses d'un petit animal intelligent: "small is beautiful". *Med.Sci .*1994, 10: p.337-341.
190. Lagasse E. and Weissman I. L. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *J.Immunol.Methods .*1996, 197[1-2]: p.139-150.
191. Lasky L.A., Singer M. S., Dowbenko D., Imai Y., Henzel W. J., Grimley C., Fennie C., Gillett N., Watson S. R., and Rosen S. D. An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell .*1992, 69[6]: p.927-938.
192. Laudanna C., Campbell J. J., and Butcher E. C. Elevation of intracellular cAMP inhibits RhoA activation and integrin-dependent leukocyte adhesion induced by chemoattractants. *J.Biol.Chem.*1997, 272[39]: p.24141-24144.
193. Lavigne M.C., Murphy P. M., Leto T. L., and Gao J. L. The N-formylpeptide receptor (FPR) and a second G(i)-coupled receptor mediate fMet-Leu-Phe-stimulated activation of NADPH oxidase in murine neutrophils. *Cell Immunol.*2002, 218[1-2]: p.7-12.
194. Le Cabec V., Cowland J. B., Calafat J., and Borregaard N. Targeting of proteins to granule subsets is determined by timing and not by sorting: The specific granule protein NGAL is localized to azurophil granules when expressed in HL-60 cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A .* 1996, 93[13]: p.6454-6457.
195. Le Y., Gong W., Li B., Dunlop N. M., Shen W., Su S. B., Ye R. D., and Wang J. M. Utilization of two seven-transmembrane, G protein-coupled receptors, formyl peptide receptor-like 1 and formyl peptide receptor, by the synthetic hexapeptide WKYMVm for human phagocyte activation. *J.Immunol.*1999, 163[12]: p.6777-6784.
196. Le Y., Murphy P. M., and Wang J. M. Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol.*2002, 23[11]: p.541-548.
197. Le Y., Oppenheim J. J., and Wang J. M. Pleiotropic roles of formyl peptide receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.*2001, 12[1]: p.91-105.
198. Leclercq Y., Sawatzki G., Wieruszkeski J. M., Montreuil J., and Spik G. Primary structure of the glycans from mouse serum and milk transferrins. *Biochem.J.*1987, 247[3]: p.571-578.
199. Lee A., Whyte M. K., and Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J.Leukoc.Biol.*1993, 54[4]: p.283-288.

200. Lee J.Y., Hannun Y. A., and Obeid L. M. Ceramide inactivates cellular protein kinase Calpha. *J.Biol.Chem.*1996, 271[22]: p.13169-13174.
201. Lee T.H., Lympany P., Crea A. E., and Spur B. W. Inhibition of leukotriene B4-induced neutrophil migration by lipoxin A4: structure-function relationships. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*1991, 180[3]: p.1416-1421.
202. Levesque J.P., Hendy J., Takamatsu Y., Williams B., Winkler I. G., and Simmons P. J. Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment. *Exp.Hematol.*2002, 30[5]: p.440-449.
203. Levesque J.P., Hendy J., Winkler I. G., Takamatsu Y., and Simmons P. J. Granulocyte colony-stimulating factor induces the release in the bone marrow of proteases that cleave c-KIT receptor (CD117) from the surface of hematopoietic progenitor cells. *Exp.Hematol.*2003, 31[2]: p.109-117.
204. Levesque J.P., Liu F., Simmons P. J., Betsuyaku T., Senior R. M., Pham C., and Link D. C. Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice. *Blood* .2004, 104[1]: p.65-72.
205. Levesque J.P., Takamatsu Y., Nilsson S. K., Haylock D. N., and Simmons P. J. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* .2001, 98[5]: p.1289-1297.
206. Lew P.D., Monod A., Waldvogel F. A., Dewald B., Baggiolini M., and Pozzan T. Quantitative analysis of the cytosolic free calcium dependency of exocytosis from three subcellular compartments in intact human neutrophils. *J.Cell Biol.*1986, 102[6]: p.2197-2204.
207. Li B.Q., Wetzel M. A., Mikovits J. A., Henderson E. E., Rogers T. J., Gong W., Le Y., Ruscetti F. W., and Wang J. M. The synthetic peptide WKYMVm attenuates the function of the chemokine receptors CCR5 and CXCR4 through activation of formyl peptide receptor-like 1. *Blood* .2001, 97[10]: p.2941-2947.
208. Li S.W., Westwick J., and Poll C. T. Receptor-operated Ca²⁺ influx channels in leukocytes: a therapeutic target? *Trends Pharmacol.Sci* .2002, 23[2]: p.63-70.
209. Li Z., Jiang H., Xie W., Zhang Z., Smrcka A. V., and Wu D. Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science* .2000, 287[5455]: p.1046-1049.
210. Ligeti E. and Mocsai A. Exocytosis of neutrophil granulocytes. *Biochem.Pharmacol.*1999, 57[11]: p.1209-1214.
211. Liles W.C., Dale D. C., and Klebanoff S. J. Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils. *Blood* .1995, 86[8]: p.3181-3188.
212. Liles W.C., Kiener P. A., Ledbetter J. A., Aruffo A., and Klebanoff S. J. Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J.Exp.Med.*1996, 184[2]: p.429-440.
213. Lorant D.E., Topham M. K., Whatley R. E., McEver R. P., McIntyre T. M., Prescott S. M., and Zimmerman G. A. Inflammatory roles of P-selectin. *J.Clin.Invest* .1993, 92[2]: p.559-570.
214. Lord B.I., Molineux G., Pojda Z., Souza L. M., Mermod J. J., and Dexter T. M. Myeloid cell kinetics in mice treated with recombinant interleukin-3, granulocyte colony-stimulating factor (CSF), or granulocyte-macrophage CSF in vivo. *Blood* .1991, 77[10]: p.2154-2159.
215. Lovas K., Knudsen E., Iversen P. O., and Benestad H. B. Sequestration patterns of transfused rat neutrophilic granulocytes under normal and inflammatory conditions. *Eur.J.Haematol.*1996, 56[4]: p.221-229.
216. Lowell C.A., Fumagalli L., and Berton G. Deficiency of Src family kinases p59/61hck and p58c-fgr results in defective adhesion-dependent neutrophil functions. *J.Cell Biol.*1996, 133[4]: p.895-910.

217. Lowry O.H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 1951, 193[1]: p.265-275.
218. Ludwig F.C. and Kohn H.I. Quantitative studies on the radiation pathology of the bone marrow of the small laboratory mammals. I. The film-ratio method: absolute counts from films prepared with suspensions of bone marrow cells. *Radiat.Res.* 1962, 17: p.579-593.
219. Lundqvist-Gustafsson H. and Bengtsson T. Activation of the granule pool of the NADPH oxidase accelerates apoptosis in human neutrophils. *J.Leukoc.Biol.* 1999, 65[2]: p.196-204.
220. Lundqvist H. and Dahlgren C. Isoluminol-enhanced chemiluminescence: a sensitive method to study the release of superoxide anion from human neutrophils. *Free Radic.Biol.Med.* 1996, 20[6]: p.785-792.
221. Macfarlane D.E. and Manzel L. Activation of beta-isozyme of protein kinase C (PKC beta) is necessary and sufficient for phorbol ester-induced differentiation of HL-60 promyelocytes. Studies with PKC beta-defective PET mutant. *J.Biol.Chem.* 1994, 269[6]: p.4327-4331.
222. MacManus J.P., Buchan A. M., Hill I. E., Rasquinha I., and Preston E. Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. *Neurosci.Lett.* 1993, 164[1-2]: p.89-92.
223. Maianski N.A., Maianski A. N., Kuijpers T. W., and Roos D. Apoptosis of neutrophils. *Acta Haematol.* 2004a, 111[1-2]: p.56-66.
224. Maianski N.A., Mul F. P., van Buul J. D., Roos D., and Kuijpers T. W. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits the mitochondria-dependent activation of caspase-3 in neutrophils. *Blood* .2002, 99[2]: p.672-679.
225. Maianski N.A., Roos D., and Kuijpers T. W. Tumor necrosis factor alpha induces a caspase-independent death pathway in human neutrophils. *Blood* .2003, 101[5]: p.1987-1995.
226. Maianski N.A., Roos D., and Kuijpers T. W. Bid truncation, bid/bax targeting to the mitochondria, and caspase activation associated with neutrophil apoptosis are inhibited by granulocyte colony-stimulating factor. *J.Immunol.* 2004b, 172[11]: p.7024-7030.
227. Majumdar S., Rossi M. W., Fujiki T., Phillips W. A., Disa S., Queen C. F., Johnston R. B., Jr., Rosen O. M., Corkey B. E., and Korchak H. M. Protein kinase C isotypes and signaling in neutrophils. Differential substrate specificities of a translocatable calcium- and phospholipid-dependent beta-protein kinase C and a phospholipid-dependent protein kinase which is inhibited by long chain fatty acyl coenzyme A. *J.Biol.Chem.* 1991, 266[14]: p.9285-9294.
228. Matthews T., Salgo M., Greenberg M., Chung J., DeMasi R., and Bolognesi D. Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2004, 3[3]: p.215-225.
229. Matzner Y. Acquired neutrophil dysfunction and diseases with an inflammatory component. *Semin.Hematol.* 1997, 34[4]: p.291-302.
230. McDonnell J.M., Fushman D., Milliman C. L., Korsmeyer S. J., and Cowburn D. Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell* .1999, 96[5]: p.625-634.
231. McPhail L.C., Clayton C. C., and Snyderman R. The NADPH oxidase of human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for regulation by multiple signals. *J.Biol.Chem.* 1984, 259[9]: p.5768-5775.
232. Merrifield R.B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J.Amer.Chem.Soc.* 1963, 85[14]: p.2149-2154.
233. Metcalf D., Lindeman G. J., and Nicola N. A. Analysis of hematopoiesis in max 41 transgenic mice that exhibit sustained elevations of blood granulocytes and monocytes. *Blood* . 1995, 85[9]: p.2364-2370.
234. Metchnikoff E. Lecture VII. In Lectures on the Comparative Pathology of Inflammation. Delivered at Pasteur Institute in 1891. F.A. Starling and E.H. Starling, translators. Dover, New York. 1891, p.106-153.

235. Mignon A., Rouquet N., and Joulin V. Les caspases, les protéases à cystéine de l'apoptose : un enjeu thérapeutique pour demain? *Med.Sci.* 1998, 14: p.9-17.
236. Mignotte B., Zamzami N., Petit P. X., Vayssière J. L., and Kroemer G. Contrôle mitochondrial de l'apoptose : la mort cellulaire programmée est-elle apparue à la suite de l'événement endosymbiotique à l'origine des mitochondries ? *Med.Sci.* 1998, 14: p.54-60.
237. Miyashita T., Mami U., Inoue T., Reed J. C., and Yamada M. Bcl-2 relieves the trans-repressive function of the glucocorticoid receptor and inhibits the activation of CPP32-like cysteine proteases. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1997, 233[3]: p.781-787.
238. Mocsai A., Banfi B., Kapus A., Farkas G., Geiszt M., Buday L., Farago A., and Ligeti E. Differential effects of tyrosine kinase inhibitors and an inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade on degranulation and superoxide production of human neutrophil granulocytes. *Biochem.Pharmacol.* 1997, 54[7]: p.781-789.
239. Mocsai A., Jakus Z., Vantus T., Berton G., Lowell C. A., and Ligeti E. Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. *J.Immunol.* 2000, 164[8]: p.4321-4331.
240. Mocsai A., Ligeti E., Lowell C. A., and Berton G. Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J.Immunol.* 1999, 162[2]: p.1120-1126.
241. Moraes T.J. and Downey G. P. Neutrophil cell signaling in infection: role of phosphatidylinositide 3-kinase. *Microbes.Infect.* 2003, 5[14]: p.1293-1298.
242. Moser R., Schleiffenbaum B., Groscurth P., and Fehr J. Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate human vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage. *J.Clin.Invest.* 1989, 83[2]: p.444-455.
243. Mosser D.D., Caron A. W., Bourget L., Meriin A. B., Sherman M. Y., Morimoto R. I., and Massie B. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol.Cell Biol.* 2000, 20[19]: p.7146-7159.
244. Mouse phenome database web site. The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME. <http://www.jax.org/phenome>. 2004.
245. Mouy R. and Haddad E. Anomalies héréditaires des phagocytes. *Encycl. Méd. Chir.; Hématologie.* 1996.
246. Muller W.A., Weigl S. A., Deng X., and Phillips D. M. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J.Exp.Med.* 1993, 178[2]: p.449-460.
247. Nagaji J. The role of protein kinase C and [Ca²⁺]_i in superoxide anion synthesis and myeloperoxidase degranulation of human neutrophils. *Kurume Med.J.* 1999, 46[3-4]: p.157-162.
248. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997, 88[3]: p.355-365.
249. Nahas N., Molski T. F., Fernandez G. A., and Sha'afi R. I. Tyrosine phosphorylation and activation of a new mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascade in human neutrophils stimulated with various agonists. *Biochem.J.* 1996, 318[Pt 1]: p.247-253.
250. Nakao S., Moriya Y., Furuyama S., Niederman R., and Sugiya H. Propionic acid stimulates superoxide generation in human neutrophils. *Cell Biol.Int.* 1998, 22[5]: p.331-337.
251. Nanamori M., Cheng X., Mei J., Sang H., Xuan Y., Zou C., Wang M. W., and Ye R. D. A novel nonpeptide ligand for formyl peptide receptor-like 1. *Mol.Pharmacol.* 2004.
252. Newmeyer D.D. and Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell.* 2003, 112[4]: p.481-490.
253. Ng F.W. and Shore G. C. Bcl-XL cooperatively associates with the Bap31 complex in the endoplasmic reticulum, dependent on procaspase-8 and Ced-4 adaptor. *J.Biol.Chem.* 1998, 273[6]: p.3140-3143.

254. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* .1992, 258[5082]: p.607-614.
255. Nitschke L., Floyd H., Ferguson D. J., and Crocker P. R. Identification of CD22 ligands on bone marrow sinusoidal endothelium implicated in CD22-dependent homing of recirculating B cells. *J.Exp.Med.*1999, 189[9]: p.1513-1518.
256. Nusse O., Serrander L., Foyouzi-Youssefi R., Monod A., Lew D. P., and Krause K. H. Store-operated Ca²⁺ influx and stimulation of exocytosis in HL-60 granulocytes. *J.Biol.Chem.*1997, 272[45]: p.28360-28367.
257. Nusse O., Serrander L., Lew D. P., and Krause K. H. Ca²⁺-induced exocytosis in individual human neutrophils. *EMBO J.*1998, 17[5]: p.1279-1288.
258. O'Dowd Y.M., el Benna J., Perianin A., and Newsholme P. Inhibition of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated respiratory burst in human neutrophils by adrenaline: inhibition of Phospholipase A2 activity but not p47phox phosphorylation and translocation. *Biochem.Pharmacol.*2004, 67[1]: p.183-190.
259. O'Reilly L.A., Huang D. C., and Strasser A. The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *EMBO J.*1996, 15[24]: p.6979-6990.
260. O'Shea J.J., Brown E. J., Seligmann B. E., Metcalf J. A., Frank M. M., and Gallin J. I. Evidence for distinct intracellular pools of receptors for C3b and C3bi in human neutrophils. *J.Immunol.*1985, 134[4]: p.2580-2587.
261. Offermanns S. and Simon M. I. Genetic analysis of mammalian G-protein signalling. *Oncogene* .1998, 17[11 Reviews]: p.1375-1381.
262. Olofsson T., Gartner I., and Olsson I. Separation of human bone marrow cells in density gradients of polyvinylpyrrolidone coated silica gel (Percoll). *Scand.J.Haematol.*1980, 24[3]: p.254-262.
263. Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death.Differ.*2003, 10[4]: p.431-442.
264. Osmond D.G., Rico-Vargas S., Valenzona H., Fauteux L., Liu L., Janani R., Lu L., and Jacobsen K. Apoptosis and macrophage-mediated cell deletion in the regulation of B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *Immunol.Rev.*1994, 142:209-30.: p.209-230.
265. Ottonello L., Tortolina G., Amelotti M., and Dallegri F. Soluble Fas ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J.Immunol.*1999, 162[6]: p.3601-3606.
266. Pang L., Sawada T., Decker S. J., and Saltiel A. R. Inhibition of MAP kinase kinase blocks the differentiation of PC-12 cells induced by nerve growth factor. *J.Biol.Chem.*1995, 270[23]: p.13585-13588.
267. Papadaki H.A. and Eliopoulos G. D. The role of apoptosis in the pathophysiology of chronic neutropenias associated with bone marrow failure. *Cell Cycle* .2003, 2[5]: p.447-451.
268. Park J.W., Hoyal C. R., Benna J. E., and Babior B. M. Kinase-dependent activation of the leukocyte NADPH oxidase in a cell-free system. Phosphorylation of membranes and p47(PHOX) during oxidase activation. *J.Biol.Chem.*1997, 272[17]: p.11035-11043.
269. Parone P.A., James D., and Martinou J. C. Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* .2002, 84[2-3]: p.105-111.
270. Parry M.F., Root R. K., Metcalf J. A., Delaney K. K., Kaplow L. S., and Richar W. J. Myeloperoxidase deficiency: prevalence and clinical significance. *Ann.Intern.Med.*1981, 95[3]: p.293-301.
271. Pelus L.M., Bian H., King A. G., and Fukuda S. Neutrophil-derived MMP-9 mediates synergistic mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells by the combination of G-CSF and the chemokines GRObeta/CXCL2 and GRObetaT/CXCL2delta4. *Blood* .2004, 103[1]: p.110-119.

272. Perez H.D., Marder S., Elfman F., and Ives H. E. Human neutrophils contain subpopulations of specific granules exhibiting different sensitivities to changes in cytosolic free calcium. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1987, 145[2]: p.976-981.
273. Perianayagam M.C., Balakrishnan V. S., King A. J., Pereira B. J., and Jaber B. L. C5a delays apoptosis of human neutrophils by a phosphatidylinositol 3-kinase-signaling pathway. *Kidney Int.* 2002, 61[2]: p.456-463.
274. Philchenkov A. Caspases: potential targets for regulating cell death. *J.Cell Mol.Med.* 2004, 8[4]: p.432-444.
275. Piali L., Hammel P., Uherek C., Bachmann F., Gisler R. H., Dunon D., and Imhof B. A. CD31/PECAM-1 is a ligand for alpha v beta 3 integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. *J.Cell Biol.* 1995, 130[2]: p.451-460.
276. Poirey S., Gutknecht E., Giller T., Valdenaire O., and Leroy X. Rapid identification of compounds binding GPCRs with Phage-Display: Discovery of peptidi antagonists of FPRL1. *3rd international meeting: G Protein-coupled receptors: new insights into signaling and regulation; Paris, France.* 2003.
277. Polla B.S., Banzet N., Dall'Ava J., Arrigo A. P., and Vignola A. M. Les mitochondries, carrefour entre vie et mort cellulaire : rôles des HSP et conséquences sur l'inflammation. *Med.Sci.* 1998, 14: p.18-25.
278. Pongracz J., Deacon E. M., Johnson G. D., Burnett D., and Lord J. M. Dopamine induces cell death but not differentiation of U937 cells: evidence for the involvement of PKC-beta 1 in the regulation of apoptosis. *Leuk.Res.* 1996, 20[4]: p.319-326.
279. Pongracz J., Webb P., Wang K., Deacon E., Lunn O. J., and Lord J. M. Spontaneous neutrophil apoptosis involves caspase 3-mediated activation of protein kinase C-delta. *J.Biol.Chem.* 1999, 274[52]: p.37329-37334.
280. Porter A.G., Ng P., and Janicke R. U. Death substrates come alive. *Bioessays* . 1997, 19[6]: p.501-507.
281. Prossnitz E.R. and Ye R. D. The N-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function. *Pharmacol.Ther.* 1997, 74[1]: p.73-102.
282. Pryde J.G., Walker A., Rossi A. G., Hannah S., and Haslett C. Temperature-dependent arrest of neutrophil apoptosis. Failure of Bax insertion into mitochondria at 15 degrees C prevents the release of cytochrome c. *J.Biol.Chem.* 2000, 275[43]: p.33574-33584.
283. Quinn M.T. and Gauss K. A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J.Leukoc.Biol.* 2004, 76[4]: p.760-781.
284. Rane M.J., Pan Y., Singh S., Powell D. W., Wu R., Cummins T., Chen Q., McLeish K. R., and Klein J. B. Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *J.Biol.Chem.* 2003, 278[30]: p.27828-27835.
285. Rausch P.G. and Moore T. G. Granule enzymes of polymorphonuclear neutrophils: A phylogenetic comparison. *Blood* . 1975, 46[6]: p.913-919.
286. Reeves E.P., Lu H., Jacobs H. L., Messina C. G., Bolsover S., Gabella G., Potma E. O., Warley A., Roes J., and Segal A. W. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* . 2002, 416[6878]: p.291-297.
287. Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat.Immunol.* 2002, 3[12]: p.1129-1134.
288. Riddell R.H. Pathology of idiopathic inflammatory bowel disease. In *Inflammatory bowel disease*. Kirsner J.B. and Shorter R.G. Editors. Lea and Febiger Publisher. Philadelphia. 1999, p.329-350.
289. Rossi A.G., Cousin J. M., Dransfield I., Lawson M. F., Chilvers E. R., and Haslett C. Agents that elevate cAMP inhibit human neutrophil apoptosis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1995, 217[3]: p.892-899.

290. Salamone G., Giordano M., Trevani A. S., Gamberale R., Vermeulen M., Schettinni J., and Geffner J. R. Promotion of neutrophil apoptosis by TNF-alpha. *J.Immunol.*2001, 166[5]: p.3476-3483.
291. Samuelsson B., Dahlen S. E., Lindgren J. A., Rouzer C. A., and Serhan C. N. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* .1987, 237[4819]: p.1171-1176.
292. Sasaki K., Iwatsuki H., Suda M., and Itano C. Accumulation and massive cell death of polymorphonuclear neutrophils in the developing bone marrow of the mouse: a histological study. *Acta Anat.(Basel)* .1995, 153[2]: p.111-118.
293. Sasaki T., Irie-Sasaki J., Jones R. G., Oliveira-dos-Santos A. J., Stanford W. L., Bolon B., Wakeham A., Itie A., Bouchard D., Koziaradzki I., Joza N., Mak T. W., Ohashi P. S., Suzuki A., and Penninger J. M. Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* .2000, 287[5455]: p.1040-1046.
294. Saverymuttu S.H., Peters A. M., Keshavarzian A., Reavy H. J., and Lavender J. P. The kinetics of 111indium distribution following injection of 111indium labelled autologous granulocytes in man. *Br.J.Haematol.*1985, 61[4]: p.675-685.
295. Savill J.S., Wyllie A. H., Henson J. E., Walport M. J., Henson P. M., and Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J.Clin.Invest* .1989, 83[3]: p.865-875.
296. Segal B.H., Leto T. L., Gallin J. I., Malech H. L., and Holland S. M. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)* .2000, 79[3]: p.170-200.
297. Semerad C.L., Liu F., Gregory A. D., Stumpf K., and Link D. C. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity*.2002, 17[4]: p.413-423.
298. Sengelov H., Follin P., Kjeldsen L., Lollike K., Dahlgren C., and Borregaard N. Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *J.Immunol.*1995, 154[8]: p.4157-4165.
299. Sengelov H., Kjeldsen L., and Borregaard N. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J.Immunol.*1993, 150[4]: p.1535-1543.
300. Seo J.K., Bae Y. S., Song H., Baek S. H., Kim B. S., Choi W. S., Suh P. G., and Ryu S. H. Distribution of the receptor for a novel peptide stimulating phosphoinositide hydrolysis in human leukocytes. *Clin.Biochem.*1998, 31[3]: p.137-141.
301. Seo J.K., Choi S. Y., Kim Y., Baek S. H., Kim K. T., Chae C. B., Lambeth J. D., Suh P. G., and Ryu S. H. A peptide with unique receptor specificity: stimulation of phosphoinositide hydrolysis and induction of superoxide generation in human neutrophils. *J.Immunol.*1997, 158[4]: p.1895-1901.
302. Serrander L., Skarman P., Rasmussen B., Witke W., Lew D. P., Krause K. H., Stendahl O., and Nüsse O. Selective inhibition of IgG-mediated phagocytosis in gelsolin-deficient murine neutrophils. *J.Immunol.*2000, 165[5]: p.2451-2457.
303. Sheppard R.C. and Atherton E. Solid phase peptide synthesis, a practical approach. Rickwood D. and Hames B. Editors. Oxford University Press. 1989.
304. Shibata H., Suzuki Y., Omata W., Tanaka S., and Kojima I. Dissection of GLUT4 recycling pathway into exocytosis and endocytosis in rat adipocytes. Evidence that GTP-binding proteins are involved in both processes. *J.Biol.Chem.*1995, 270[19]: p.11489-11495.
305. Shohat G., Spivak-Kroizman T., Eisenstein M., and Kimchi A. The regulation of death-associated protein (DAP) kinase in apoptosis. *Eur.Cytokine Netw.*2002, 13[4]: p.398-400.
306. Shukla A., Berglund L., Nielsen L. P., Nielsen S., Hoffmann H. J., and Dahl R. Regulated exocytosis in immune function: are SNARE-proteins involved? *Respir.Med.*2000, 94[1]: p.10-17.

307. Simchowitz L., Fischbein L. C., Spilberg I., and Atkinson J. P. Induction of a transient elevation in intracellular levels of adenosine-3',5'-cyclic monophosphate by chemotactic factors: an early event in human neutrophil activation. *J.Immunol.*1980, 124[3]: p.1482-1491.
308. Sitar G. and Fornasari P. Physical procedures for the separation of blood and marrow cells. *Haematologica* .1989, 74[1]: p.95-111.
309. Smallwood J.I. and Malawista S. E. Protein kinase C isoforms in human neutrophil cytoplasts. *J.Leukoc.Biol.*1992, 51[1]: p.84-92.
310. Smedly L.A., Tonnesen M. G., Sandhaus R. A., Haslett C., Guthrie L. A., Johnston R. B., Jr., Henson P. M., and Worthen G. S. Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. *J.Clin.Invest* .1986, 77[4]: p.1233-1243.
311. Smith A.L., Redding G., Doershuk C., Goldmann D., Gore E., Hilman B., Marks M., Moss R., Ramsey B., Rubio T., and . Sputum changes associated with therapy for endobronchial exacerbation in cystic fibrosis. *J.Pediatr.*1988, 112[4]: p.547-554.
312. Snyderman R. and Uhing R. J. Chemoattractant stimulus-response coupling. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. Gallin,J.I.; Goldstein IM; Snyderman,R. Editors. Raven Press. New York. 1992, p.421-439.
313. Sollner T., Whiteheart S. W., Brunner M., Erdjument-Bromage H., Geromanos S., Tempst P., and Rothman J. E. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* .1993, 362[6418]: p.318-324.
314. Spik G., Strecker G., Fournet B., Bouquelet S., Montreuil J., Dorland L., van Halbeek H., and Vliegthart J. F. Primary structure of the glycans from human lactotransferrin. *Eur.J.Biochem.* 1982, 121[2]: p.413-419.
315. Spisani S., Pareschi M. C., Buzzi M., Colamussi M. L., Biondi C., Traniello S., Pagani Z. G., Paglialunga P. M., Torrini I., and Ferretti M. E. Effect of cyclic AMP level reduction on human neutrophil responses to formylated peptides. *Cell Signal.*1996, 8[4]: p.269-277.
316. Srinivasan A., Foster L. M., Testa M. P., Ord T., Keane R. W., Bredesen D. E., and Kayalar C. Bcl-2 expression in neural cells blocks activation of ICE/CED-3 family proteases during apoptosis. *J.Neurosci.*1996, 16[18]: p.5654-5660.
317. Srinivasula S.M., Ahmad M., MacFarlane M., Luo Z., Huang Z., Fernandes-Alnemri T., *et al* Alnemri E. S. Generation of constitutively active recombinant caspases-3 and -6 by rearrangement of their subunits. *J.Biol.Chem.*1998, 273[17]: p.10107-10111.
318. Staunton D.E., Dustin M. L., and Springer T. A. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* .1989, 339[6219]: p.61-64.
319. Steadman R., Petersen M. M., and Williams J. D. Human neutrophil secondary granule exocytosis is independent of protein kinase activation and is modified by calmodulin activity. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*1996, 28[7]: p.777-786.
320. Steinhagen D. Structural and physiological aspects of cell death. *Symp.Soc.Exp.Biol.*2004, [55]: p.1-12.
321. Stewart J.M. and Young J. D. Solid Phase Peptide Synthesis. Freeman W.H. Editors, San Francisco. 1969.
322. Sugawara T., Miyamoto M., Takayama S., and Kato M. Separation of neutrophils from blood in human and laboratory animals and comparison of the chemotaxis. *J.Pharmacol.Toxicol.Methods* .1995, 33[2]: p.91-100.
323. Suratt B.T., Young S. K., Lieber J., Nick J. A., Henson P. M., and Worthen G. S. Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* .2001, 281[4]: p.L913-L921.

324. Susin S.A., Lorenzo H. K., Zamzami N., Marzo I., Snow B. E., Brothers G. M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D. R., Aebersold R., Siderovski D. P., Penninger J. M., and Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* .1999, 397[6718]: p.441-446.
325. Svensson L., Dahlgren C., and Weneras C. The chemoattractant Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met activates eosinophils through the formyl peptide receptor and one of its homologues, formyl peptide receptor-like 1. *J.Leukoc.Biol.*2002, 72[4]: p.810-818.
326. Takano T., Fiore S., Maddox J. F., Brady H. R., Petasis N. A., and Serhan C. N. Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 (LXA4) and LXA4 stable analogues are potent inhibitors of acute inflammation: evidence for anti-inflammatory receptors. *J.Exp.Med.*1997, 185[9]: p.1693-1704.
327. Talanian R.V., Quinlan C., Trautz S., Hackett M. C., Mankovich J. A., Banach D., Ghayur T., Brady K. D., and Wong W. W. Substrate specificities of caspase family proteases. *J.Biol.Chem.*1997, 272[15]: p.9677-9682.
328. Tamatani T., Turk P., Weitzman S., and Oyasu R. Tumorigenic conversion of a rat urothelial cell line by human polymorphonuclear leukocytes activated by lipopolysaccharide. *Jpn.J.Cancer Res.* 1999, 90[8]: p.829-836.
329. Tamura D.Y., Moore E. E., Partrick D. A., Johnson J. L., Zallen G., and Silliman C. C. Primed neutrophils require phosphatidic acid for maximal receptor-activated elastase release. *J.Surg.Res.*1998, 77[1]: p.71-74.
330. Taneja R., Parodo J., Jia S. H., Kapus A., Rotstein O. D., and Marshall J. C. Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity. *Crit Care Med.*2004, 32[7]: p.1460-1469.
331. Thome M., Hofmann K., Burns K., Martinon F., Bodmer J. L., Mattmann C., and Tschopp J. Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1. *Curr.Biol.*1998, 8[15]: p.885-888.
332. Thompson C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* .1995, 267[5203]: p.1456-1462.
333. Toker A. Signaling through protein kinase C. *Front Biosci.*1998, 3: p.D1134-D1147.
334. Tuluc F., Meshki J., and Kunapuli S. P. Membrane lipid microdomains differentially regulate intracellular signaling events in human neutrophils. *Int.Immunopharmacol.*2003, 3[13-14]: p.1775-1790.
335. Van Damme J., Rampart M., Conings R., Decock B., Van Osselaer N., Willems J., and Billiau A. The neutrophil-activating proteins interleukin 8 and beta-thromboglobulin: in vitro and in vivo comparison of NH2-terminally processed forms. *Eur.J.Immunol.*1990, 20[9]: p.2113-2118.
336. Van Spriel A.B., Leusen J. H., van Egmond M., Dijkman H. B., Assmann K. J., Mayadas T. N., and van de Winkel J. G. Mac-1 (CD11b/CD18) is essential for Fc receptor-mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation. *Blood* .2001, 97[8]: p.2478-2486.
337. Vereycken V., Bucherer C., Lacombe C., and Lelievre J. C. [A study of leukocyte chemotaxis in a glass micropipette]. *J.Mal Vasc.*1995, 20[2]: p.113-116.
338. Verfaillie C.M. Adhesion receptors as regulators of the hematopoietic process. *Blood* .1998, 92[8]: p.2609-2612.
339. Verghese M.W., Fox K., McPhail L. C., and Snyderman R. Chemoattractant-elicited alterations of cAMP levels in human polymorphonuclear leukocytes require a Ca²⁺-dependent mechanism which is independent of transmembrane activation of adenylate cyclase. *J.Biol.Chem.*1985, 260[11]: p.6769-6775.
340. Vermeulen M., Le Pesteur F., Gagnerault M. C., Mary J. Y., Sainteny F., and Lepault F. Role of adhesion molecules in the homing and mobilization of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* .1998, 92[3]: p.894-900.

341. Vidarsson G. and van de Winkel J. G. Fc receptor and complement receptor-mediated phagocytosis in host defence. *Current Opinion in Infectious Diseases*.1998, 11[3]: p.271-278.
342. Videm V. and Strand E. Changes in neutrophil surface-receptor expression after stimulation with FMLP, endotoxin, interleukin-8 and activated complement compared to degranulation. *Scand.J.Immunol*.2004, 59[1]: p.25-33.
343. Vieira O.V., Botelho R. J., Rameh L., Brachmann S. M., Matsuo T., Davidson H. W., Schreiber A., Backer J. M., Cantley L. C., and Grinstein S. Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J.Cell Biol*.2001, 155[1]: p.19-25.
344. Villunger A., O'Reilly L. A., Holler N., Adams J., and Strasser A. Fas ligand, Bcl-2, granulocyte colony-stimulating factor, and p38 mitogen-activated protein kinase: Regulators of distinct cell death and survival pathways in granulocytes. *J.Exp.Med*.2000, 192[5]: p.647-658.
345. Wang Z.G. and Ye R. D. Characterization of two new members of the formyl peptide receptor gene family from 129S6 mice. *Gene* .2002, 299[1-2]: p.57-63.
346. Ward C., Wong T. H., Murray J., Rahman I., Haslett C., Chilvers E. R., and Rossi A. G. Induction of human neutrophil apoptosis by nitric oxide donors: evidence for a caspase-dependent, cyclic-GMP-independent, mechanism. *Biochem.Pharmacol*.2000, 59[3]: p.305-314.
347. Waterman W.H. and Sha'afi R. I. A mitogen-activated protein kinase independent pathway involved in the phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 in human neutrophils stimulated with tumor necrosis factor-alpha. *Biochem.Biophys.Res.Commun*.1995, 209[1]: p.271-278.
348. Watson R.W. Redox regulation of neutrophil apoptosis. *Antioxid.Redox.Signal*.2002, 4[1]: p.97-104.
349. Watson R.W., Redmond H. P., Wang J. H., Condron C., and Bouchier-Hayes D. Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of Escherichia coli. *J.Immunol*.1996, 156[10]: p.3986-3992.
350. Watson R.W., Rotstein O. D., Parodo J., Bitar R., and Marshall J. C. The IL-1 beta-converting enzyme (caspase-1) inhibits apoptosis of inflammatory neutrophils through activation of IL-1 beta. *J.Immunol*.1998, 161[2]: p.957-962.
351. Webb P.R., Wang K. Q., Scheel-Toellner D., Pongracz J., Salmon M., and Lord J. M. Regulation of neutrophil apoptosis: a role for protein kinase C and phosphatidylinositol-3-kinase. *Apoptosis*.2000, 5[5]: p.451-458.
352. Weinberg ED. Acquisition of iron and other nutrients in vivo. In Virulence mechanisms of bacterial pathogens, 2nd edition. J.A. Roth et al. Editors. American Society for Microbiology. Washington D.C. 1995, p.79-93.
353. Weiss S.J. Tissue destruction by neutrophils. *N.Engl.J.Med*.1989, 320[6]: p.365-376.
354. Weitzman S.A., Weitberg A. B., Clark E. P., and Stossel T. P. Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils. *Science* .1985, 227[4691]: p.1231-1233.
355. Wenzel-Seifert K., Krautwurst D., Musgrave I., and Seifert R. Thapsigargin activates univa. *Biochem.J*.1996, 314 (Pt 2): p.679-686.
356. Whelan R.D. and Parker P. J. Loss of protein kinase C function induces an apoptotic response. *Oncogene* .1998, 16[15]: p.1939-1944.
357. Whyte M.K., Meagher L. C., MacDermot J., and Haslett C. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J.Immunol*.1993, 150[11]: p.5124-5134.
358. Winkelstein J.A., Marino M. C., Johnston R. B., Jr., Boyle J., Curnutte J., Gallin J. I., Malech H. L., Holland S. M., Ochs H., Quie P., Buckley R. H., Foster C. B., Chanock S. J., and Dickler H. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)* .2000, 79[3]: p.155-169.

359. Witko-Sarsat V., Rieu P., Descamps-Latscha B., Lesavre P., and Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* .2000, 80[5]: p.617-653.
360. Wolvetang E.J., Johnson K. L., Krauer K., Ralph S. J., and Linnane A. W. Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis. *FEBS Lett*.1994, 339[1-2]: p.40-44.
361. Wright D.G., Bralove D. A., and Gallin J. I. The differential mobilization of human neutrophil granules. Effects of phorbol myristate acetate and ionophore A23187. *Am.J.Pathol*.1977, 87[2]: p.237-284.
362. Wu D., Huang C. K., and Jiang H. Roles of phospholipid signaling in chemoattractant-induced responses. *J.Cell Sci*.2000, 113[Pt 17]: p.2935-2940.
363. Wyllie A.H., Kerr J. F., and Currie A. R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int.Rev.Cytol*.1980, 68: p.251-306.
364. Yamashita K., Takahashi A., Kobayashi S., Hirata H., Mesner P. W., Jr., Kaufmann S. H., Yonehara S., Yamamoto K., Uchiyama T., and Sasada M. Caspases mediate tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production. *Blood* .1999, 93[2]: p.674-685.
365. Yamauchi K., Tomita M., Giehl T. J., and Ellison R. T., III. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infect.Immun*.1993, 61[2]: p.719-728.
366. Yang E., Zha J., Jockel J., Boise L. H., Thompson C. B., and Korsmeyer S. J. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* .1995, 80[2]: p.285-291.
367. Yang K.Y., Arcaroli J., Kupfner J., Pitts T. M., Park J. S., Strasshiem D., Perng R. P., and Abraham E. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase gamma in neutrophil apoptosis. *Cell Signal*.2003, 15[2]: p.225-233.
368. Yasui K. and Komiyama A. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase D in temporal activation of superoxide production in FMLP-stimulated human neutrophils. *Cell Biochem.Funct* . 2001, 19[1]: p.43-50.
369. Yin X.M. Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways. *Cell Res*.2000, 10[3]: p.161-167.
370. Zu Y.L., Qi J., Gilchrist A., Fernandez G. A., Vazquez-Abad D., Kreutzer D. L., Huang C. K., and Sha'afi R. I. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for human neutrophil function triggered by TNF-alpha or FMLP stimulation. *J.Immunol*.1998, 160[4]: p.1982-1989.

Publications

1875

Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils

Rachel Boxio,¹ Carine Bossenmeyer-Pouré, Natacha Steinckwich, Christian Dournon, and Oliver Nüße²

EA 3442: Laboratoire de Biologie Expérimentale-Immunologie, Faculté des Sciences, Université de Nancy 1, Vandoeuvre, France

Abstract: The mouse has become an important model for immunological studies including innate immunity. Creating transgenic mice offers unique possibilities to study gene-function relationships. However, relatively little is known about the physiology of neutrophils from wild-type mice. Do they behave like human neutrophils, or are there species-specific differences that need to be considered when extrapolating results from mice to humans? How do we isolate neutrophils from mice? For practical reasons, many studies on mouse neutrophils are done with bone marrow cells. However, human bone marrow neutrophils appear to be heterogeneous and functionally immature. We have isolated and compared neutrophils from mouse bone marrow and from peripheral blood obtained by tail bleeding. Using the same Percoll[®] density gradient for both preparations, we have obtained morphologically mature neutrophils from bone marrow and blood. Both cell populations responded to formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF) with primary and secondary granule release and superoxide production. Quantitative analysis of our data revealed minor differences between cells from bone marrow and blood. Superoxide production and primary granule release were stimulated at lower fMLF concentrations in blood neutrophils. However, the amplitude and the kinetics of maximal responses were similar. The principal difference was the lifespan of the two cell populations. Bone marrow cells survived significantly longer in culture, which may suggest that they are receiving antiapoptotic signals that are absent in the blood. Our data suggest that mice have a large reservoir of functionally competent neutrophils in their bone marrow. This reservoir may be needed to replace circulating neutrophils rapidly during infection. *J. Leukoc. Biol.* 75: 604–611; 2004.

Key Words: isolation method · fMLF stimulation · exocytosis · NADPH oxidase · lifespan

INTRODUCTION

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) are the first line of defense against bacterial infections (reviewed in ref. [1]). They

are designed to phagocytose bacteria and kill them by releasing the contents of their cytoplasmic granules into the phagosome and by producing reactive oxygen intermediates (ROIs). These bactericidal functions are essential for the host defense. However, several chronic inflammatory diseases such as cystic fibrosis or inflammatory bowel disease are associated with a massive influx of PMN. Overactivation of these cells contributes to destruction of host tissue. The search for new treatment opportunities in chronic inflammation requires a better understanding of control mechanisms in neutrophil granule release and oxygen radical production. Neutrophils belong to the myeloid lineage, which multiplies and differentiates in the bone marrow. Mature neutrophils are stored in the bone marrow for several days and then released into the blood, where they remain for only a few hours [2] before dying or migrating into tissues. Normal PMN turnover in humans is mediated by apoptosis, a process that presumably down-regulates proinflammatory and microbicidal functions and prepares these cells for removal from the tissue by macrophages [3]. Morphologically mature neutrophils have also been identified in the bone marrow of humans and mice, but they were found to be functionally immature [4]. The signals that retain immature neutrophils in the bone marrow and regulate the level of mature neutrophils in the blood are poorly understood. We wanted to determine whether neutrophils become functionally mature before or after entering the bloodstream.

Understanding cellular functions on the molecular level has been greatly enhanced by the possibility to mutate, suppress, or overexpress individual genes. However, primary human neutrophils are too short-lived for those techniques, and the cell-culture models for neutrophils do not fully differentiate and are difficult to transfect. This has prompted a renewed interest into mouse neutrophils, which could be obtained from genetically modified animals. The number of neutrophils that can be obtained from mouse blood is very limited [5]. Therefore, many researchers use bone marrow preparations to study neutrophils in mice. How are the functional characteristics of

¹ Correspondence: University Henri Poincaré-Nancy I, Science Faculty, EA 3442, Boulevard des Aiguillettes BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France. E-mail: Rachel.Boxio@sbiol.uhp-nancy.fr

² Current address: INSERM U442, University Paris 11, 91405 Orsay, France.

Received July 21, 2003; revised October 29, 2003; accepted November 12, 2003; doi: 10.1189/jlb.0703340.

these cells compared with blood neutrophils? Is it possible to obtain functionally mature neutrophils from mouse bone marrow?

We wanted to improve our knowledge about the physiology of mouse neutrophils and to compare the functional capacities of bone marrow and blood neutrophils. Here, we present evidence that a subpopulation of mouse bone marrow leukocytes consists of functionally mature neutrophils.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of mouse neutrophils from peripheral blood

Mouse blood ($350 \pm 50 \mu\text{l}$ per animal) was collected by tail bleeding from C57BL6 mice (Depre, Saint Doulchard, France) into Hanks' balanced saline solution (HBSS)-EDTA [HBSS without calcium, magnesium, phenol red, and sodium bicarbonate; pH 7.2, 15 mM EDTA, bovine serum albumin (BSA), 1%; ref. 5]. After centrifugation (400 g, 10 min, 4°C), cells were resuspended in 1 ml HBSS-EDTA. The cells were laid on with a three-layer Percoll[®] gradient of 78%, 69%, and 52% Percoll (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), respectively, diluted in HBSS (100% Percoll=nine parts Percoll and one part 10× HBSS), and centrifuged (1500 g, 30 min, room temperature) without braking. The refractive index (RI) of each Percoll layer was determined, and the density (δ) of the layer was calculated according to the manufacturer's information (52%, RI 1.347, $\delta=1.083 \text{ g/ml}$; 69%, RI 1.349, $\delta=1.090 \text{ g/ml}$; 78%, RI 1.350, $\delta=1.110 \text{ g/ml}$). The neutrophils from the 69%/78% interface and the upper part of the 78% layer were harvested into BSA 1%-coated tubes, after carefully removing the cells from the upper phases. After one wash with 2 ml HBSS-EDTA + BSA 1%, remaining red cells were eliminated by hypotonic lysis. After a final wash with 2 ml HEPES buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.2), $350,000 \pm 40,000$ cells were obtained per mouse, $97 \pm 1\%$ neutrophils, identified by staining the nuclei with Türk's reagent (Merck, Darmstadt, Germany). These cells were suspended in HEPES buffer + 9 mM glucose at 10^6 cells/ml and used within 6 h. On several occasions, isolated cells were analyzed by cytospin centrifugation followed by Wright-Giemsa coloration according to the manufacturer's instructions (Hemacolor, Merck). Chemicals were bought from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) unless indicated otherwise.

Preparation of mouse neutrophils from bone marrow

Mice were killed, the femur and the tibia from both hind legs were removed and freed of soft tissue attachments, and the extreme distal tip of each extremity was cut off [6]. HBSS-EDTA solution was forced through the bone with a syringe. After dispersing cell clumps, the cell suspension was centrifuged (400 g, 10 min, 4°C) and resuspended in 1 ml HBSS-EDTA. Cells were then treated on a three-layer Percoll gradient exactly as described above for blood cells. We obtained $6 \pm 0.6 \times 10^6$ cells per mouse, and $94 \pm 1\%$ of them were morphologically mature neutrophils (bands and segmented).

Preparation of human neutrophils

Human PMN were isolated from blood by 20% dextran (1:1) sedimentation at room temperature for 40 min. The leukocyte-rich upper fraction was collected, layered on a continuous Histopaque[®]-1077 gradient, and centrifuged (1000 g, 20 min, room temperature) without braking. The remaining red cells in the neutrophil pellet were eliminated by hypotonic lysis and spun down (300 g, 10 min, 4°C). After a final wash with 2 ml phosphate-buffered saline (PBS), staining the nuclei with Türk's reagent identified the neutrophils. Cells (1.5×10^8) were suspended in 200 μl PBS supplemented with 2% protease inhibitor cocktail. The isolated neutrophils were kept on ice until the experiments were performed within a few hours after the preparation.

Superoxide production

ROIs were quantified by measuring luminol-dependent chemiluminescence at 37°C using a Wallac 1420 multilabel counter (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) at approximately one measurement per well every 6 s. White polypropylene, 96-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were covered with BSA (1%, 1 h, 37°C). After coating, the plates were washed three times with HEPES buffer. Mouse neutrophils (2×10^4 cells) were suspended with 10 $\mu\text{g/ml}$ luminol, 5 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin B, 4 U/ml horseradish peroxidase, and HEPES buffer for a final volume of 200 μl per well. The cells were stimulated with formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF), and superoxide anion generation was measured by integrating photon counts for 5 min before and after agonist addition. The solvent control, dimethyl sulfoxide (DMSO), did not stimulate ROI production.

β -Glucuronidase release

To measure the release of the primary granules, we established a method of detecting the activity of the marker β -glucuronidase from the supernatants of stimulated mouse neutrophils. Tubes were coated with BSA (1%, 1 h, 37°C). Mouse neutrophils (2×10^4 cells) were suspended in these tubes in HEPES buffer + glucose for a final volume of 100 μl with 5 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin B (unless otherwise indicated). Cells were prewarmed for 10 min at 37°C before addition of various concentrations of fMLF, 1 μM A23187, 200 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), or solvent (DMSO) alone. After incubation at 37°C for 30 min, secretion was stopped by rapid cooling on ice and addition of 100 μl ice-cold HEPES buffer + glucose and was centrifuged (400 g, 10 min, 4°C). Duplicates of 50 μl supernatant were dispensed in 96-microwell plates, and 50 μl reaction medium [0.1 M sodium acetate, pH 4.0, 0.02% Triton X-100, 5 mM 4-methylumbelliferyl β -D-glucuronide (Roth, Karlsruhe, Germany)] was added. The reaction was stopped after 2 h at 37°C by adding 50 μl 0.3 M glycine/NaOH, pH 10.4, 10 mM EGTA. Fluorescence was quantified by using a Wallac 1420 multilabel counter with 365 nm excitation and 450 nm emission wavelength. β -Glucuronidase release from murine PMN is expressed as percent of release compared with the total content detected in supernatants of Triton X-100-lysed PMN. Background release in the presence of solvent was subtracted.

Lactoferrin release

Mouse neutrophils (2×10^4 cells) were suspended in 100 μl HEPES buffer + glucose with 5 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin B and were prewarmed for 10 min at 37°C before addition of various concentrations of fMLF, 1 μM A23187, 200 nM PMA, or solvent (DMSO) alone. After incubation at 37°C for 30 min, secretion was stopped by rapid cooling on ice and addition of 100 μl ice-cold buffer and was centrifuged (400 g, 10 min, 4°C). Supernatants or a solution of human lactoferrin (10–50 ng per well) were diluted twofold in carbonate buffer (90 mM NaHCO₃, 36 mM Na₂CO₃, pH 9.6) and were added to Nunc Maxisorp F96 immunoplate wells for 3 h at 37°C. Nonspecific binding sites were blocked with PBS-Tween 1%, supplemented with 2% BSA overnight at 4°C. PBS-Tween 1% was used for all subsequent steps, which were conducted at room temperature and separated by several washings. Rabbit anti-human lactoferrin antibody (dilution 1/1000) was added for 1 h, followed by goat peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G (IgG; dilution 1/10,000) for 1 h. 3,3',5,5'-Tetramethylethylenediamine (5 mg/ml; Interchim, Montluçon, France) in 100 mM acetate buffer, pH 6.0, 1.2% H₂O₂, was added for 15 min, followed by 750 mM H₂SO₄. Absorbance was read at 450 nm with a Wallac 1420 microplate reader, and the lactoferrin concentration was calculated using the human lactoferrin calibration curve. As data obtained with mouse samples could not be quantified exactly using standard curves done with human lactoferrin, lactoferrin release from murine PMN is expressed as fold increase compared with the amount detected in supernatants of unstimulated PMN [6].

Western blotting

The specificity of the anti-human lactoferrin antibody with murine lactoferrin was determined by Western blotting. Human and murine PMN suspensions were divided into two batches. One part was incubated in HEPES buffer with 200 nM PMA at 37°C for 30 min in the presence of 5 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin B. The other part was taken up in lysis buffer (20 mM Tris, 400 mM KCl, 20% glycerol, 2 mM dithiothreitol) for 20 min on ice and lysed by three cycles of freezing in liquid nitrogen/thawing on ice. Both batches were then spun down,

and the supernatant was solubilized in 4× concentrated sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) sample buffer and boiled for 10 min. Samples were run on a 10% SDS-PAGE, electroblotted onto nitrocellulose sheets (Hybond N, Amersham Pharmacia Biotech), blocked with 3% BSA, and probed with rabbit anti-human lactoferrin antibody (dilution 1/500) followed by goat peroxidase-conjugated, anti-rabbit IgG (dilution 1/10,000) in PBS-Tween 1%, BSA 3%. Signal was developed and analyzed using a chemiluminescence substrate (Roche Diagnostics France S.A, Meylan), autoradiographic film (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech), and the GelDoc2000 imaging system (BioRad, Hercules, CA).

Viability of neutrophils in culture

Neutrophils from mouse blood and bone marrow were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 100 U/ml penicillin and streptomycin on 96-well plates (20,000 cells/50 μ l/well) for up to 48 h at 5% CO₂, 37°C. The bioluminescence of adenosine 5'-triphosphate (ATP) was used as a marker of cell viability using the Cell Titer Glo™ luminescent cell viability assay (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. The luminescence was read on the Wallac 1420 plate reader and reported to a standard curve for the determination of the number of viable cells.

Analysis and statistics

Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was tested with unpaired Student's *t*-test; *P* values below 0.05 were considered significant. Sigmoidal and exponential fits were performed in Origin (Microcal, Northampton, MA). The half-life of the cells was determined as $t_{1/2} = 0.693 \times \tau$, with τ being the time constant of the exponential decay fit.

RESULTS

Isolation of morphologically mature neutrophils from mouse bone marrow

Leukocytes change their buoyant density during differentiation. Mature neutrophils have a higher density than their precursors and can thus be isolated by density gradient centrifugation [7]. Using a discontinuous, three-layer Percoll density gradient, we were able to isolate morphologically mature cells from mouse blood and bone marrow (Fig. 1, A and B). Cells from both preparations have a donut-shaped, segmented nucleus, typical for mouse neutrophils. The cells from bone marrow and blood have similar diameter in cytopsin preparations ($10.12 \pm 0.11 \mu\text{m}$ and $10.57 \pm 0.21 \mu\text{m}$, $n=71$ and 53, respectively). The nuclei of bone marrow PMN appeared less condensed, which might indicate that they were slightly less mature than the cells isolated from blood. Biermann et al. [9] reported that some mouse leukocytes with ring-like nuclei are monocytic instead of granulocytic. Based on their morphologic criteria, a small minority of the cells in our preparation might belong to this category.

Isolation of neutrophils from the bone marrow allowed us to extract 17-fold the number of neutrophils per mouse when compared with the isolation of neutrophils from peripheral blood (Fig. 1C). The percentage of recovery was calculated according to the values given by Chervenick et al. [8], knowing that leukocyte counts are reported to be variable in mice and to be influenced by a variety of factors [10]. Chervenick et al. [8] reported that the marrow hematopoietic tissue in a mouse contained 12×10^6 nucleated cells per gram of body weight, of which 18.7% was in tibias and femurs. Neutrophils and neutrophil precursors constituted $\sim 40\%$ of marrow cells as

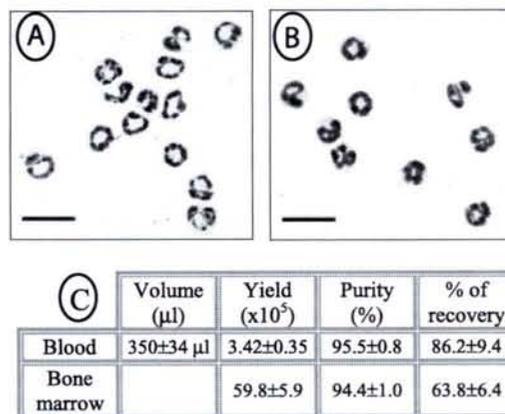


Fig. 1. Neutrophil isolation from blood and bone marrow. PMN were isolated by centrifugation over a three-layer Percoll® gradient. The photographs show cytopsin preparations of cells from the 69%/78% interface stained by Giemsa coloration. A large majority of donut-shaped nuclei was found in bone marrow PMN (A) and blood PMN (B). Original scale bar = 20 μm . (C) Comparison of yield and purity and percent of recovery of blood and bone marrow neutrophil populations isolated as described in Materials and Methods. Mean \pm SEM; $n = 23-27$. Recovery was calculated using the values of Chervenick et al. [8].

determined by Wright's stain and peroxidase staining. Forty-three percent of these marrow neutrophils were bands and segmented cells that are considered to constitute the effective storage compartment of marrow, as they seem to be the only cells that are released to the blood in large numbers under ordinary circumstances [8]. According to these values, we recovered over 60% of the morphologically mature neutrophils from the bone marrow. The recovery from blood was over 85%, suggesting that mouse blood PMN have a fairly homogenous density.

Only few studies have compared the functional characteristics of bone marrow and blood neutrophils, and to our knowledge, none of these studies was done on mice. We concentrated on the bactericidal functions that can be induced by the bacterial peptide fMLF, which has been widely used to characterize human neutrophils. These functions are the generation of ROIs by the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase as well as the release of secondary and primary granules [1].

fMLF-induced superoxide production from blood and bone marrow mouse neutrophils

We established a method, which determined the amount of ROIs by luminol-dependent chemiluminescence and which allows a quantification of the production of free radicals on few cells (20,000 cells per well). To investigate the patterns of the respiratory burst in blood and bone marrow neutrophils, cytochalasin B-pretreated cells were stimulated with 3 μM fMLF, and the superoxide production was recorded 5 min before and 5 min after the stimulation (Fig. 2A). As expected from human neutrophils, fMLF induced a rapid and transient production of ROIs. Compared with peripheral blood neutrophils, the bone marrow cells showed no defect in superoxide release upon stimulation with fMLF.

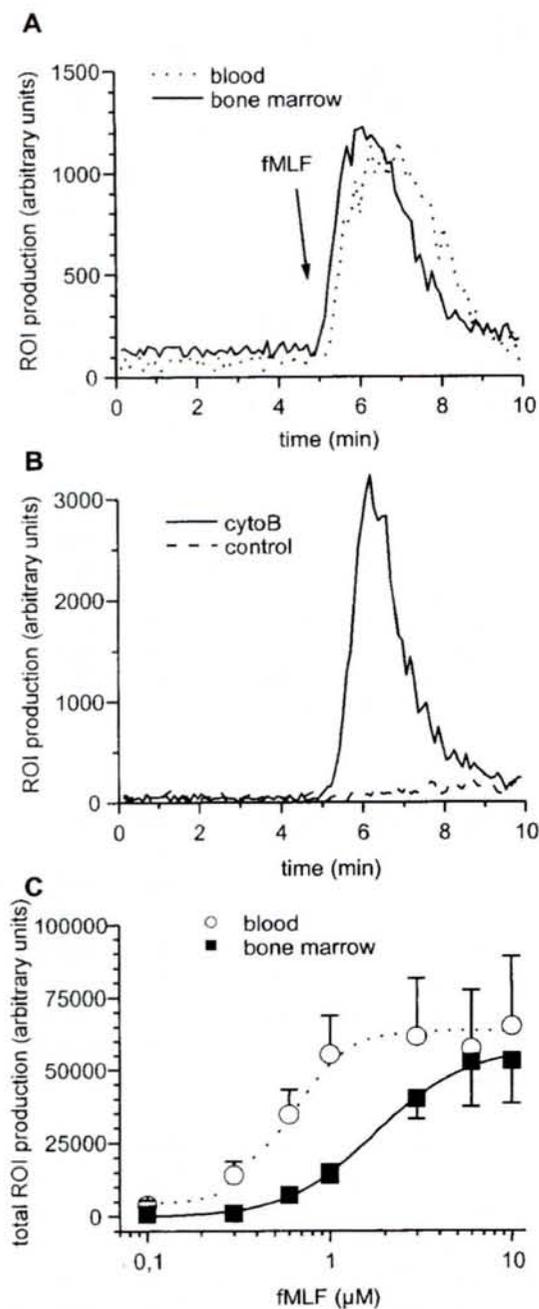


Fig. 2. fMLF-induced superoxide production from blood and bone marrow neutrophils. ROI production was determined by luminol-enhanced chemiluminescence. (A) Kinetics of production by blood (broken line) and bone marrow (solid line) neutrophil oxidative burst. Cells were incubated at 37°C in the presence of cytochalasin B (5 μg/ml) for 5 min before stimulation with 3 μM fMLF. This figure shows a representative experiment; $n \geq 6$. (B) Effect of cytochalasin B (cytoB): Bone marrow cells were preincubated at 37°C in the presence (solid line) of or in the absence (dotted line) of cytochalasin B (5 μg/ml) for 5 min before stimulation with 3 μM fMLF. This figure shows a representative experiment; $n > 3$. (C) Dose-response curve of total ROI production induced by different concentrations of fMLF in the presence of cytochalasin B (5 μg/ml). The EC_{50} for oxidative burst for blood and bone marrow neutrophils in response to fMLF was 0.52 ± 0.1 and 2.10 ± 0.54 μM, respectively ($P < 0.05$). Results are shown as mean \pm SEM. The lines represent the average of the fit curves from individual experiments; $n = 4-5$.

The activity of the NADPH oxidase in neutrophils in response to a stimulation by fMLF is known to be increased by preincubation of the cells with the actin-binding and microfilament-disrupting compound, cytochalasin B. In fact, we

found virtually no ROI production from bone marrow neutrophils in the absence of cytochalasin B (Fig. 2B). The same result was obtained with blood neutrophils (data not shown). Consequently, all other measurements of superoxide production were done in the presence of cytochalasin B.

For a quantitative comparison of the ROI production from blood and bone marrow PMN, we integrated luminescence signal over 5 min to evaluate the total superoxide release. The response to a wide range of concentrations of fMLF in the presence of cytochalasin B (Fig. 2C) showed a sigmoid dose-response curve. The maximal response was obtained with 3 μM fMLF for blood PMN and 10 μM fMLF for bone marrow PMN. Higher doses up to 100 μM did not further increase but decreased the response of bone marrow cells (data not shown). The EC_{50} for oxidative burst in the blood and bone marrow PMN in response to fMLF was 0.52 ± 0.1 and 2.10 ± 0.54 μM, respectively ($n = 4-5$). Thus, blood neutrophils responded to fMLF stimulation with somewhat higher affinity than bone marrow cells (statistically significant, $P < 0.01$). The maximal response of bone marrow cells was almost identical to the response of blood cells. Concerning the oxidative burst, these results indicate that bone marrow neutrophils are as functional as blood neutrophils.

Mouse neutrophils release β-glucuronidase, a marker for primary granules

The enzymatic contents of the granules in human PMN are well-known [11], and those of the murine neutrophils are much less known. Based on the assumption that β-glucuronidase, which is known to be present in mouse neutrophils [12], is localized to the same granules as in their human counterparts, we developed a method for primary granule secretion by measuring the β-glucuronidase activity using a fluorescent substrate for this enzyme. The assay measures the activity of this enzyme in the supernatant of just 5000 cells. The enzyme release was compared with the total β-glucuronidase activity from Triton-lysed PMN. Blood and bone marrow PMN had the same total β-glucuronidase activity (107.6 ± 3.6 vs. 106.4 ± 4.5 arbitrary fluorescence units; $n = 33$ and 18). Addition of fMLF stimulated the release of up to 25% of the primary granules in mouse neutrophils. Similar to the ROI production, the dose-response curve to fMLF for primary granule release was sigmoid with a maximal response at 3 μM and 10 μM fMLF for blood and bone marrow PMN, respectively (Fig. 3A). The values of EC_{50} were similar to those obtained for ROI production (0.71 ± 0.11 μM and 1.19 ± 0.09 μM, $P < 0.01$). The maximal response had a tendency to be higher for bone marrow PMN, but this difference was not statistically significant ($P = 0.28$).

Like the production of superoxide anions, primary granule release in human neutrophils is enhanced in the presence of cytochalasin B [13]. The same was true for mouse neutrophils, whether from blood or from bone marrow (Fig. 3B). Primary granule release in the absence of cytochalasin B was barely detectable and significantly enhanced about fivefold in its presence ($P < 0.05$). Stimulus-secretion coupling involves several signaling steps that can be activated by specific agonists. Figure 3B shows that the protein kinase C (PKC) activator PMA (200 nM) and the Ca^{2+} ionophore A23187 (1 μM) were also effective agonists of primary granule secretion in blood

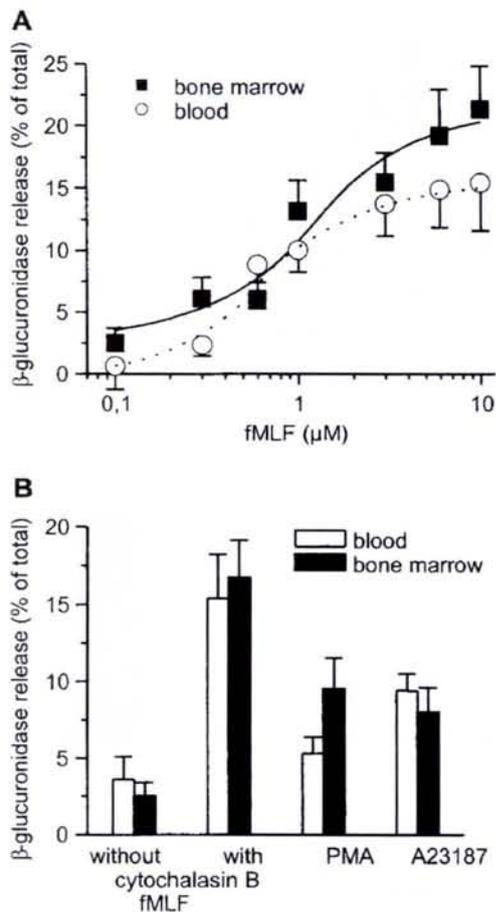


Fig. 3. Primary granule secretion. The secretion of the primary granules was measured using the activity of the β -glucuronidase in the supernatant of stimulated PMN. (A) Dose-response curve of primary granule secretion, induced by different concentrations of fMLF in the presence of cytochalasin B (5 μ g/ml) at 37°C, plotted as percentages of the total cellular β -glucuronidase contents. The EC_{50} for blood (dotted line) and bone marrow (solid line) neutrophils in response to fMLF was 0.71 and 1.19 μ M, respectively ($P < 0.05$). Results are shown as mean \pm SEM. The lines represent the average of the fit curves from individual experiments; $n \geq 6$. (B) Comparison of blood (open bars) or bone marrow cells (solid bars). Left side, Significant effect of cytochalasin B on the primary granule secretion in response to a 3- μ M fMLF ($P < 0.05$, $n \geq 6$). Right side, Significant response to PMA (200 nM) and the Ca^{2+} ionophore A23187 (1 μ M) in the presence of cytochalasin B compared with control DMSO ($P < 0.05$, $n \geq 5$). Data are shown as mean \pm SEM.

and bone marrow PMN, although less efficient than fMLF. Thus, PKC and Ca^{2+} appeared to be involved in mouse neutrophil exocytosis.

Taken together, blood and bone marrow mouse PMN can be stimulated to mobilize β -glucuronidase-containing primary granules in response to the chemoattractant fMLF, to PMA, and to the Ca^{2+} ionophore A23187 in the presence of cytochalasin B. The affinity for fMLF was similar as for ROI production and about twofold higher for blood PMN compared with bone marrow PMN. The overall response was similar between the two cell populations.

Lactoferrin release by mouse neutrophils

A characteristic feature of neutrophils is the presence of several types of granules with specific physiological roles and partially distinct mechanisms of exocytosis. After having eval-

uated the secretion of the primary granules, we wanted to know if on the one hand, the secondary granules were liberated in response to the same agonists and on the other hand, how much fMLF was necessary to stimulate the release of these granules. We chose lactoferrin as a marker for secondary granules that can be detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [6]. There was no antibody against mouse lactoferrin available; therefore, we tested the specificity of a commercial antibody against human lactoferrin by Western blot. Human lactoferrin purified from human milk (90 kDa, according to the manufacturer), BSA, the supernatant of PMA-stimulated human and murine neutrophils, or lysed human and murine neutrophils were analyzed by SDS-PAGE and Western blot. PMA is known to stimulate secondary granule release from human neutrophils [14]. **Figure 4** shows that the anti-human lactoferrin antibody recognized one single band in each sample, at 91 kDa or 87 kDa in the supernatant and the lysate of human and mouse neutrophils, respectively. The molecular weight of this band and the fact that it appeared in the supernatant of PMA-stimulated PMN confirmed this protein to be lactoferrin. However, we could note a slight difference in migration between human and mouse lactoferrin, despite a similar number of amino acids (711 for human, accession number NP_002334; 707 for mouse, accession number BAA13633; protein sequence homology: 70%) and a similar theoretical, molecular mass (78.3 kDa for human; 77.7 kDa for mouse). This difference in migration might be explained by a difference in the number of sites and extent of glycosylation of this protein. Indeed, the polypeptide chain of human lactoferrin possesses two glycosylation sites with five different glycopeptide structures possible [15], and the mouse lactoferrin presents only one site of glycosylation [16].

Based on the specificity of the commercial anti-human lactoferrin antibody described above, we set up an ELISA for the detection of mouse lactoferrin released from mouse neutrophils. The technique was essentially as described before by Mocsai and colleagues [6] with two notable differences. We used cells in suspension instead of adherent cells, and we used just 20,000 cells per assay. As previously reported with azurophilic granule exocytosis, nonadherent mouse neutrophils could be stimulated to mobilize lactoferrin-containing, specific

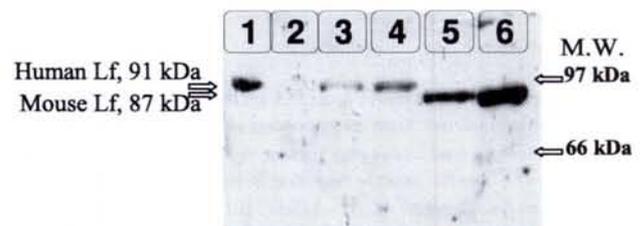


Fig. 4. The specificity of anti-human lactoferrin antibody mouse lactoferrin. Triton-lysed PMN or the supernatant of PMA-stimulated PMN were analyzed by SDS-PAGE and Western blot. Lanes: 1, Purified milk lactoferrin (Lf), Sigma, 40 ng; 2, BSA, Sigma, 500 ng; 3, supernatant of PMA-stimulated human PMN from 0.64×10^6 cells, 3 μ g total protein; 4, lysed human PMN, 0.17×10^6 cells, 1 μ g total protein; 5, supernatant of PMA-stimulated mouse PMN from 2.53×10^6 cells, total protein not determined; 6, lysed mouse PMN, 1.11×10^6 cells, 18 μ g total protein. Representative of at least three experiments per condition. M.W., Molecular weight.

granules in response to fMLF, PMA, and A23187 (Fig. 5). The dose-response curve was sigmoid over the same range as for ROI production and primary granule release. The maximal lactoferrin release was the same from bone marrow PMN and from blood PMN. The EC_{50} for blood cells, $0.80 \mu\text{M}$, was similar to the EC_{50} for ROI production and primary granule exocytosis. The EC_{50} for bone marrow PMN, $0.20 \mu\text{M}$, instead, was lower than the values for the other responses. Thus, in contrast to ROI production and primary granule exocytosis, lactoferrin release in response to fMLF occurred at a slightly higher affinity in bone marrow PMN compared with blood PMN.

To assess the role of the actin cytoskeleton in lactoferrin release, we preincubated cells in the presence or in the ab-

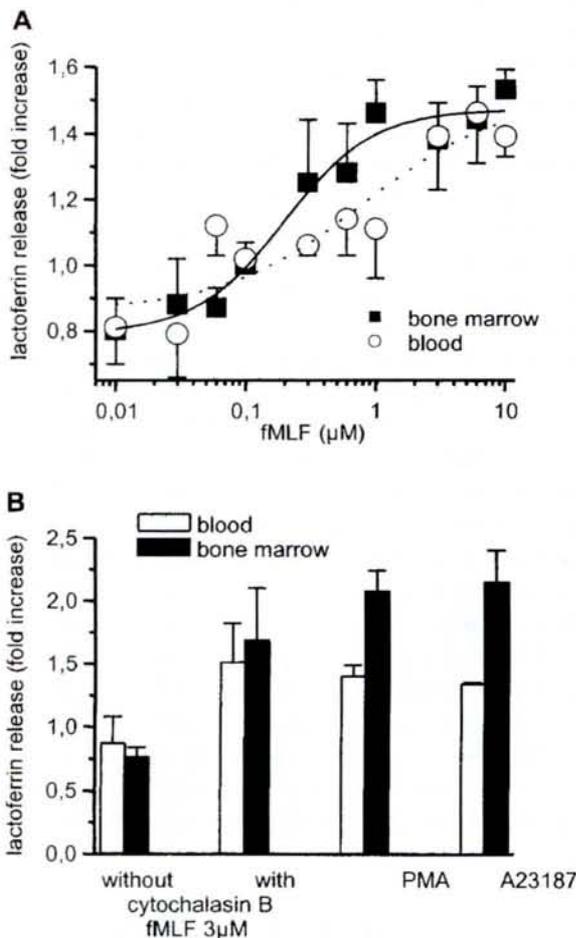


Fig. 5. Secondary granule secretion. ELISA quantified specific granule exocytosis as lactoferrin release. Data are expressed as fold increase relative to the amount of lactoferrin found in the supernatant of PMN incubated with solvent (DMSO) alone. (A) Specific granule secretion induced by different concentrations of fMLF in the presence of cytochalasin B ($5 \mu\text{g/ml}$) is plotted as fold increase over the control DMSO (fMLF solvent). The EC_{50} for blood (dotted line) and bone marrow (solid line) neutrophils in response to fMLF was 0.8 and $0.2 \mu\text{M}$, respectively. Results are shown as mean \pm SEM; $n \geq 4$. (B) Left side, The effect of cytochalasin B on secondary granule secretion. Blood (open bars) or bone marrow cells (solid bars) were preincubated at 37°C in the presence or in the absence of cytochalasin B ($5 \mu\text{g/ml}$) for 5 min before stimulation with $3 \mu\text{M}$ fMLF. Right side, secondary granule secretion in response to PMA (200 nM) and the Ca^{2+} ionophore A23187 ($1 \mu\text{M}$) in the presence of cytochalasin B compared with DMSO solvent control (Student's test, $P < 0.05$). The data are shown as mean \pm SEM; $n \geq 3$. The response of PMN of marrow to these two stimulators was statistically more important than those of blood ($P < 0.05$).

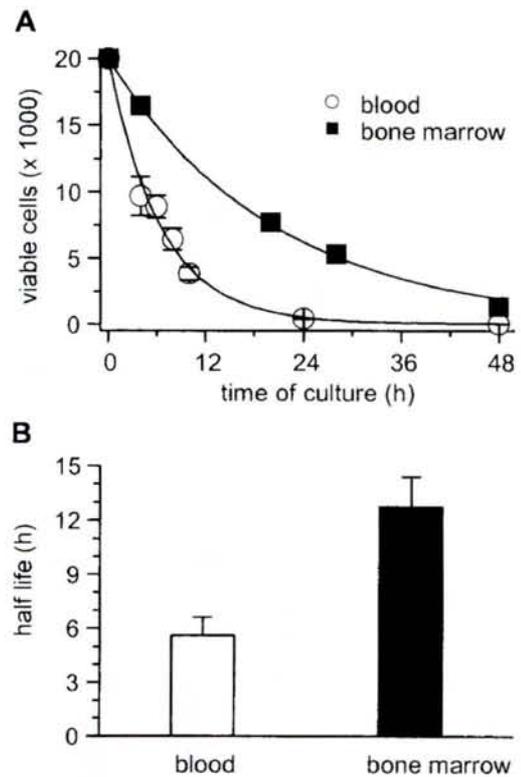


Fig. 6. Viability of bone marrow and blood neutrophils in culture. Intracellular ATP was determined to assess the viability of blood and bone marrow neutrophils after different times of culture under identical conditions. (A) Decrease in viability as a function of time of culture. Each point is the mean of a triplicate measurement. The lines represent an exponential fit through the data. The graph shows one example representative of three independent experiments. (B) Mean half-life of blood and bone marrow neutrophils in culture determined by exponential fit as shown in A; $n = 3$. Data are shown as mean \pm SEM; the difference between the two populations is statistically significant ($P < 0.05$).

sence of cytochalasin B and then stimulated with $3 \mu\text{M}$ fMLF (Fig. 5B). Secondary granule exocytosis was enhanced in bone marrow and blood PMN; in fact, there was no significant lactoferrin release in the absence of cytochalasin B. We also stimulated lactoferrin release by PMA (200 nM) and the Ca^{2+} ionophore A23187 ($1 \mu\text{M}$). Both were effective stimulators of specific granule release with a similar potency as fMLF. It is interesting to note that the response of bone marrow PMN to these two agonists was significantly more important than the response of blood PMN ($P < 0.05$).

Blood neutrophils have a reduced viability

Blood neutrophils are short-lived cells that are constantly replaced by cells from the bone marrow. The lifespan of the cells is a critical determinant for the number of cells in the blood. As our preparation of bone marrow neutrophils seems to consist of terminally differentiated cells, we wanted to compare the lifespan of blood and bone marrow PMN. Neutrophils were kept under standard cell culture conditions for up to 48 h. After 24 h, almost all blood neutrophils were dead, and 25% of the bone marrow PMN survived. The time course of the number of viable cells revealed an exponential decay, which was significantly faster for blood PMN (Fig. 6A). The half-life of

bone marrow PMN in culture, calculated from the exponential fit of the time course, was twice as long as the half-life of blood PMN ($P < 0.05$). Blood and bone marrow neutrophils appeared to enter apoptosis. They showed nuclear condensation like apoptotic human neutrophils [17] and loss of mitochondrial membrane potential (R. Boxio et al., unpublished data).

Taken together, the blood neutrophils and those of bone marrow were able to respond with the same intensity and the same affinity for the fMLF for at least three cellular functions. Thus, mouse bone marrow neutrophils exert the same antibacterial functions as blood neutrophils but have a longer lifespan.

DISCUSSION

Neutrophil differentiation is associated with changes in the buoyant density of the cells. Using identical density gradient centrifugation with leukocytes from the bone marrow and whole blood, we have obtained mouse neutrophil preparations that are similar with respect to morphology and function. The density of the bone marrow PMN was clearly above 1.09 g/l (69% Percoll), which is higher than the reported value for human bone marrow PMN (1.086 g/l) [7]. An alternative isolation method for mouse blood neutrophils using negative selection with anti surface antigen antibodies coupled to magnetic beads was recently described [18]. The technique is potentially less stimulating for the isolated cells. It could be extended to bone marrow preparations by adding antibodies against markers of immature precursor cells.

Previous studies have shown that bone marrow of humans and mice contains large numbers of myeloid cells with banded or segmented nuclei [4, 8]. Furthermore, surface markers for mature neutrophils have been found on mouse bone marrow cells [19, 20]. Based on the shape of the nuclei, our preparation of neutrophils from mouse bone marrow is indistinguishable from peripheral blood neutrophils. Our goal was to compare the functional qualities of mouse bone marrow neutrophils to blood neutrophils.

The chemotactic peptide fMLF is a major activator of human neutrophils, and recent studies have shown that mouse neutrophils also respond to this agonist with production of reactive oxygen species by the NADPH oxidase [21]. For a more detailed characterization, we have determined the EC_{50} for fMLF, the kinetics, and the extent of the response. We found only a minor difference between blood and bone marrow PMN, whereas Berkow and Dodson [4] reported reduced ROI production in human bone marrow PMN.

Another action of fMLF is the stimulation of exocytosis. Neutrophils contain four distinct types of granules and secretory vesicles, which are released differentially [22, 23]. In general, the exocytosis of primary granules requires the strongest stimulation. This may reflect the need for stringent control of these granules, which contain the most aggressive substances. We demonstrate here that mouse neutrophils, like human neutrophils, release primary granules after stimulation with fMLF. Again, only minor differences between bone marrow and blood neutrophils appear. However, the EC_{50} for primary granule release by fMLF from mouse blood neutrophils is 0.71 μ M compared with 0.01 μ M in human neutrophils [24].

Like human neutrophils, stimulation of primary granule release by fMLF requires cytochalasin B. To our knowledge, this is the first demonstration of primary granule exocytosis from mouse neutrophils.

A similar picture is found for secondary granules. Their release from adherent mouse neutrophils has been shown before [6]. As in human PMN, PMA and Ca^{2+} ionophore are stronger stimuli for secondary granules than for primary granules [25, 26].

For primary granule release and NADPH-oxidase activation, peripheral blood neutrophils responded to fMLF with higher affinity than bone marrow cells. This may reflect the final steps of differentiation that enhance the responsiveness of the blood neutrophil for the activation of highly bactericidal mechanisms. Secondary granule release may be required before the direct contact with bacteria, thus earlier in the life of a neutrophil. This might explain why secondary granule release appeared to be more sensitive to fMLF in bone marrow cells. There might be a hierarchy in the installation of the bactericidal functions during the cellular maturation of the neutrophil.

Human bone marrow contains an important reserve pool of neutrophils [2]. The most likely role of the functional neutrophils in the bone marrow reserve pool is to replace peripheral neutrophils or supplement at times of increased demand during infection. The size of the reserve pool and the peripheral pool depends on the rate of synthesis, the lifespan of the cells, and the rates of migration into the bloodstream and into tissue. Releasing bone marrow cells with a longer lifespan into the blood is an effective way of increasing the number of circulating neutrophils. In the natural environment of the bone marrow, the difference in the half-life of the two cell populations may be larger than the twofold difference, which we observed under culture conditions. It has recently been suggested that aging mouse PMN may return to the bone marrow and be eliminated there [27]. This raised the possibility that our bone marrow preparation contained a large number of rapidly dying cells. However, we find that the half-life of these cells in culture is twice as long as that of blood neutrophils. The reported half-life of human blood PMN in culture is approximately 24 h [28], thus substantially longer than in mice. This difference may contribute to the fact that the portion of neutrophils in the mouse white blood cell count is much lower than in human blood (5–25%, depending on the mouse strain, ref. [10], vs. 60% of human blood leukocytes), and the total white blood cell count is similar. The literature suggests that neutrophils die by apoptosis, and their lifespan is regulated by the balance between pro- and antiapoptotic proteins under the influence of extracellular signals [3]. Our data are consistent with the idea that neutrophils receive antiapoptotic signals in the bone marrow, which are less present or absent in the bloodstream. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte macrophage (GM)-CSF may be among those signals, although GM-CSF had a much smaller effect on mouse neutrophils than G-CSF [29]. A mouse of 25 g body weight has $\sim 50 \times 10^6$ mature neutrophils in its bone marrow [8] and 2.3×10^6 neutrophils in the blood (volume, ~ 1.9 ml). With a half-life of 6 h, $\sim 10 \times 10^6$ cells need to be replaced every day. Thus, the bone marrow reserve corresponds to 5 days of neutrophil production under normal conditions and less when more neu-

trophils are needed to combat an infection. The reserve pool could also serve as a buffer for irregularities in the PMN development in the bone marrow, which takes 10–14 days in humans [7].

In summary, our findings suggest that mouse bone marrow contains a reserve pool of functionally mature neutrophils that might be readily mobilized when needed during bacterial infections. This pool contains 20 times more neutrophils than the blood. For numerous experiments with mouse neutrophils, the bone marrow may be an attractive and valuable alternative to peripheral blood. Nevertheless, certain studies will require several samples of blood neutrophils from the same animal during the course of the experiment, for example, the analysis of the neutrophil response during infection, drug treatment, or studies on nutrition.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the French Ministry of Research (program ACI Microbiology). We gratefully acknowledge the help of Jean Charles Olry, Cindy Pupier, and Christiane Tankosic, the critical comments of Eric Tschirhart, as well as Christine Frossi Legrand and Attila Mocsai for advice on the lactoferrin ELISA.

REFERENCES

1. Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L. (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.* **80**, 617–653.
2. Babior, B. M., Golde, D. W. (2001) Production, distribution, and fate of neutrophils. In *Williams Hematology* (E. Beutler, B. S. Coller, M. A. Lichtman, T. J. Kipps, U. Seligsohn), New York, NY, U. McGraw-Hill, 753–759.
3. Akgul, C., Moulding, D. A., Edwards, S. W. (2001) Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett.* **487**, 318–322.
4. Berkow, R. L., Dodson, R. W. (1986) Purification and functional evaluation of mature neutrophils from human bone marrow. *Blood* **68**, 853–860.
5. Serrander, L., Skarman, P., Rasmussen, B., Witke, W., Lew, D. P., Krause, K. H., Stendahl, O., Nüße, O. (2000) Selective inhibition of IgG-mediated phagocytosis in gelsolin-deficient murine neutrophils. *J. Immunol.* **165**, 2451–2457.
6. Mocsai, A., Ligeti, E., Lowell, C. A., Berton, G. (1999) Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J. Immunol.* **162**, 1120–1126.
7. Cowland, J. B., Borregaard, N. (1999) Isolation of neutrophil precursors from bone marrow for biochemical and transcriptional analysis. *J. Immunol. Methods* **232**, 191–200.
8. Chervenick, P. A., Boggs, D. R., Marsh, J. C., Cartwright, G. E., Wintrobe, M. M. (1968) Quantitative studies of blood and bone marrow neutrophils in normal mice. *Am. J. Physiol.* **215**, 353–360.

9. Biermann, H., Pietz, B., Dreier, R., Schmid, K. W., Sorg, C., Sunderkotter, C. (1999) Murine leukocytes with ring-shaped nuclei include granulocytes, monocytes, and their precursors. *J. Leukoc. Biol.* **65**, 217–231.
10. Mouse phenome database web site. The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME. <<http://www.jax.org/phenome>>
11. Edwards, S. W. (1994) *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil*, Cambridge, U.K., Cambridge University Press, 55–76.
12. Rausch, P. G., Moore, T. G. (1975) Granule enzymes of polymorphonuclear neutrophils: a phylogenetic comparison. *Blood* **46**, 913–919.
13. Bennet, J. P., Cockcroft, S., Gomperts, B. D. (1980) Use of cytochalasin B to distinguish between early and late events in neutrophil activation. *Biochim. Biophys. Acta* **601**, 584–591.
14. Wright, D. G., Bralove, D. A., Gallin, J. I. (1977) The differential mobilization of human neutrophil granules. Effects of phorbol myristate acetate and ionophore A23187. *Am. J. Pathol.* **87**, 237–284.
15. Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dorland, L., Van Halbeek, H., Vliegthart, J. F. (1982) Primary structure of the glycans from human lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* **121**, 413–419.
16. Leclercq, Y., Sawatzki, G., Wieruszki, J. M., Montreuil, J., Spik, G. (1987) Primary structure of the glycans from mouse serum and milk transferrins. *Biochem. J.* **247**, 571–578.
17. Cowburn, A. S., Cadwallader, K. A., Reed, B. J., Farahi, N., Chilvers, E. R. (2002) Role of PI3-kinase-dependent Bad phosphorylation and altered transcription in cytokine-mediated neutrophil survival. *Blood* **100**, 2607–2616.
18. Cotter, M. J., Norman, K. E., Hellewell, P. G., Ridger, V. C. (2001) A novel method for isolation of neutrophils from murine blood using negative immunomagnetic separation. *Am. J. Pathol.* **159**, 473–481.
19. Lowell, C. A., Fumagalli, L., Berton, G. (1996) Deficiency of Src family kinases p59/61^{hck} and p58^{c-6sr} results in defective adhesion-dependent neutrophil functions. *J. Cell Biol.* **133**, 895–910.
20. Allport, J. R., Lim, Y. C., Shipley, J. M., Senior, R. M., Shapiro, S. D., Matsuyoshi, N., Vestweber, D., Lusinskas, F. W. (2002) Neutrophils from MMP-9- or neutrophil elastase-deficient mice show no defect in transendothelial migration under flow in vitro. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 821–828.
21. Bylund, J., Samuelsson, M., Collins, L. V., Karlsson, A. (2003) NADPH-oxidase activation in murine neutrophils via formyl peptide receptors. *Exp. Cell Res.* **282**, 70–77.
22. Ligeti, E., Mocsai, A. (1999) Exocytosis of neutrophil granulocytes. *Biochem. Pharmacol.* **57**, 1209–1214.
23. Borregaard, N., Lollike, K., Kjeldsen, L., Sengelov, H., Bastholm, L., Nielsen, M. H., Bainton, D. F. (1993) Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur. J. Haematol.* **51**, 187–198.
24. Barrowman, M. M., Cockcroft, S., Gomperts, B. D. (1986) Potentiation and inhibition of secretion from neutrophils by phorbol ester. *FEBS Lett.* **201**, 137–142.
25. Dewald, B., Bretz, U., Baggiolini, M. (1983) Exocytosis induced in neutrophils by chemotactic agents and other stimuli. *Agents Actions Suppl.* **12**, 371–382.
26. Lew, D. P., Monod, A., Waldvogel, F. A., Dewald, B., Baggiolini, M., Pozzan, T. (1986) Quantitative analysis of the cytosolic free calcium dependency of exocytosis from three subcellular compartments in intact human neutrophils. *J. Cell Biol.* **102**, 2197–2204.
27. Suratt, B. T., Young, S. K., Lieber, J., Nick, J. A., Henson, P. M., Worthen, G. S. (2001) Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **281**, L913–L921.
28. Savill, J. S., Wyllie, A. H., Henson, J. E., Walport, M. J., Henson, P. M., Haslett, C. (1989) Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.* **83**, 865–875.
29. Lord, B. I., Molineux, G., Pojda, Z., Souza, L. M., Mermod, J. J., Dexter, T. M. (1991) Myeloid cell kinetics in mice treated with recombinant interleukin-3, granulocyte colony-stimulating factor (CSF), or granulocyte-macrophage CSF in vivo. *Blood* **77**, 2154–2159.

The immunostimulatory peptide WKYMVm-NH₂ activates bone marrow mouse neutrophils via multiple signal transduction pathways

R. Boxio*, C. Bossenmeyer-Pourié*, R. Vanderesse[†], C. Dournon* and O. Nüße[‡]

* University Nancy 1, EA 3442: Laboratory of Experimental Biology –
Immunology, Faculty of Sciences, BP239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France.

[†] CNRS-INPL UMR 7568, 1 rue Grandville, BP451, 54001 Nancy, France

[‡] University Paris-South 11; UMR-S442 INSERM "Cell Signalling and Calcium";
Building 443, 15 rue Georges Clemenceau, 91405 Orsay, France

Short title: WKYMVm induced signals in neutrophils

Abbreviations used: fMLF, formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine; FPR, formyl peptide receptor; FPRL1, formyl peptide receptor like 1; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; ROI, reactive oxygen intermediate;

ABSTRACT

G-protein coupled receptors play a major role in the activation of the innate immune system, such as polymorphonuclear neutrophils. Members of the formyl-peptide receptor family recognise chemotactic peptides as well the amyloid-beta peptide and fragments of the HIV envelope and may thus be implicated in major pathologies. The peptide WKYMVm-NH₂ probably activates the receptor FPRL1 and its mouse orthologues Fpr-rs1 and Fpr-rs2. We examined the stimulation of C57BL6 mouse neutrophils by WKYMVm-NH₂ and the effects of several inhibitors for intracellular signalling pathways (wortmannin, LY 294002, staurosporin, H-89, U 73122, thapsigargin, SKF 96365). We show here that WKYMVm-NH₂ is a powerful stimulator of primary and secondary granule exocytosis as well as superoxide production. The signalling pathway involves phosphoinositide 3-kinase, protein kinase C, phospholipase C and store operated calcium influx. Studies with peptide antagonists suggest that WKYMVm-NH₂ preferentially activates exocytosis via FPRL1 and not FPR, the major receptor for N-formylated peptides such as fMLF. However, the signalling pathways activated by WKYMVm-NH₂ in mouse neutrophils are similar to those activated by fMLF in human neutrophils. Thus the effect and the signalling pathways of the two agonists and their receptors are at least partially overlapping.

Corresponding author:

Oliver Nüße,

University Paris-South 11; UMR-S442 INSERM "Cell Signalling and Calcium";
Building 443, 15 rue Georges Clemenceau, 91405 Orsay, France

e-mail : oliver.nusse@ibaic.u-psud.fr

telephone : +33 (0)1 69 15 68 65

Fax: +33 (0)1 69 15 58 93

INTRODUCTION

Neutrophils are in the first line of defence against bacterial infections. They are activated by soluble as well as particulate stimuli. Formyl-methionyl peptides such as fMLF are among the most widely studied activators. fMLF activates neutrophil chemotaxis at low concentrations and bactericidal functions such as the production of reactive oxygen intermediates (ROI) as well as granule exocytosis at higher concentrations. The fMLF receptor is coupled to G-proteins of the G_i/G_o subfamily and activates multiple parallel signalling pathways. ROI - production and exocytosis involve phospholipase C (PLC) and protein kinase C-activation (PKC) and calcium influx as well as phosphoinositide 3-kinase (PI3K) [1, 2, 3].

Recently, other stimulatory peptides like WKYMVm-NH₂ (where m symbolizes D-methionine) have been described which are not formyl-methiolated but appear to interact with receptors of the same family [4, 1]. WKYMVm-NH₂ has been shown to stimulate chemotaxis, calcium mobilisation, superoxide generation and exocytosis in neutrophils [5, 6, 7]. It has been suggested, that, the underlying signalling pathways are similar to those activated by fMLF [1]. However, these pathways have been only partially investigated so far [8].

The fMLF-receptor (FPR) has been cloned more than a decade ago [9]. Since then, a family of related receptors with at least 3 human genes and 8 mouse genes [1, 10] has been discovered and called formyl peptide receptors. WKYMVm-NH₂ appears to activate preferentially the FPRL1 receptor in humans and its orthologs Fpr-rs1 and Fpr-rs2 in mice (for review [1]). FPR and the mouse ortholog mFpr1 supposedly recognise formyl-methionine peptides of bacterial or mitochondrial origin. Chemotaxis directs immune cells expressing FPR towards sites of bacterial infection or tissue damage. mFPR1 knockout mice show reduced survival in some models of infection [11], demonstrating that the receptors of the formyl peptide receptor family are not redundant. FPRL1 and its mouse orthologs do not seem to recognise such bacterial peptides, instead, they are activated by a variety of peptides involved in pathologies as diverse as amyloid-beta (Alzheimer disease) and fragments of gp41 and gp120 from the HIV envelope (AIDS).

Therefore, the family of formyl peptide receptors may have evolved to protect against a variety of assaults of different origin (bacterial, viral or endogenous). It is not yet known, what are the common structural features of FPRL1 agonists. Due to their potential role in major diseases, there is growing interest to develop antagonists for this receptor as well as understanding its full signalling capacity.

The availability of transgenic mice has created a renewed interest in studying mouse neutrophils. In the mouse, high concentrations of fMLF are needed to stimulate ROI production and exocytosis [12]. The peptide WKYMVm-NH₂ is a more potent activator for ROI production in the mouse. Due to the small blood volume of the mouse, most investigators use bone marrow neutrophils instead of peripheral blood neutrophils. We have recently shown that functionally mature neutrophils can be isolated from mouse bone marrow [13]. We therefore wanted to know, whether WKYMVm-NH₂ is a stimulator of mouse neutrophil exocytosis and whether the same signalling pathways are activated, which are known to be involved in fMLF-stimulation of human neutrophils. Here we show that WKYMVm-NH₂ is indeed a potent activator of mouse neutrophil exocytosis using multiple signalling pathways.

MATERIALS AND METHODS

Material

C57BL6 mice were obtained from Depre (Saint Doulchard, France); Percoll from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden); the microplate reader WALLAC 1420 MULTILABEL COUNTER from Perkin Elmer (Courtaboeuf, France); 4-methylumbelliferyl β -D-glucuronide from Roth (Karlsruhe, Germany) and TMB (3,3',5,5'-tetramethylethylenediamine) from Interchim (Montluçon, France); protected amino acids and Fmoc-Rink amide MBHA resin were from Senn Chemicals International (Dielsdorf, Switzerland) or Neosystem (Strasbourg, France). The peptide C2 (WPLTHTLRHTIW) was provided by X. Leroy (Actelion, Allschwil, Switzerland) and boc-MLF was a gift from F. Boulay, Grenoble, France. All other chemicals were from SIGMA (St Louis, MO).

Peptide synthesis

H-WKYMVM-NH₂ was synthesized by the solid phase methodology on a multichannel peptide synthesizer [14] according to a classical Fmoc/tBu methodology. Assembly of the protected peptide chains was carried out on a 410- μ mol scale using the *in situ* neutralization protocol described previously [14]. All the coupling procedures were performed using a 3-fold excess of N-Fmoc-amino acid and activation reagents 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) and *O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium tetrafluoroborate (TBTU) and diisopropylamine (9 eq.) in DMF. The side chains of tyrosine and lysine were respectively protected by tBu and Boc groups. Typically, the coupling reactions were complete within 1 h as determined by the 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBSA) test. Deprotection of the Fmoc group was achieved by 25% (v/v) piperidine in DMF. At the end of the synthesis and after the last deprotection step, the peptide resin was washed twice with DCM and dried under vacuum. A standard cleavage with a mixture of 0.75 g crystalline phenol, 0.25 ml 1,2-ethanedithiol, 0.5 ml thioanisole, 0.5 ml deionised H₂O, and 10 ml trifluoroacetic acid (TFA) for 1.5 hours afforded the crude peptide. After the cleavage step, the

mixture was filtered through a medium-porosity, fritted glass funnel to separate the peptide solution from the resin support. After concentrating the filtrate on a rotary evaporator, 50ml Et₂O were added to precipitate the peptide, which is further filtered through a fine-porosity, fritted glass funnel. The precipitate was first dried under high vacuum, and then dissolved in an aqueous solvent for lyophilisation.

The crude peptides were purified by reverse phase HPLC using a preparative HPLC system (Waters Corp., Milford, MA) on an Interchrom UP50DB.25M 5- μ m column (250 X 10 mm). Peptides are eluted with a linear gradient from 8% to 40% of acetonitrile (Carlo-Erba) in Ultra-High Quality water containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) sequencing grade, for 30 min at a flow rate of 6 ml/min with UV detection at 214 nm.

The purity of the peptide was checked by analytical HPLC, which was run on a Merck apparatus (Darmstadt, Germany) using a Lichrocart[®] packed with Lichrospher[®] WP 300 RP-18 (5- μ m) column (250 X 4 mm) using a linear gradient from 8% to 50% of acetonitrile (Carlo-Erba) in Ultra-High Quality water containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) for 50 min at a flow rate of 1 ml/min with UV detection at 214 nm. After removal of the solvents, the purified compound was lyophilized and analysed by mass spectroscopy and NMR. A single peptide peak was detected after HPLC and mass spectroscopy (electrospray) revealed a peptide mass of 856.22 (for [M+H]⁺), virtually identical to the calculated mass of 855.41. ¹H NMR (1D, COSY, TOCSY) confirmed the sequence of the product.

Preparation of mouse neutrophils.

Neutrophils were prepared from mouse bone marrow and analysed as described [13, 15]. The femur and the tibia from both hind legs were flushed with HBSS-EDTA (HBSS without calcium, magnesium, phenol red and sodium bicarbonate; pH 7.2; 15 mM EDTA; BSA 1%). The bone marrow cell suspension was centrifuged (400 g, 10 min, 4°C) and resuspended in 1ml HBSS-EDTA. Cells

were overlaid a 3-layer Percoll[®] gradient of 78%, 69%, and 52% Percoll respectively, diluted in HBSS (100% Percoll = 9 parts Percoll and 1 part 10x HBSS) and centrifuged (1500 g, 30 min, room temperature) without braking. The neutrophils from the 69%/78% interface and the upper part of the 78% layer were harvested into BSA 1%-coated tubes. After one wash with 2ml HBSS-EDTA + BSA 1%, remaining red cells were eliminated by hypotonic lysis. After a final wash with HEPES-buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.2), neutrophils were suspended in HEPES-buffer + 9 mM glucose at 10⁶ cells/ml and used within 6 h. We obtained 6 ± 0.6 x10⁶ cells per mouse and 94 ± 1 % of them were morphologically mature neutrophils (bands and segmented).

β-glucuronidase release

The activity of the primary granule marker β-glucuronidase was detected from the supernatants of stimulated mouse neutrophils. Tubes were coated with BSA (1%, 1 h, 37°C). Mouse neutrophils (2×10⁴ cells) were suspended in these tubes in HEPES-buffer + glucose for a final volume of 100 μl with 5μg/ml cytochalasin B (unless otherwise indicated). Cells were warmed for 10 min at 37°C before addition of various concentrations of WKYMVm-NH₂, fMLF, or solvent (DMSO) alone. After incubation at 37°C for 10 min, secretion was stopped by rapid cooling on ice and addition of 100 μl ice-cold HEPES-buffer + glucose and centrifuged (400g, 10 min, 4°C). Duplicates of 50 μl supernatant were dispensed in 96-microwell plates and 50 μl reaction medium (0.1 M sodium acetate; pH 4.0; 0.02% Triton X-100; 5 mM 4-methylumbelliferyl β-D-glucuronide) was added. The reaction was stopped after 2 h at 37°C by adding 50 μl 0.3 M glycine/NaOH, pH 10.4, 10 mM EGTA. Fluorescence was quantified by using a WALLAC 1420 MULTILABEL COUNTER with 365 nm excitation and 450 nm emission wavelengths. β-glucuronidase release from murine PMN is expressed as % of release compared with the total content detected in supernatants of Triton X-100-lysed PMN. Background release in the presence of solvent was subtracted.

Lactoferrin release

Mouse neutrophils (5×10^4 cells) were suspended in 100 μ l HEPES-buffer + glucose with 5 μ g/ml cytochalasin B and prewarmed for 10 min at 37°C before addition of various concentrations of WKYMVm-NH₂, fMLF, or solvent (DMSO) alone. After incubation at 37°C for 10 min, secretion was stopped by rapid cooling on ice and addition of 100 μ l ice-cold buffer and centrifuged (400 g, 10 min, 4°C). Supernatants or a solution of human lactoferrin (10 pg to 50 ng per well) were diluted 2-fold in carbonate buffer (90 mM NaHCO₃, 36 mM Na₂CO₃, pH 9.6) and added to Nunc Maxisorp F96 immunoplate wells for 3 h at 37°C. Nonspecific binding sites were blocked with PBS-Tween 1‰ supplemented with 2% BSA over night at 4°C. PBS-Tween 1‰ was used for all subsequent steps, which were conducted at room temperature and separated by several washings. Rabbit anti-human lactoferrin antibody (dilution 1/1000) was added for 1 h, followed by goat peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (dilution 1/10000) for 1 h. 5 mg/ml TMB in 100 mM acetate buffer pH 6.0, 1.2% H₂O₂, was added for 15 min, followed by 750 mM H₂SO₄. Absorbance was read at 450 nm with a WALLAC 1420 microplate reader, and the lactoferrin concentration was calculated using the human lactoferrin calibration curve. Since data obtained with mouse samples could not be exactly quantified using standard curves done with human lactoferrin, lactoferrin release from murine PMN is expressed as fold increase compared with the amount detected in supernatants of unstimulated PMN [13].

Superoxide production

Reactive oxygen intermediates (ROIs) were quantified by measuring luminol-dependent chemiluminescence [13] at 37°C using a WALLAC 1420 MULTILABEL COUNTER at approximately 1 measurement per well every 6 s. White polypropylene 96 well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were covered with BSA (1%, 1 h, 37°C). After coating, the plates were washed three times with

HEPES-buffer. Mouse neutrophils (2×10^4 cells) were suspended with 10 $\mu\text{g/ml}$ Luminol, 5 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin B, 4 U/ml horserardish peroxydase and HEPES-buffer for a final volume of 200 μl per well. The cells were stimulated with WKYMVm-NH₂ or fMLF and superoxide anion generation was measured by integrating photon counts for 5 min before and after agonist addition. The solvent control, DMSO, did not stimulate ROI production.

Analysis and Statistics

Data are expressed as mean \pm SEM. Background activity from unstimulated cells was subtracted. To study the inhibition by various compounds, the granule release or ROI production of stimulated cells in the absence of inhibitor was set as 100%. Statistical significance was tested with unpaired Student t-test, p values below 0.05 were considered significant. Sigmoidal fits were performed in ORIGIN (Microcal, Northampton, MA).

RESULTS

The peptide WKYMVm-NH₂ has an unusual structure containing a D-methionine and an aminated carboxyterminus. We have prepared a pure peptide to preserve maximally the reported advantages of this unusual sequence [6]. We first determined, whether WKYMVm-NH₂ is activating granule release and superoxide production in mouse bone marrow neutrophils. β -glucuronidase was chosen as a marker for primary granules, lactoferrin served as a marker for secondary granules and ROI production was measured with luminol-dependent chemiluminescence. As shown in Fig 1, the peptide WKYMVm-NH₂ activated primary and secondary granule exocytosis and ROI production with similar high affinity (EC_{50} 70.5 \pm 4.5 nM; 31.1 \pm 1.8 nM; 133.3 \pm 9.9 nM respectively). Granule release and ROI production were strongly enhanced by the presence of cytochalasin B, an inhibitor of actin polymerization (up to 30 fold, data not shown). Therefore all experiments were done in the presence of cytochalasin B. We compared the kinetics and amplitude of WKYMVm-NH₂ and fMLF-induced ROI production. With both agonists, ROI production peaked rapidly and returned to baseline within 5 min (Fig 1d). The integrated ROI production after fMLF-stimulation was 97 \pm 6 % (n = 3) of the production stimulated by a 10 fold lower concentration of WKYMVm-NH₂. Thus the two agonists induce similar maximal responses but WKYMVm-NH₂ has a significantly higher affinity.

Based on the potent stimulation by WKYMVm-NH₂, we used several selective inhibitors to probe the intracellular signalling pathways involved in neutrophil activation by WKYMVm-NH₂. Given that none of these inhibitors is completely specific for a single pathway, we determined the IC_{50} for several of them. This approach will allow a comparison with the known action of these inhibitors in other experimental settings, in particular human neutrophil activation by fMLF.

Wortmannin and LY294002 are potent inhibitors of PI3K. They turned out to be very efficient inhibitors of exocytosis and ROI-production in WKYMVm-NH₂-stimulated mouse neutrophils (Fig 2). Wortmannin inhibited primary granule

release with an IC_{50} of 30.1 ± 1.3 nM. ROI production was slightly more sensitive whereas lactoferrin release was inhibited to 50% by 1 μ M wortmannin (data not shown). The structurally different PI3K inhibitor LY294002 revealed a similar hierarchy in the sensitivity of the 3 effector functions (Fig 2b).

WKYMVm-NH₂ stimulates a transient rise of the intracellular calcium concentration [7], presumably by activating a G-protein coupled receptor activating a heterotrimeric G-protein of the Gi/Go family. This leads to activation of phospholipase C and production of IP₃ and diacylglycerol. IP₃ stimulates release of Ca²⁺ from intracellular stores and subsequent Ca²⁺ influx via store-operated channels. Diacylglycerol and Ca²⁺ activate conventional protein kinase C isoforms with numerous downstream effects. The calcium rise is necessary but not sufficient for human neutrophil exocytosis [3]. We probed the calcium branch of this signalling pathway at the level of PLC and at the level of store operated Ca²⁺ influx. U73122, an inhibitor of PLC almost completely blocked WKYMVm-NH₂ induced primary granule release (IC_{50} : 1.0 ± 0.1 μ M) (Fig 3a). The inactive structural analogue U73343 had little effect even at 10 μ M. The imidazole compound SKF96365 inhibits store operated calcium influx. It blocked 70 % of WKYMVm-NH₂ stimulated glucuronidase secretion with an IC_{50} of 9.8 ± 1.0 μ M (Fig 3b). La³⁺, another inhibitor of calcium influx, also blocked secretion by 80 % at 10 μ M. However, above 10 μ M, La³⁺ also affected the enzyme activity of β -glucuronidase (data not shown). These data confirm the importance of calcium influx, although the IC_{50} for La³⁺ can not be determined. Thapsigargin induces store-operated calcium influx by blocking the SERCA-pump which is responsible for refilling the intracellular Ca²⁺ stores. We tested a wide range of thapsigargin concentrations from 10 nM to 10 μ M and found up to 8 % of primary granule release compared to 25 % release with WKYMVm-NH₂ (data not shown). Thus, calcium-influx alone is a weak stimulator of mouse neutrophil secretion. The protein kinase inhibitor staurosporin effectively inhibited ROI production with an estimated IC_{50} of 120 nM (Fig 3c). The inhibition of primary granule secretion required 1.9 ± 0.3 μ M staurosporin (IC_{50}) suggesting that this effect was not specific for PKC. Lactoferrin release was unaffected even at 10 μ M staurosporin (data not shown). PKA inhibitor H-89 was also unable to inhibit primary granule

exocytosis at 1 or 10 μ M (data not shown). Thus WKYMVm-NH₂ induced secretion required calcium influx but not PKC or PKA activation.

There are at least 3 receptors that potentially bind the chemotactic peptides fMLF and WKYMVm-NH₂ although with different affinity. To determine, which receptor is primarily responsible for the stimulation of exocytosis, we tested two antagonists. Boc-MLF is a well known antagonist of fMLF, which does not inhibit WKYMVm-NH₂ induced ROI production [12]. The peptide C2 (WPLTHTLRHTIW) was recently discovered in a peptide screen with the human receptor FPRL1 (Poirey, Gutknecht, Giller, Valdenaire and Leroy, Actelion, Switzerland, abstract 33, 3rd international meeting of the IFR83, "G protein-coupled receptors", October 2003, Paris, France). Boc-MLF almost completely blocked fMLF-stimulated primary granule exocytosis (Fig 4) but had only a small effect on WKYMVm-NH₂ stimulation. Boc-MLF was less efficient in blocking fMLF-stimulated lactoferrin release. Surprisingly, the C2 peptide enhanced fMLF-stimulated primary granule exocytosis without having a stimulatory effect on its own. C2 at 10 μ M inhibited WKYMVm-NH₂ stimulated primary and secondary granule release by 50%. Taken together, these data are consistent with the idea that fMLF and WKYMVm-NH₂ preferentially activate different receptors, mFpr1 and Fpr-rs1/Fpr-rs2 respectively.

DISCUSSION

Several laboratories have demonstrated that the peptide WKYMVm-NH₂ is a potent activator of neutrophils and monocytes [1]. However, the induction of neutrophil exocytosis by WKYMVm-NH₂ has been controversial and the underlying signalling pathways are only partially known. Svensson et al. found no release of myeloperoxidase by WKYMVm-NH₂ [16] whereas Tuluc et al. demonstrated elastase release from human neutrophils [17]. Lipoxin A4, a potential agonist of FPRL1, actually down regulated primary granule exocytosis, but not secondary granule exocytosis when added 2.5 h before stimulation with immune complexes or low concentrations of fMLF [18]. We show here that the chemotactic peptide WKYMVm-NH₂ is a potent stimulator of primary and secondary granule exocytosis in mouse neutrophils in the presence of the actin-filament disrupting agent cytochalasin B. The stimulus secretion pathway implies PI3K, phospholipase C, and calcium influx from the extra cellular medium as shown before for fMLF activation of human neutrophils or HL-60 cells [1, 19, 3]. It has been hypothesised, that the activation of cellular functions by different formyl peptide receptors involves the same signalling pathways to [1]. Our data indicate that this is the case for the induction of exocytosis and ROI production in neutrophils by fMLF and WKYMVm-NH₂. Furthermore, the signalling pathways appear to be the same in mice and humans. A more detailed comparison reveals some differences between the stimulation of primary (β -glucuronidase) and secondary (lactoferrin) granule exocytosis or ROI production. Lactoferrin release showed a 2 fold higher affinity for WKYMVm-NH₂ than β -glucuronidase secretion or 4-fold higher than ROI production. In human neutrophils, secondary granules are released more easily than primary granules, the latter being required at a later stage of neutrophil activation [20]. Our data demonstrate that this rule applies for mouse neutrophils stimulated with WKYMVm-NH₂ or fMLF [13]. For all 3 functions, WKYMVm-NH₂ shows a substantially higher affinity than fMLF (6.5 for secondary granule secretion to 17 fold for primary granule secretion; fMLF values from [13]).

The sensitivity for inhibitors of PI3K shows a clear hierarchy, ROI production being the most sensitive function and lactoferrin release being only partially inhibited even at high doses of wortmannin or LY294002. Similar half maximal inhibition of PI3K-mediated effects was found in human neutrophils, requiring 8 nM wortmannin for ROI production and 89 and 81 nM for secondary and primary granule release respectively [19]. However, in our hands, secondary granule release from mouse neutrophils was much less sensitive to wortmannin.

We show for the first time, that mouse neutrophil exocytosis is strongly reduced by inhibitors of phospholipase C and store operated calcium influx. Furthermore, stimulation of store operated calcium influx by thapsigargin poorly activates exocytosis. We have previously shown that the calcium ionophore A23187 was only a weak stimulator of exocytosis [13]. Thus, calcium influx seems to be necessary but insufficient to stimulate mouse neutrophil exocytosis. A second signal is required for efficient stimulation. Again, the underlying signalling mechanism closely resembles what is known for human neutrophils and HL-60 cells [21, 3]. Such similarity of the signalling pathways between mouse and human neutrophils essentially means that the mouse can be used to investigate drugs that target the bactericidal functions of neutrophils, such as inhibitors of store operated calcium influx [22]. Furthermore, transgenic animals with alterations of these signalling pathways will provide extremely useful information with respect to neutrophil function.

The current literature and our experiments suggest that FPR and FPRL1 like their mouse orthologs have very similar signalling capacities. If there are several receptors with similar activity, what are their natural ligands and their function *in vivo*? The receptors of the formyl peptide receptor family have different affinities for the same ligands such as fMLF and WKYMVm-NH₂. These receptors are rapidly deactivated upon stimulation [8]. Having several receptors with the same effectors but different affinities for the agonist will permit continued activation in the presence of high concentrations of agonist [23]. The full potential of the receptors as well as their limitations will become apparent in FRPL1 knock-out mice and in double knock-outs of FPR and FPRL1.

Since FPRL1 may be important for a number of diseases, a specific inhibitor of this receptor could have therapeutic effects. The C2 peptide, which we tested, was found by screening a phage display library against FPRL1 expressed in HEK cells. In our mouse neutrophil model, this inhibitor is apparently not fully specific for FPRL1 nor does it completely inhibit exocytosis at concentrations that completely blocked FPRL1-mediated calcium signals in HEK cells (IC_{50} 300 nM, Poirey et al. 3rd international meeting of the IFR83, "G protein-coupled receptors", October 2003, Paris, France). The most obvious explanation would be that the mouse orthologue of FPRL1 has a lower affinity for this peptide. Another explanation may be based on the divergent effects of FPR agonists. Different agonists of formyl peptide receptors seem to activate different cellular responses [24]. Thus the exocytosis of primary and secondary granules may be regulated differently [25].[26] Furthermore, lipoxin A4, an agonist of FPRL1, has activating as well as inhibiting actions on human neutrophils [18]. Together, this may lead to paradoxical effects as we have found with the C2 peptide, which had activating and inhibiting actions in conjunction with fMLF and an inhibitory effect on WKYMVm-NH₂. Yet another explanation could be the involvement of a third formyl peptide receptor. The mouse has at least 8 FPR-like genes [1, 10]. The involvement of multiple receptors could also explain the effects of lipoxin A4 [27]. Peptides like C2 may be very helpful to elucidate the respective roles of formyl peptide receptors. However, such peptides, when discovered in heterologous expression systems, need to be evaluated in cells expressing the full set of potential receptors. Very recently, Bae et al have published another inhibitory peptide which was a very potent and specific inhibitor of FPRL1 expressed on RBL cells [28].

If the formyl peptide receptors bind numerous peptides, they may interfere with peptide drugs. For example, the HIV-fusion inhibitor enfuvirtide (T-20) binds to human and mouse formyl peptide receptors. The published EC_{50} values of 0.1 to 0.5 μ M [1] are well below the concentrations achieved at the site of injection during treatment (injection of 1 ml containing 20 mM T-20) [29]. Thus it is possible that activation of formyl-peptide receptors by enfuvirtide might

contribute to the inflammatory injection-site reactions or the increased eosinophilia that occur during treatment [29]. It is currently unknown, whether activation of formyl peptide receptors by T-20 contributes to the therapeutic effects of enfuvirtide.

In conclusion, the current literature together with our data shows that WKYMVm-NH₂ is stimulatory agonist for both human and mouse neutrophils. With respect to the diversity of activated functions it is at least as potent as the fMLF and it employs the same signalling pathways. PI3K and a PLC mediated calcium signal have to operate in parallel to stimulate primary granule exocytosis. Since WKYMVm-NH₂ preferentially operates *via* a different receptor, which might be involved in a number of diseases, selective antagonists of WKYMVm-NH₂ may be therapeutically useful.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the French ministry of research (program ACI microbiology). We gratefully acknowledge the help of Vanessa Minig, Jean Charles Olry, and Christiane Tankosic and the critical comments of Jean-Claude Sulpice. We thank Xavier Leroy for a sample of the C2 peptide.

Figure legends

Figure 1

WKYMVm-NH₂ - induced primary and secondary granules release as well as ROI production.

Mouse bone marrow neutrophils were stimulated with WKYMVm-NH₂; A) β -glucuronidase release from primary granules in percent of total cellular content, n = 7; B) Increase of lactoferrin - release over basal, n = 5 C) Total ROI production integrated over 5 min after stimulation in arbitrary luminescence units, n = 4. Data are shown as mean \pm SEM. D) Kinetics of WKYMVm-NH₂ and fMLF-induced ROI production, recording of non-integrated chemiluminescence representative of at least 3 experiments. The arrow indicates the time of agonist addition.

Figure 2

The PI3K inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit neutrophil activation by WKYMVm-NH₂.

Neutrophils were preincubated with 1 nM to 1 μ M wortmannin (A) or 10 and 100 μ M LY294002 (B) for 10 min prior to stimulation with 300 nM WKYMVm-NH₂ (60 nM for lactoferrin). Glucuronidase (n = 4) or lactoferrin (n = 5) release as well as ROI production (n \geq 4) were measured and the response was normalised to the control in the absence of inhibitor. In (B) hatched bars represent glucuronidase release (n = 6), closed bars lactoferrin release (n = 4) and open bars ROI production (n \geq 4). Data are shown as mean \pm SEM. * indicates statistically significant differences compared to controls (100%).

Figure 3

Glucuronidase release activated by WKYMVm-NH₂ is sensitive to inhibitors of PLC and store operated calcium influx.

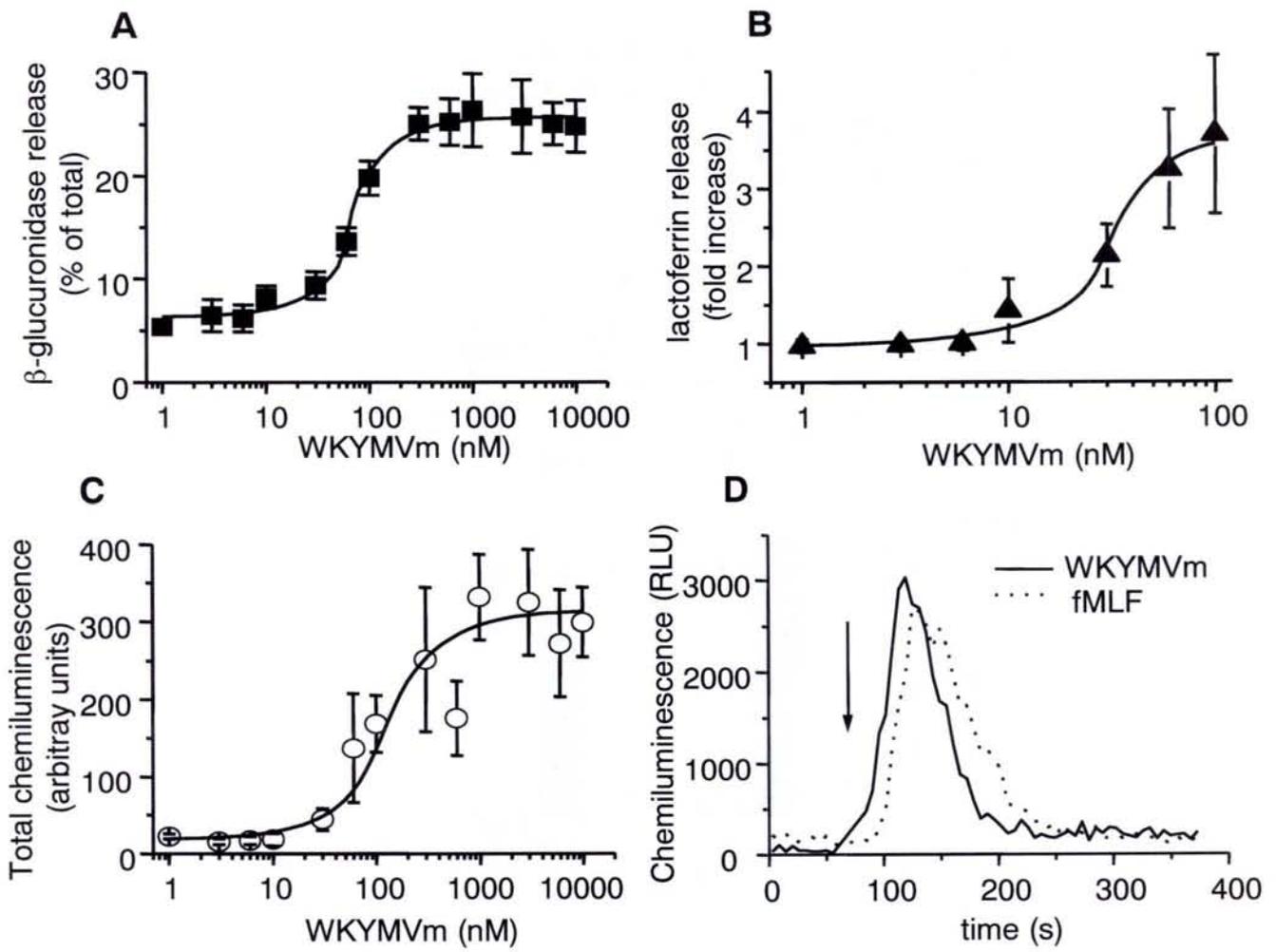
Neutrophils were preincubated with 0.1 μ M to 10 μ M U73122 (A) or 1 μ M to 100 μ M SKF96365 (B) or 1 nM to 10 μ M staurosporin for 10 min prior to stimulation

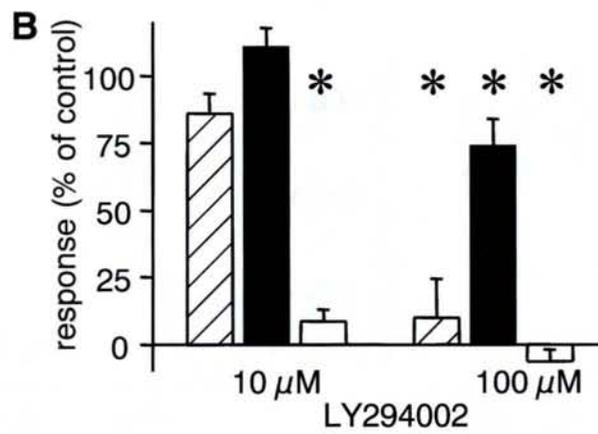
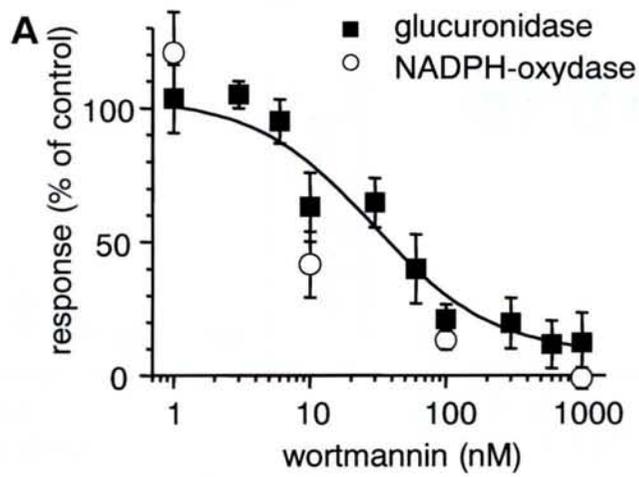
with 300 nM WKYMVm-NH₂. Glucuronidase release and ROI production (C) was measured and the response was normalised to the control in the absence of inhibitor. Filled squares represent the effect of U73122 (n = 6), SKF96365 (n = 5) and staurosporin (n = 5) on glucuronidase release. The open triangles (A) show the effect of the structural analogue U73343 on glucuronidase release (n = 4). The open circles (C) represent ROI production (n ≥ 4). The straight lines are sigmoidal fits through the glucuronidase data, the dashed line in C is a fit simulation through the ROI data. Data are shown as mean ± SEM.

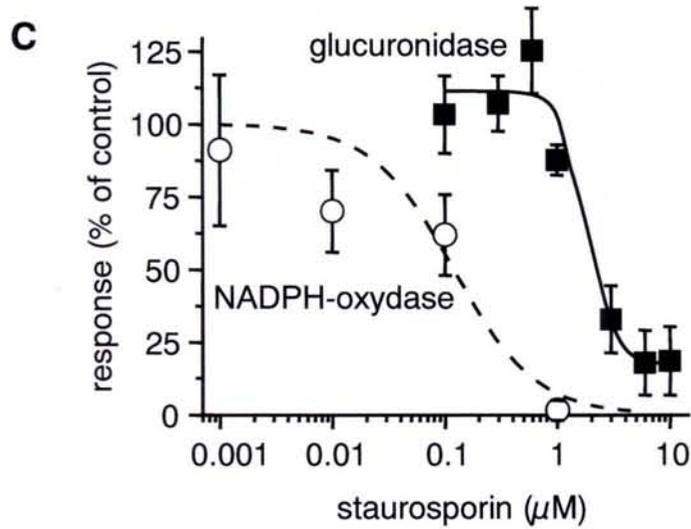
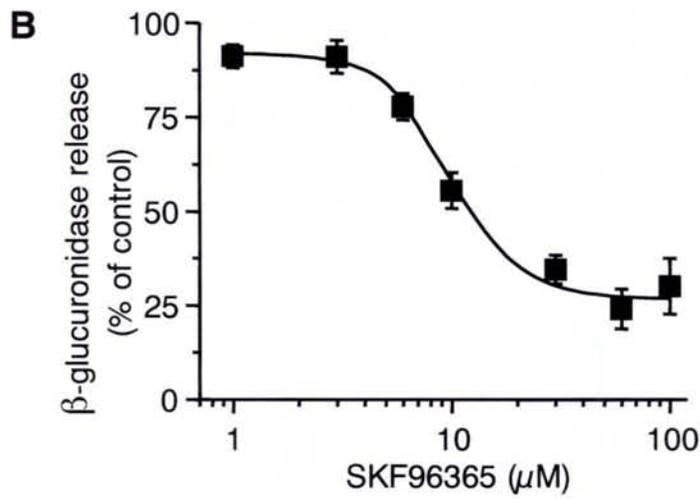
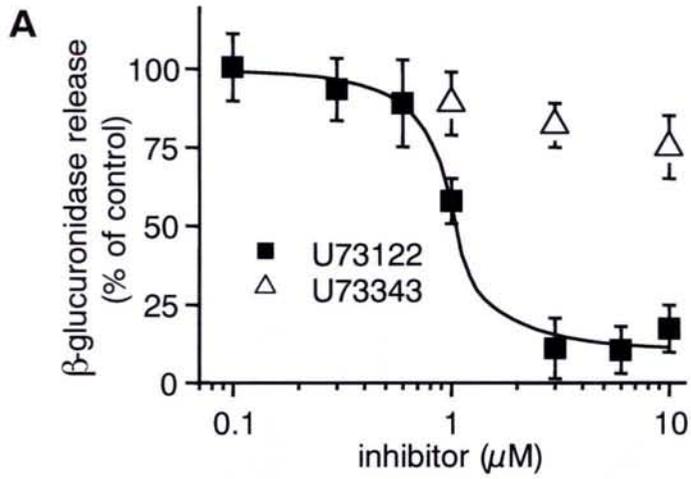
Figure 4

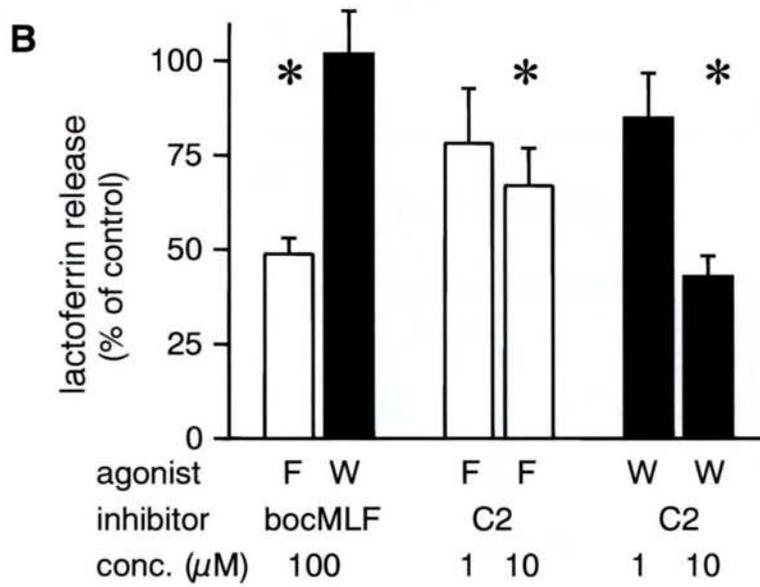
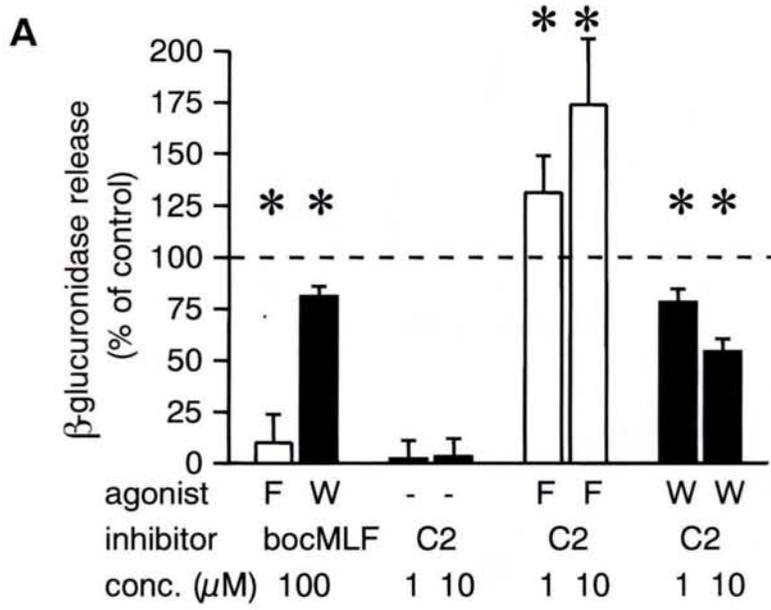
Receptor selective peptides preferentially inhibit either fMLF or WKYMVm-NH₂ stimulation.

Neutrophils were preincubated with 100 μM Boc-MLF or 1 μM or 10 μM C2 for 10 min prior to stimulation with agonist: 60 nM or 300 nM WKYMVm-NH₂ (= W in the legend) for lactoferrin or glucuronidase release respectively or 10 μM fMLF (= F in the legend) (n = 3 - 6). The response was normalised to the control in the absence of inhibitor. Data are shown as mean ± SEM. * indicates statistically significant differences compared to controls (100%).









REFERENCES

- 1 Le Y, Murphy PM, Wang JM. Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol* 2002;23:541-8.
- 2 Foyouzi-Youssefi R, Petersson F, Lew DP, Krause KH, Nüße O. Chemoattractant-induced respiratory burst: Increases in cytosolic Ca^{2+} concentrations are essential and synergize with a kinetically distinct second signal. *Biochem J* 1997;322:709-18.
- 3 Nüße O, Serrander L, Foyouzi-Youssefi R, Monod A, Lew DP, Krause KH. Store-operated Ca^{2+} influx and stimulation of exocytosis in HL- 60 granulocytes. *J Biol Chem* 1997;272:28360-7.
- 4 Baek SH, Seo JK, Chae CB, Suh PG, Ryu SH. Identification of the peptides that stimulate the phosphoinositide hydrolysis in lymphocyte cell lines from peptide libraries. *J Biol Chem* 1996;271:8170-5.
- 5 Bae YS, Kim Y, Kim Y, Kim JH, Suh PG, Ryu SH. Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met is a chemoattractant for human phagocytic cells. *J Leukoc Biol* 1999;66:915-22.
- 6 Seo JK, Choi SY, Kim Y, Baek SH, Kim KT, Chae CB, Lambeth JD, Suh PG, Ryu SH. A peptide with unique receptor specificity: stimulation of phosphoinositide hydrolysis and induction of superoxide generation in human neutrophils. *J Immunol* 1997;158:1895-901.
- 7 Christophe T, Karlsson A, Rabiet MJ, Boulay F, Dahlgren C. Phagocyte activation by Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met, acting through FPRL1/LXA4R, is not affected by lipoxin A4. *Scand J Immunol* 2002;56:470-6.
- 8 Le Y, Oppenheim JJ, Wang JM. Pleiotropic roles of formyl peptide receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12:91-105.
- 9 Boulay F, Tardif M, Brouchon L, Vignais P. The Human N-Formylpeptide Receptor. Characterization of Two cDNA Isolates and Evidence for a New Subfamily of G-Protein-Coupled Receptors. *Biochemistry* 1990;29:11123-33.
- 10 Wang ZG, Ye RD. Characterization of two new members of the formyl peptide receptor gene family from 129S6 mice. *Gene* 2002;299:57-63.
- 11 Gao JL, Lee EJ, Murphy PM. Impaired antibacterial host defense in mice lacking the N-formylpeptide receptor. *J Exp Med* 1999;189:657-62.
- 12 Bylund J, Samuelsson M, Collins LV, Karlsson A. NADPH-oxidase activation in murine neutrophils via formyl peptide receptors. *Exp Cell Res* 2003;282:70-7.
- 13 Boxio R, Bossenmeyer-Pourie C, Steinckwich N, Dournon C, Nüße O. Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils. *J Leukoc Biol* 2004;75:604-11.

- 14 Neimark J, Briand JP. Development of a fully automated multichannel peptide synthesizer with integrated TFA cleavage capability. *Pept Res* 1993;6:219-28.
- 15 Mocsai A, Ligeti E, Lowell CA, Berton G. Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J Immunol* 1999;162:1120-6.
- 16 Svensson L, Dahlgren C, Wenneras C. The chemoattractant Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met activates eosinophils through the formyl peptide receptor and one of its homologues, formyl peptide receptor-like 1. *J Leukoc Biol* 2002;72:810-8.
- 17 Tuluc F, Meshki J, Kunapuli SP. Membrane lipid microdomains differentially regulate intracellular signaling events in human neutrophils. *Int Immunopharmacol* 2003;3:1775-90.
- 18 Gewirtz AT, Fokin VV, Petasis NA, Serhan CN, Madara JL. LXA4, aspirin-triggered 15-epi-LXA4, and their analogs selectively downregulate PMN azurophilic degranulation. *Am J Physiol* 1999;276:C988-C994
- 19 Dewald B, Thelen M, Baggiolini M. Two transduction sequences are necessary for neutrophil activation by receptor agonists. *J Biol Chem* 1988;263:16179-84.
- 20 Borregaard N, Lollike K, Kjeldsen L, Sengelov H, Bastholm L, Nielsen MH, Bainton DF. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *European J Haematol* 1993;51:187-98.
- 21 Wenzel-Seifert K, Krautwurst D, Musgrave I, Seifert R. Thapsigargin activates univalent- and bivalent-cation entry in human neutrophils by a SK&F 96365- and Gd^{3+} -sensitive pathway and is a partial secretagogue: Involvement of pertussis-toxin- sensitive G-proteins and protein phosphatases 1/2A and 2B in the signal-transduction pathway. *Biochem J* 1996;314:679-86.
- 22 Li SW, Westwick J, Poll CT. Receptor-operated Ca^{2+} influx channels in leukocytes: a therapeutic target? *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:63-70.
- 23 Lavigne MC, Murphy PM, Leto TL, Gao JL. The N-formylpeptide receptor (FPR) and a second G(i)-coupled receptor mediate fMet-Leu-Phe-stimulated activation of NADPH oxidase in murine neutrophils. *Cell Immunol* 2002;218:7-12.
- 24 Bae YS, Yi HJ, Lee HY, Jo EJ, Kim JI, Lee TG, Ye RD, Kwak JY, Ryu SH. Differential activation of formyl peptide receptor-like 1 by peptide ligands. *J Immunol* 2003;171:6807-13.
- 25 Bae YS, Song JY, Kim Y, He R, Ye RD, Kwak JY, Suh PG, Ryu SH. Differential activation of formyl peptide receptor signaling by peptide ligands. *Mol Pharmacol* 2003;64:841-7.

- 26 Bae YS, Park JC, He R, Ye RD, Kwak JY, Suh PG, Ho RS. Differential signaling of formyl peptide receptor-like 1 by Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-CONH₂ or lipoxin A₄ in human neutrophils. *Mol Pharmacol* 2003;64:721-30.
- 27 Dahlgren C, Christophe T, Boulay F, Madianos PN, Rabiet MJ, Karlsson A. The synthetic chemoattractant Trp-Lys-Tyr-Met-Val-DMet activates neutrophils preferentially through the lipoxin A₄ receptor. *Blood* 2000;95:1810-8.
- 28 Bae YS, Lee HY, Jo EJ, Kim JI, Kang HK, Ye RD, Kwak JY, Ryu SH. Identification of peptides that antagonize formyl peptide receptor-like 1-mediated signaling. *J Immunol* 2004;173:607-14.
- 29 Matthews T, Salgo M, Greenberg M, Chung J, DeMasi R, Bolognesi D. Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:215-25.



FACULTE DES SCIENCES & TECHNIQUES

Service de la Scolarité
Affaire suivie par : Georges BILLANT

AVIS DU JURY SUR LA REPRODUCTION DE LA THESE SOUTENUE

Formation Doctorale

Biologie - Santé - Environnement.....

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I en

Biologie structurale, moléculaire et cellulaire

Nom et prénom de l'auteur : Melle Rachel BOXIO
Date de la soutenance : 31 Mai 2005

Président du Jury - Nom, Prénom : DOURNON Christian, Dr
Membres du Jury - Nom, Prénom : TSCHIRHART Eric, Dr
SULPICE Jean-claude, Dr
FAURE cyebert, Dr
MUNE oliver, Dr

Handwritten signatures of jury members

Handwritten signature

- Thèse pouvant être reproduite en l'état
Thèse pouvant être reproduite après corrections suggérées au cours de la soutenance
Thèse ne pouvant être reproduite

Le 31 Mai 2005
Le Président du Jury

Handwritten signature of the President of the Jury

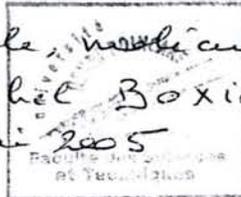
RAPPORT DE SOUTENANCE

Concernant la thèse de Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1

en Biologie structurale, ~~moléculaire~~ ^{moléculaire} et cellulaire

Présentée par : M^{lle} Rachel Boxio

Date de la soutenance : 31 Mai 2005



L'exposé oral de Madame Rachel Boxio a été clair et didactique. Alors que les résumés qu'elle a présentés dans son rapport écrit étaient nombreux, elle a su pour la soutenance orale n'en sélectionner qu'une partie, l'essentiel.

L'iconographie présentée à l'aide des nouvelles technologies de communication était appropriée. M^{lle} Boxio a montré qu'elle maîtrisait les techniques informatiques de présentation. Elle a confirmé ses compétences pédagogiques.

M^{lle} Boxio, questionnée longuement par le jury, a répondu de façon réfléchie. Ses réponses étaient concises, adaptées et argumentées. Le jury souligne la quantité de travail réalisé par M^{lle} Boxio; d'une part le temps passé à la préparation est important et la précision et la fiabilité des résumés sont grandes; et d'autre part la présentation du sujet dans le rapport écrit, et en elle-même une véritable thèse bibliographique.

Depuis le 1/01/2003 l'Université ne délivre plus de mention S.O.

Mention accordée honorable
 très honorable
 très honorable avec félicitations

Président du Jury - Nom, Prénom et signature : JOURNON Christian

Membres du Jury - Nom, Prénom et signature : TSCHIRHART Eric

SULPICE Jean-Claude

FAURE Gilbert

Mübe Oliver

Depuis la création des souris transgéniques, l'étude de l'immunité innée de cet animal a connu un regain d'intérêt. Pour exploiter au mieux ce modèle expérimental, il fallait d'abord connaître son fonctionnement normal afin de comparer les connaissances ainsi acquises chez la souris aux données connues chez l'Homme. Ceci dans le but d'appréhender et de définir les limites du modèle murin.

Nous avons isolé des neutrophiles du sang et de la moelle osseuse de souris et comparé leurs fonctions bactéricides. Nous avons montré que la moelle osseuse des souris contient une grande population de neutrophiles morphologiquement et fonctionnellement aussi matures que ceux issus du sang.

D'autre part, la découverte de nouvelles molécules visant à stimuler l'activité microbicide des neutrophiles ainsi que l'étude des voies de signalisation intracellulaire aboutissant soit à l'activation de ces cellules, à leur survie ou à leur mort accélérée, nous ont permis de mieux comprendre leur fonctionnement.

Mots clés : neutrophile; moelle osseuse; fMLF ; WKYMVm ; FPR ; voies de signalisations ; apoptose.

Since the creation of the transgenic mice, the study of the innate immunity of this animal has received renewed interest. To exploit this experimental model as well as possible, it was initially necessary to know its normal function in order to compare to our current knowledge of the human immune system. The aim is to apprehend and define the limits of the murine model.

We isolated neutrophils from mouse blood and bone marrow and compared their bactericidal functions. We have shown that mouse bone marrow contains a large population of neutrophils which are morphologically and functionally as mature as blood neutrophils.

In addition, the discovery of new molecules aiming at stimulating the microbicidal activity of neutrophils as well as the study of intracellular signalling pathways leading to either the activation of these cells, their survival or their accelerated death, allowed us to better understand their regulation.

Key words: neutrophil; bone marrow; fMLF; WKYMVm; FPR; signalling pathways; apoptosis.