

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier
Centre de recherche en santé humaine

**ACTIVATION DES NEUTROPHILES
PAR LA *VISCUM ALBUM* AGGLUTININE-I**

Par

Anik Savoie

Mémoire présenté pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Dr. Alain Fournier
INRS-Institut Armand-Frappier
Centre de recherche en santé humaine

Examineur externe

Dr. Sylvain Bourgoin
Centre de recherche du CHUQ
Rhumatologie et Immunologie

Directeur de recherche

Dr. Denis Girard
INRS-Institut Armand-Frappier
Centre de recherche en santé humaine

Résumé

Les neutrophiles sont des cellules du système immunitaire qui exercent un rôle primordial dans la réponse inflammatoire. Bien qu'ils soient les plus abondants des leucocytes dans la circulation, ceux-ci ont une courte durée de vie et leur "turnover" rapide est assuré par un mécanisme spontané d'induction d'apoptose. Toutefois, une dérégulation des mécanismes d'action des neutrophiles, incluant l'apoptose, peut engendrer des répercussions graves sur les mécanismes de réponses inflammatoires et sur la santé.

Puisque plusieurs pathologies inflammatoires peuvent être associées à une inhibition de l'apoptose des neutrophiles, l'étude d'agents immunomodulateurs pouvant potentiellement induire l'apoptose s'avère d'intérêt particulier pour la résolution de l'inflammation. Afin de bien décrire l'implication de tels agents immunomodulateurs dans l'inflammation, les effets de la *Viscum album* Agglutinine-I (VAA-I), une protéine inactivatrice du ribosome, ont été étudiés sur les neutrophiles humains.

Les objectifs du présent travail étaient premièrement d'évaluer les effets de la VAA-I sur la physiologie des neutrophiles, d'étudier le potentiel immunomodulateur de la VAA-I dans un système de neutrophiles activés par des agents pro-inflammatoires et finalement d'élucider les mécanismes d'action régissant ces effets.

Les neutrophiles du sang ont été fraîchement isolés à partir de donneurs sains. Suite au traitement avec la VAA-I, plusieurs fonctions des neutrophiles ont été étudiées soit le degré de cytotoxicité, la synthèse protéique *de novo*, l'apoptose, la phagocytose, ainsi que la phosphorylation de résidus tyrosine, sérine et thréonine. De nombreuses conditions expérimentales ont été vérifiées comme des concentrations-réponses et des cinétiques élaborées, des inhibitions de certaines voies de signalisation, ainsi que des interactions avec d'autres produits.

Les résultats obtenus nous permettent de conclure que la VAA-I est un agoniste puissant des neutrophiles. Bien que cette lectine ne soit pas cytotoxique pour les neutrophiles aux concentrations étudiées, elle induit fortement l'apoptose et inhibe la synthèse protéique *de novo* de ces cellules. La VAA-I inhibe même les effets pro-inflammatoires du GM-CSF ou de l'interleukine-15. Les mécanismes d'action

responsables de l'induction de l'apoptose par la VAA-I ne semble pas être dépendants de la phosphorylation de résidus sérine, tyrosine ou thréonine bien qu'ils soient dépendants des caspases. De plus, l'étude de la fragmentation de la gelsoline confirment l'implication de la caspase-3.

Ces résultats concordent bien avec le rôle de la VAA-I précédemment décrit dans la littérature et soulignent une fois de plus l'importance des caspases dans le processus apoptotique. Ils ont permis de décrire l'importance d'une molécule comme la VAA-I dans l'étude de l'inflammation et de faire un grand pas dans la caractérisation de son mécanisme d'action. Finalement, une partie de la discussion portera sur la relation possible entre l'induction de l'apoptose et l'inhibition de la synthèse protéique.

Anik Savoie

Étudiante

Du W

Directeur de recherche

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le docteur Denis Girard, pour sa disponibilité, ses conseils, son support, son dynamisme et sa compréhension.

Je tiens à remercier le CRSNG pour la bourse d'étude de deuxième cycle qui m'a été accordée.

J'aimerais remercier notre technicienne Annie Couture qui a toujours su si bien me conseiller. Merci pour tout ce que tu m'as appris, ton aide et ton beau travail.

Merci à Pierrette Labbé qui a su m'initier au travail de laboratoire.

Merci à Martin Pelletier. Mon collègue des tout débuts, un ami pour toujours.

Merci à tous les membres de l'équipe qui sont par la suite venus se joindre à nous. Marc Gauthier, Valérie Lavastre ainsi que la stagiaire Karine Lemieux et les stagiaires Claude Ratté et Thiphavone Oudanonh.

Merci au gens de l'institut pour leur coopération, tous les bons conseils et leur contribution si importante en neutrophiles fraîchement isolés très tôt chaque matin.

Un gros merci à Stéphane pour les bons moments passés ensemble.

Un merci tout spécial à ma petite soeur qui même éloignée a su toujours me faire rire.

Merci à mon père, mon ange gardien qui veille toujours sur moi.

Finalement, merci à ma mère pour son exemple de ténacité, de bonté et pour avoir toujours été là pour moi.

Table des matières

Résumé	ii
Remerciements	iv
Liste des abréviations	vi
Liste des figures	vii
Introduction	1
Première section : Revue de littérature du domaine de recherche.....	3
1. Le système immunitaire	4
1.1. L'immunité innée	5
1.1.1. Les phagocytes	5
1.1.1.1. Les phagocytes mononuclés.....	6
1.1.1.2. Le neutrophile : un polymorphonucléaire	7
1.1.1.3. Les cellules cytotoxiques et les cellules accessoires	7
1.2. L'immunité acquise.....	8
1.2.1. Les lymphocytes B et l'immunité humorale	8
1.2.2. Les lymphocytes T et l'immunité à médiation cellulaire	9
1.3. L'inflammation.....	10
1.3.1. L'élaboration de l'inflammation : Phase aiguë.....	10
1.3.2. Résolution de l'inflammation.....	12
1.3.3. L'apoptose et la nécrose	12
1.3.3.1. Les voies de signalisation lors de l'induction de l'apoptose	13
1.3.3.1.1. Les récepteurs membranaires et l'induction de l'apoptose.....	14
1.3.3.1.2. Les domaines de mort et les caspases.....	14
1.3.3.1.3. La signalisation intracellulaire	15
1.3.3.1.4. L'implication de la mitochondrie dans l'apoptose	15
1.3.4. L'inflammation chronique	17
2. Le neutrophile	18
2.1. Le rôle des neutrophiles et la réaction inflammatoire.....	19
2.2. La migration des neutrophiles et l'élaboration de la réponse immunitaire	19
2.3. La phagocytose	23
2.4. La destruction des pathogènes	23
2.4.1. Lyse cellulaire dépendante de l'oxygène	24
2.4.2. Lyse cellulaire indépendante de l'oxygène	26
2.5. L'élimination des neutrophiles et la résolution de l'inflammation	26
3. La <i>Viscum album</i> Agglutinine-I	30
3.1. Les protéines inactivatrices du ribosome	30
3.2. La ricine et l'abrin	31
3.2.1. Les immunotoxines	32
3.3. Lectines de l'extrait de gui.....	33
3.3.1. La VAA-I.....	34
3.3.2. Études précédentes	35
3.3.2.1. L'apoptose et la VAA-I.....	38
4. L'interleukine-15	39
4.1. Rôle de l'IL-15 dans la réponse immunitaire et inflammatoire.....	40
Seconde section : Les articles scientifiques	42
Résumé du premier article.....	43
Résumé du second article	53
Troisième section : Discussion.....	86
Discussion	87
Bibliographie.....	92

Liste des abréviations

AIF	Apoptosis-inducing factor
APAF-1	Apoptosis protease activating factor-1
BCL-	B-cell lymphoma / leukemia-
BCR	B cell receptor / récepteur d'antigènes des cellules B
C3b	Complément 3b
Ca ⁺	Calcium
CD-	Cluster of differentiation / agent de différenciation
CFU-G	Colony forming unit granulocyte
CFU-GM	Colony forming unit granulocyte macrophage
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CR	Récepteur du complément
FADD	Fas associated death domain protein
Fc	Récepteur d'immunoglobuline
FLICE	FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme
GM-CSF	Granulocyte-macrophage stimulating factor
ICE	Interleukine-1 β converting enzyme
IFN- γ	Interféron-gamma
Ig	Immunoglobuline
IL-	Interleukine-
JAK	JANUS kinase
LFA	Lymphocyte function-associated
LGL	Large granular lymphocyte / Grand lymphocyte à granule
LPS	Lipopolysaccharide
LTB ₄	Leucotriène B ₄
MACH	Mort-associated CED-3 homologue
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
NT (s) ¹	Neutrophile (s)
PBL	Peripheral blood lymphocytes / Lymphocytes du sang périphérique
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells / Cellules mononucléées du sang périphérique
RIP	Ribosome inactivating proteins / protéines inactivatrices du ribosome
STAT	Signal transducers and activators of transcription
Tc	Lymphocytes T cytotoxiques
TCR	T cell receptor / récepteur d'antigènes des cellules T
Th	Lymphocytes T auxiliaires
TNF- α	Tumor necrosis factor / facteur nécrosant des tumeurs
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor / récepteur du facteur nécrosant de tumeurs
TRADD	TNFR1 associated death domain protein
Ts	Lymphocytes T supresseurs
VAA-I	<i>Viscum album</i> Agglutinin-I

¹ Bien que l'abréviation PMN soit communément utilisée dans la littérature pour désigner le neutrophile, NT sera ici utilisé.

Liste des figures

Figure 1 : Photographie d'un frottis sanguin.	4
Figure 2 : La différenciation des leucocytes (Adaptée de Révillard, 1998)	5
Figure 3 : La coopération cellulaire dans la réponse inflammatoire	11
Figure 4 : Mécanisme simplifié de signalisation extra et intracellulaire lors de l'induction de l'apoptose.....	16
Figure 5 : Photographie de neutrophiles humains fraîchement isolés	18
Figure 6 : Adhésion et migration des neutrophiles (Adaptée de Roit, 1998)	21
Figure 7 : L'implication du neutrophile dans la réponse inflammatoire.....	22
Figure 8 : La formation des anions superoxyde dans la bactéricidie dépendante de l'oxygène. ...	24
Figure 9 : L'action de la myéloperoxydase et des halogènes dans la bactéricidie.....	25
Figure 10 : La voie de l'oxyde nitrique dans l'activité bactéricide	25
Figure 11 : Comparaison de la morphologie entre un neutrophile normal et un neutrophile apoptotique.....	27
Figure 12: Structure tri-dimensionnelle de la VAA-I (Krauspenhaar, 1999).	35

Introduction

Les neutrophiles (NTs) exercent un rôle de premier plan dans la réaction immunitaire immédiate suite à une blessure ou à une infection. Ce sont les premières cellules à migrer vers le foyer inflammatoire et à enclencher une élaboration de l'inflammation en plus de participer à l'élimination des pathogènes par la phagocytose. La durée de vie des NTs dans la circulation est très courte, soit de 6-18 h et leur élimination est assurée par un mécanisme d'induction spontanée de l'apoptose suivi de leur phagocytose par les macrophages éboueurs. Toutefois, ce mécanisme d'induction spontanée de l'apoptose se voit retardé, suite à la migration des NTs sur un site inflammatoire, afin d'assurer une participation adéquate de ceux-ci. Ce processus est toutefois normalement rétabli, lorsque l'agent inflammatoire est maîtrisé et une résolution de l'inflammation s'ensuit, afin d'éviter des dommages tissulaires.

Plusieurs pathologies sont associées à une persistance de l'inflammation souvent engendrée par un dérèglement de facteurs endogènes comme des agents pro-inflammatoires. Dans de tels cas, l'apoptose des NTs est retardée et l'élimination par les macrophages n'a pas lieu. Ainsi, une accumulation de NTs et des dommages aux tissus s'ensuivent. Par conséquent, l'étude d'agents immunomodulateurs pouvant induire l'apoptose des cellules peut s'avérer d'intérêt clinique pour atténuer l'inflammation.

La *Viscum album* agglutinine-I (VAA-I) est une lectine de plante qui a été isolée à partir du gui. Comme bien d'autres protéines de la classe des protéines inactivatrices du ribosome (RIP), elle possède des propriétés immunomodulatrices chez plusieurs types cellulaires comme les lymphocytes du sang périphérique (PBL : peripheral blood lymphocyte) et les monocytes. On lui associe même un rôle anti-tumoral ainsi qu'anti-viral important. Toutefois, cette lectine a plusieurs propriétés anti-inflammatoires typiques que l'on a négligé d'étudier. Son effet sur la modulation des NTs a jusqu'à ce jour été peu étudié. Afin d'évaluer les effets pro- ou anti-inflammatoires de la VAA-I, nous avons étudié l'interaction VAA-I/NTs ainsi que l'interaction entre un agent pro-inflammatoire/NTs/VAA-I. L'interleukine-15 (IL-15) a été utilisée comme agent pro-inflammatoire car cette cytokine semble être un agent inducteur de l'inflammation chronique dans certaines pathologies comme l'arthrite rhumatoïde. De plus, elle est connue pour activer les NTs.

La présente recherche porte donc sur la caractérisation *in vitro* de l'effet de la VAA-I et de l'interaction entre VAA-I / IL-15 sur certaines fonctions du NTs. L'étude de la modulation des fonctions classiques du NT a été effectuée afin de caractériser l'aspect général de l'interaction. De plus, des études visant à élucider le mode d'action de la VAA-I ont fait l'objet de cette recherche.

Le présent mémoire se compose d'une première section relatant les recherches connexes déjà effectuées dans le domaine. Les résultats des recherches portant premièrement sur l'interaction VAA-I/NTs et, en second lieu, sur l'interaction VAA-I/IL-15/NTs seront par la suite présentés sous forme d'articles scientifiques. Finalement, une section sur l'impact de cette recherche et de ses avenues vient conclure ce mémoire.

Première section : Revue de littérature du domaine de recherche

1. Le système immunitaire

L'organisme est protégé de son environnement par une multitude de barrières physiologiques, chimiques et cellulaires qui préviennent une invasion trop massive d'agents infectieux. Il est inévitable que certains agents infectieux parviennent tout de même à déjouer notre système de défense. Cependant, la plupart des infections guérissent rapidement et laissent peu de séquelles, car ces agents infectieux sont détruits et éliminés par le système immunitaire. Toutefois, afin d'être bénéfique pour l'organisme, la réponse immunitaire doit être très spécifique en réagissant seulement avec les antigènes nécessitant une réaction. Il doit y avoir reconnaissance du soi et du non-soi pour un antigène nouveau aussi bien qu'un antigène précédemment rencontré par l'organisme. Le lieu de l'infection et la nature de l'agent infectieux déterminent grandement quel type de réponse immunitaire sera efficace.

Les réponses immunitaires sont assurées par différentes composantes cellulaires et moléculaires qui agissent en coordination. Ces cellules forment une collection disparate de cellules présentes dans le sang et dans les tissus de tout l'organisme. Les leucocytes représentent le groupe de cellules les plus nombreuses du système immunitaire qui est composé de plusieurs autres types cellulaires (Figure 1) (Roitt, Brostoff et Male, 1997 : 2).

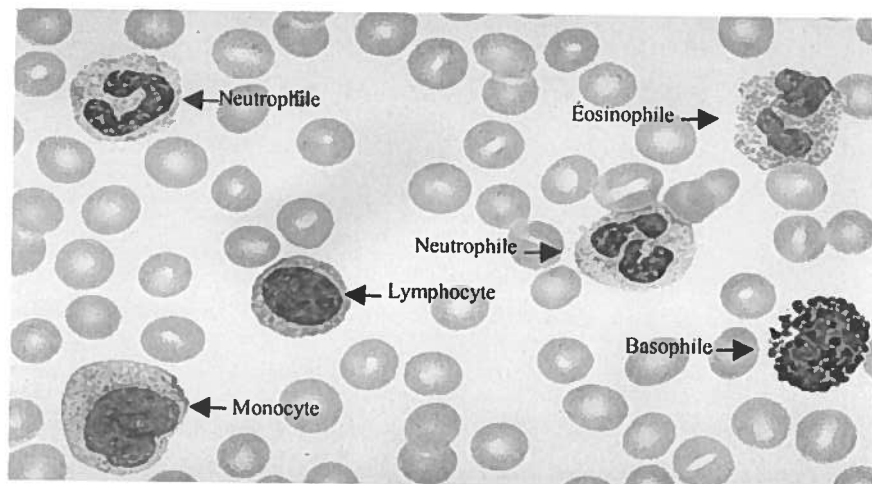


Figure 1 : Photographie d'un frottis sanguin.

Les leucocytes sont d'origine hématopoïétique et se différencient en divers types cellulaires à partir de cellules souches myéloïdes pluripotentes. L'hématopoïèse est caractérisée par des étapes de différenciations définies par des modifications particulières où les cellules acquièrent des caractères morphologiques et physiologiques distinctifs (figure 2) (Révillard, 1998 : 112).

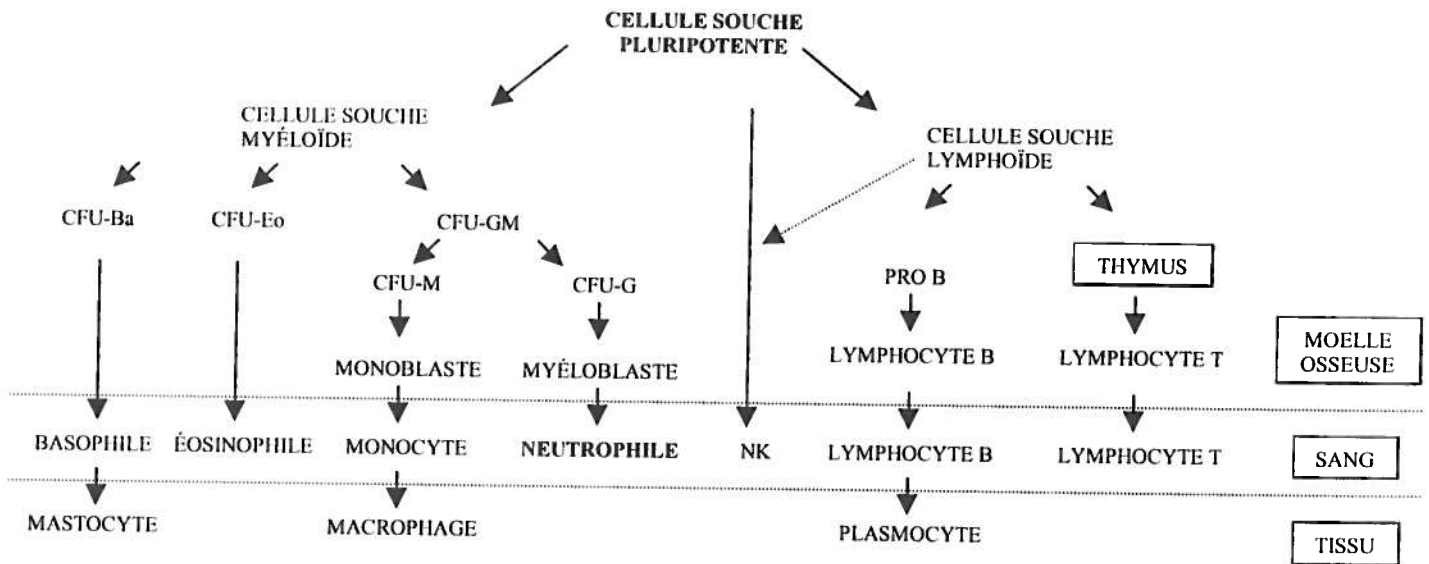


Figure 2 : La différenciation des leucocytes (Adaptée de Révillard, 1998)

1.1. L'immunité innée

Dès la naissance, une immunité innée est conférée à l'organisme puisque le corps possède une multitude d'éléments lui permettant de lutter contre des agents infectieux et d'élaborer une réponse immunitaire. Ces éléments, qui sont de nature non-spécifique, incluent les barrières physiologiques et chimiques comme la barrière cutanéomuqueuse, la peau et les phanères, des médiateurs chimiques ainsi que des mécanismes de défenses cellulaires comme les cellules phagocytaires. Tous ces éléments permettent d'isoler le corps de tout agent pouvant poser une menace à l'intégrité de l'organisme et de les éliminer en cas d'infection (Benjamini, Sunshine et Leskrowitz, 1996 : 20).

1.1.1. Les phagocytes

La phagocytose peut se définir comme un processus de capture et d'ingestion de particules solides inertes ou vivantes par une cellule (Benjamini, Sunshine et Leskrowitz, 1996 : 465). Ces cellules, les phagocytes, sont les principaux acteurs de la réaction immunitaire naturelle ou non-spécifique. Parmi celles-ci, on retrouve principalement les phagocytes mononucléés de la lignée monocyte-macrophage ainsi que les leucocytes polymorphonucléaires.

1.1.1.1. Les phagocytes mononucléés

Les monocytes en circulation dans le sang migrent continuellement vers les différents tissus où ils subissent une dernière étape de leur différenciation. Bien qu'ils soient tous anatomiquement et physiologiquement très semblables, ces monocytes différenciés apparaissent sous diverses formes "macrophagiques", selon les tissus dans lesquels on les retrouve. Par exemple, on retrouve des macrophages alvéolaires dans les poumons et des cellules de Kupffer dans le foie. Une fois fixés dans les tissus, les macrophages revêtent des aspects cytologiques et des fonctions distinctes de celles des monocytes, comme l'acquisition de la cytotoxicité et de la bactéricidie (par production de dérivés activés de l'oxygène et de monoxyde d'azote) (Révillard, 1998 : 114). Ils sont localisés à des endroits stratégiques, le long de la paroi des capillaires, et sont ainsi les premières cellules à entrer en contact avec les agents pathogènes ou des antigènes (Benjamini, Sunshine et Leskrowitz, 1996 : 23). Bien que tous les macrophages soient des phagocytes, on en retrouve deux types. Certains détruisent complètement les particules phagocytées pour les excréter sous des formes réduites, ce sont les macrophages éboueurs, alors que d'autres dégradent seulement partiellement et présentent les antigènes à la surface de leur membrane pour initier une réponse immunitaire spécifique, ce sont les macrophages CPA (cellules présentatrices d'antigènes) (Benjamini, Sunshine et Leskrowitz, 1996 : 5).

1.1.1.2. Le neutrophile : un polymorphonucléaire

Les NTs forment la deuxième catégorie de phagocytes représentant environ 70% des leucocytes du sang (Male, 1999 : 13). Après avoir quitté la moelle osseuse, ils ont une vie très courte d'environ 8 à 20 heures dans la circulation (Edwards, 1994 : 4). Les NTs peuvent fixer et phagocyter les particules opsonisées car ils possèdent des récepteurs membranaires d'immunoglobulines (Fc) ainsi que des récepteurs pour certaines composantes du complément. Enfin, suite à l'internalisation de la particule, les NTs la dégradent complètement à l'aide d'enzymes hydrolytiques, de réactifs activés dérivés de l'oxygène et de protéines bactéricides contenues dans leurs granules. Ils jouent ainsi un rôle essentiel dans la défense contre les micro-organismes à réplication extracellulaire, principalement les bactéries et les levures (Révillard, 1998 : 113). Une discussion plus détaillée sur les NTs est présentée à la section 2 du Mémoire.

1.1.1.3. Les cellules cytotoxiques et les cellules accessoires

Les grands lymphocytes à granules (LGL : large granular lymphocytes) et les éosinophiles sont des cellules cytotoxiques à caractère non-spécifique. On peut associer deux types cellulaires à cette population de lymphocytes soit les cellules tueuses (K : killer) et les cellules tueuses naturelles (NK : natural killer). Les cellules K ont des récepteurs Fc qui leurs permettent de reconnaître les cellules cibles sensibilisées par un anticorps tandis que les cellules NK ont des récepteurs membranaires qui se lient à des glycoprotéines de surface qui caractérisent les cellules tumorales et les cellules infectées par un virus (Male, 1999 : 7). Ces récepteurs peuvent délivrer des signaux inhibiteurs ou activateurs de cytotoxicité et de synthèse de cytokines.

Les éosinophiles, qui représentent moins de 3 % des leucocytes du sang, relarguent aussi des molécules cytotoxiques dans le milieu extracellulaire, mais celles-ci sont plutôt activées par des médiateurs chimiques, comme des cytokines ou des anticorps (Révillard, 1998 : 113). Leurs granules contiennent des enzymes qui exercent des activités cytotoxiques vis-à-vis de l'endothélium, de l'épiderme, des cellules pulmonaires, trachéales, cardiaques et nerveuses (Roitt, Brostoff et Male, 1997 : 5).

Finalement, il y a les basophiles qui représentent moins de 1% des leucocytes du sang et leurs homologues localisés dans les tissus principalement pulmonaires, les

mastocytes. Ces deux types cellulaires possèdent des récepteurs membranaires d'immunoglobuline E (IgE) de haute affinité qui s'agrègent par l'intermédiaire des anticorps IgE liés à un antigène multivalent, entraînant leur dégranulation avec libération de médiateurs préformés et synthèse de médiateurs néoformés. Ces cellules jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de défense contre les parasites et dans les réactions d'allergie mettant en jeu les anticorps de classe IgE (Revillard, 1998 : 114).

1.2. L'immunité acquise

Tout au long de la vie, les organismes vertébrés développent de plus en plus une immunité acquise. Cette dernière est plus spécifique que l'immunité innée et procure à l'organisme une protection supplémentaire qui lui permet de résister à des attaques subséquentes d'un même agent. Elle met en jeu la reconnaissance des constituants du micro-organisme appelés antigènes par des récepteurs très diversifiés présents sur des lymphocytes T et B. Chaque antigène interagit de façon spécifique avec un nombre limité de lymphocytes T et B qui expriment en général une seule espèce moléculaire de récepteurs par cellule (Benjamini, Sunshine et Leskowitz, 1996 : 28).

On retrouve deux types d'immunités acquises, l'immunité humorale et l'immunité à médiation cellulaire.

1.2.1. Les lymphocytes B et l'immunité humorale

L'immunité humorale est assurée par les lymphocytes B via les anticorps en circulation qu'ils sécrètent. À leur maturité, ils expriment à leur surface des IgM et des IgD qui forment les BCR (B cell receptor), les récepteurs antigéniques des lymphocytes B (Janeway et Travers, 1997 : 144). Suite à leur activation par un antigène, un lymphocyte T ou une cytokine appropriée, les lymphocytes B se différencient en plasmocytes, des cellules spécialisées dans la production et la sécrétion d'anticorps. Ces anticorps sont en fait des récepteurs solubles qui se lient spécifiquement à l'antigène et qui agissent comme des adaptateurs flexibles, des opsonines, qui permettent aux éléments du système immunitaire, tels que les phagocytes, de reconnaître de façon spécifique des micro-organismes ainsi que leurs produits. L'interaction antigène-anticorps permet aussi

d'activer le système du complément qui induit la phagocytose en augmentant l'opsonisation ainsi que le chimiotactisme des cellules (Benjamini, Sunshine et Leskowitz, 1996 : 146).

Les lymphocytes B peuvent emprunter un tout autre sentier de différenciation. Suite à une première réaction avec un antigène quelconque, certains lymphocytes B sont différenciés en lymphocytes B mémoires qui synthétisent et expriment des IgG spécifiques à cet antigène, ce qui augmente la vitesse et l'intensité de la réponse immunitaire suite à un stimulus subséquent (Benjamini, Sunshine et Leskowitz, 1996 : 147).

1.2.2. Les lymphocytes T et l'immunité à médiation cellulaire

D'autre part, les lymphocytes T sont responsable de l'immunité cellulaire. Contrairement aux lymphocytes B qui produisent des anticorps, les lymphocytes T produisent plutôt des cytokines en plus d'avoir la capacité de se rendre directement au foyer inflammatoire afin d'interagir avec l'antigène. Il existe plusieurs populations de lymphocytes T qui agissent différemment avec l'antigène.

Après stimulation par un antigène, les lymphocytes T se différencient en lymphocytes T régulateurs (Th : lymphocytes T auxiliaires ou Ts : lymphocytes T suppresseurs) qui modulent le développement et l'expression de la réponse immunitaire. Les lymphocytes T auxiliaires sécrètent des cytokines pouvant activer la division et la différenciation des lymphocytes B, la production d'anticorps ainsi qu'influencer la migration et l'activation d'autres cellules immunitaires, tandis que les lymphocytes suppresseurs peuvent supprimer la réponse immunitaire menant à une inhibition des autres cellules effectrices. Le second type de lymphocytes, les lymphocytes T effecteurs cytotoxiques (Tc), sont plutôt responsables de la destruction des cellules de l'hôte infectées par des virus ou des parasites intracellulaires (Roitt, Brostoff et Male, 1997 : 4).

Les lymphocytes T utilisent un récepteur spécifique très semblable aux IgGs des lymphocytes B. Le récepteur d'antigènes des cellules T (TCR : T cell receptor) interagit toutefois seulement avec les antigènes à la surface de la cellule qui sont associés à certaines molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Enfin, le TCR est

associé aux nombreuses chaînes du CD3 (cluster of differentiation 3) qui transmettent la signalisation après la liaison avec l'antigène. Le TCR et le CD3 forment un complexe récepteur (Roitt, Brostoff et Male, 1997 : 55).

1.3. L'inflammation

L'inflammation se caractérise par une réaction locale de l'organisme face à un agent agressant. Ainsi, le processus inflammatoire est initié par des facteurs endogènes ou exogènes qui peuvent menacer l'organisme, comme la pénétration d'un agent infectieux, la stimulation par un antigène, ou une blessure. L'inflammation se veut généralement une réaction de protection pour l'organisme qui se caractérise par trois étapes, l'initiation, l'amplification et la résolution.

1.3.1. L'élaboration de l'inflammation : Phase aiguë

À l'intérieur des quelques minutes suivant une blessure, le processus inflammatoire est initié et met en jeu des mécanismes de l'immunité innée. Il y a activation et augmentation de protéines de la phase aiguë qui appartiennent au système du complément. L'activation de certaines composantes du système du complément induit la libération de peptides aux effets activateurs pour les cellules endothéliales. La libération de ces agents a de plus un effet chimiotactique et activateur pour les cellules du système immunitaire (Trowbridge et Emling, 1997 : 19). Ces signaux d'activation déclenchent le processus de migration leucocytaire à travers l'endothélium vasculaire. Bien que la migration ait généralement lieu au niveau des veinules où le flux sanguin est plus faible, il doit y avoir ralentissement des cellules circulantes afin d'avoir une adhésion ferme subséquente permettant la migration. Ce ralentissement initial des leucocytes, le roulement, est dû aux molécules d'adhésion de la classe des sélectines de l'endothélium qui interagissent avec les hydrates de carbone des leucocytes. Les leucocytes ainsi ralentis sont activés par les agents chimiotactiques provenant du foyer inflammatoire. Cette activation régule positivement les intégrines indispensables pour établir une liaison plus solide des leucocytes à l'endothélium et il y a apparition d'une deuxième classe de molécules d'adhésion, les intégrines. Les intégrines ont une très grande affinité pour leurs

récepteurs sur les cellules endothéliales ce qui permet aux leucocytes de se fixer sur les molécules d'adhésion intercellulaires. Ces deux dernières classes de molécules d'adhésion sont reliées au cytosquelette de chacune des cellules, ce qui permet au leucocyte de se tracter lui-même à travers l'endothélium (Roitt, Brostoff et Male, 1997 : 187). L'ordre d'apparition des molécules d'adhésion sur les cellules de la paroi vasculaire déterminerait la séquence de migration des différents types cellulaires (Abramson, 1993 : 31).

Les NTs sont les premières cellules à migrer vers le site d'une inflammation où ils entreprennent de phagocyter les particules effectrices (Edwards, 1994 : 6). Dès que ces cellules atteignent le foyer inflammatoire, elles libèrent des médiateurs qui induisent le chimiotactisme d'autres NTs, c'est l'amplification de l'inflammation (Edwards, 1994 : 31). Si l'inflammation persiste, d'autres leucocytes vont aussi migrer vers le foyer inflammatoire. Les macrophages vont augmenter l'activité phagocytaire tandis que les lymphocytes réagissent aux antigènes étrangers et induisent la réponse immunitaire acquise spécifique à ces antigènes. Finalement, la réponse inflammatoire aiguë se termine par la résolution de l'inflammation ou par le développement d'une réponse inflammatoire chronique (Trowbridge et Emling, 1997 : 130).

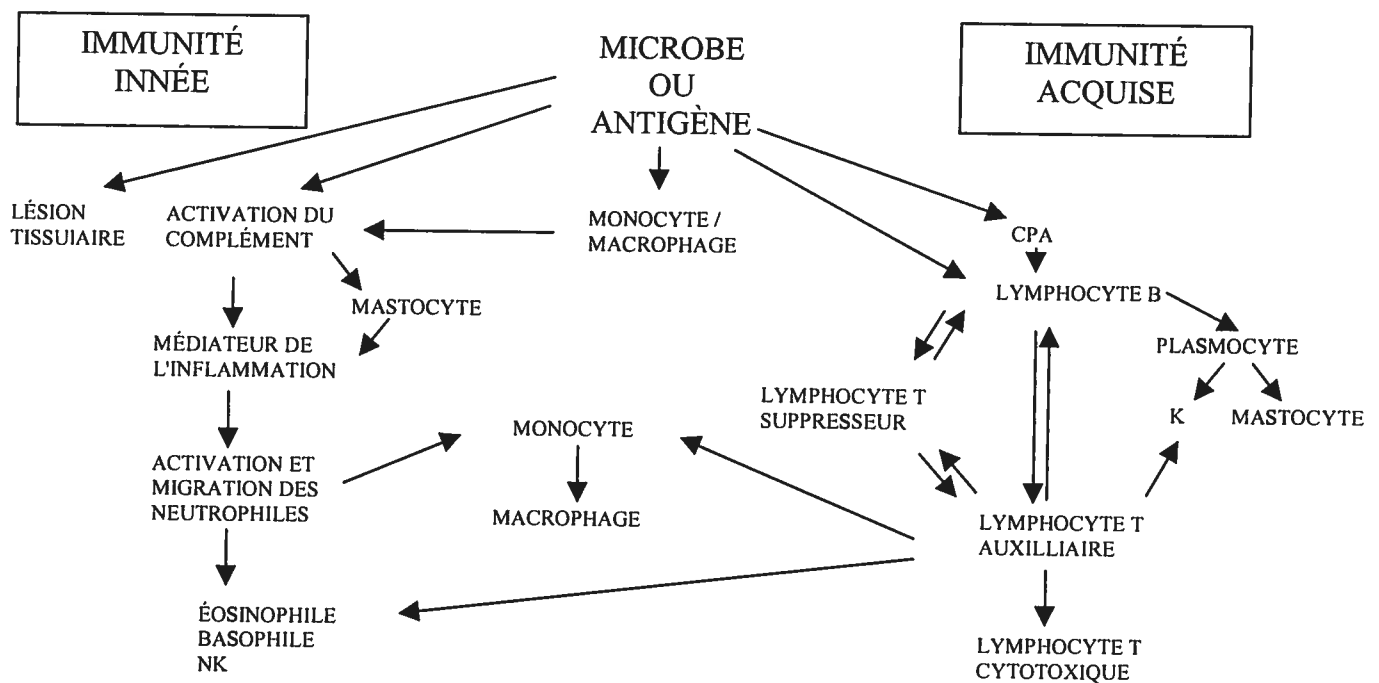


Figure 3 : La coopération cellulaire dans la réponse inflammatoire

1.3.2. Résolution de l'inflammation

En général, la réponse inflammatoire se termine par la résolution de l'inflammation. En fait, les réactions inflammatoires dépendent de la persistance de l'antigène (Trowbridge et Emling, 1997 : 131). Si l'antigène est éliminé, la migration cellulaire cesse et les cellules retournent à la circulation, tandis que d'autres meurent avant d'être éliminées.

Le prérequis essentiel à une bonne résolution de l'inflammation est l'élimination des cellules inflammatoires et de leur contenu toxique des tissus, sans quoi leur accumulation pourrait créer des dommages irréversibles et une persistance de l'inflammation caractéristique de plusieurs pathologies (Haslett et al., 1994). Les macrophages sont responsables d'éliminer tout ce qui persiste sur le site inflammatoire, sans toutefois élaborer l'inflammation. Ceux-ci phagocytent les débris cellulaires ainsi que les cellules sénescents ou apoptotiques via des récepteurs spécifiques à des composantes des cellules apoptotiques n'induisant pas la relâche de médiateurs pro-inflammatoires. Une étape cruciale de la résolution de l'inflammation implique donc la mort cellulaire des cellules qui ne retournent pas à la circulation comme les NTs, les éosinophiles et quelques lymphocytes T et monocytes (Savill et Haslett, 1995, Akbar et al., 1994 et Mangran, Welch et Wahl, 1991). Des mécanismes pouvant provoquer la mort et l'élimination des cellules persistantes doivent être activés afin d'arrêter la réponse inflammatoire, d'obtenir une bonne résolution de l'inflammation et de rétablir l'homéostasie

1.3.3. L'apoptose et la nécrose

Lors du processus normal de la résolution de l'inflammation, il existerait un juste équilibre entre la mort cellulaire par nécrose et par apoptose afin d'assurer une résolution de l'inflammation des plus efficace (Haslett et al., 1994).

La nécrose est souvent associée à une mort cellulaire brusque suivant une blessure sévère ou un traumatisme physique ou chimique. Dans la nécrose, il y a dérèglement des fonctions de la mitochondrie, du noyau et autres organelles, perte du contrôle de la

perméabilité membranaire et gonflement de la cellule qui devient rapidement incapable de maintenir son homéostasie. La membrane plasmique se brise et le contenu souvent toxique de la cellule s'échappe dans le milieu extracellulaire. Suivant la nécrose, les débris cellulaires et le contenu toxique sont phagocytés par les macrophages, afin de limiter l'étendue des blessures pouvant survenir. L'induction de la nécrose est cependant plutôt rare dans les cas de résolution de l'inflammation .

À l'opposé de la nécrose, l'apoptose est plutôt un suicide programmé de la cellule qui permet de maintenir un taux constant de cellules dans l'organisme, ou dans un tissu, tout en permettant des renouvellements cellulaires. Elle se caractérise par une succession de changements morphologiques et physiologiques de la cellule, comme une augmentation du pH intracellulaire et du calcium (Ca^+) intracellulaire, l'activation de cascades d'enzymes (caspases), une condensation et fragmentation de l'ADN, un rapetissement de la cellule, ainsi qu'une perte de certaines fonctions comme la synthèse protéique, la phagocytose et la flambée oxydative qui mènent à la mort de la cellule (Green et Reed, 1998 et Cohen, 1993). Contrairement à la nécrose, où il y a mort de la cellule par lyse, lors de l'apoptose, l'intégrité de la membrane plasmique est conservée. En effet, lors de l'apoptose, la membrane plasmique bourgeonne et la cellule se divise en petites vésicules nommées les corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques sont rapidement phagocytés et éliminés par les macrophages éboueurs sans fuite du contenu cellulaire toxique dans le milieu extracellulaire, prévenant ainsi toute forme d'inflammation (Green et Reed, 1998 et Cohen, 1993).

1.3.3.1. Les voies de signalisation lors de l'induction de l'apoptose

Il existe plusieurs niveaux de contrôle des mécanismes normaux de résolution de l'inflammation. Ainsi, l'étude de la mécanistique de l'induction de la mort cellulaire est aussi importante que l'étude des mécanismes de la reconnaissance de ces cellules à éliminer par les macrophages éboueurs. Les mécanismes d'induction de l'apoptose sont encore très peu connus. Toutefois, des voies typiques que partagent de nombreux types de cellules semblent être impliquées.

1.3.3.1.1. Les récepteurs membranaires et l'induction de l'apoptose

Des récepteurs à la surface des cellules seraient responsables de l'induction de l'apoptose. Les récepteurs FAS (CD 95/APO1) et TNFR1 (tumor necrosis factor receptor / récepteur du facteur nécrosant de tumeurs), que l'on retrouve à la surface de nombreux types cellulaires, seraient responsables de l'activation des mécanismes menant à la mort cellulaire par apoptose (Lile et al., 1996 et Watson et al., 1997). En effet, suite à l'interaction de ces deux récepteurs avec leur ligand physiologique respectif, soit FAS LIGAND et TNF- α (tumor necrosis factor / facteur nécrosant des tumeurs) (Lile et al., 1996, Watson et al., 1997 et Takeda et al., 1993), la partie cytoplasmique du récepteur, nommée le domaine de mort, active une série de réactions en cascade menant à la mort.

1.3.3.1.2. Les domaines de mort et les caspases

Les domaines intracellulaires des récepteurs FAS et TNFR1 sont respectivement associés à des protéines membranaires appelées les domaines de mort FADD/MORT1 (Fas associated death domain protein) (Chinnaiyan et al., 1995) et TRADD (TNFR1 associated death domain protein) (Hsu, Xiong et Goeddel, 1995). Ceux-ci transmettent les signaux apoptotiques initiés par les ligands en activant les caspases.

Les composantes centrales de la machinerie de l'apoptose s'appuient sur un système protéolytique en cascade incluant des protéases nommées les caspases. Les caspases sont des enzymes cystéiques qui, lorsque activées suite au clivage de leur pro-domaine, scindent spécifiquement certaines protéines suivant des résidus d'aspartate pour désorganiser la cellule et ainsi induire l'apoptose. (Alnemri Et al., 1996, Thornberry et al., 1992 et Miura et al., 1993). Il existe plusieurs caspases avec des fonctions qui dépendent souvent du type cellulaire (Denis et al., 1998). Certaines caspases sont associées aux récepteurs membranaires et sont capables d'activer d'autres caspases; ce sont les caspases initiatrices. Les caspases effectrices ont plutôt des effets sur des protéines essentielles à la survie cellulaire, des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN (poly (ADP-ribose) polymérase), des composantes du cytosquelette (gelsoline) ou des facteurs nucléaires.

1.3.3.1.3. La signalisation intracellulaire

De façon assez générale chez tous les types cellulaires, l'induction de l'apoptose par la liaison des récepteurs FAS ou TNFR1 engendre une cascade d'événements protéolytiques qui commence à être de mieux en mieux connue (figure 3).

D'une façon simplifiée, lorsque l'apoptose est induite par la liaison des récepteurs FAS ou TNFR1, leur domaine respectif de mort (FADD et TRADD) s'associe au long pro-domaine effectif de mort de la caspase-8 (Kischkel et al., 1995) aussi nommée FLICE ou MACH (FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme ou mort-associated CED-3 homologue) (Boldin et al., 1996 et Muzio et al., 1996). Cette dernière caspase initiatrice est une interleukine-1 β converting enzyme (ICE) qui active la cascade des caspases effectrices et/ou la mitochondrie.

1.3.3.1.4. L'implication de la mitochondrie dans l'apoptose

Bien que la mitochondrie exerce un rôle primordial dans le contrôle de la survie cellulaire, celle-ci peut aussi être impliquée dans les processus de mort. En effet, la mitochondrie peut inhiber ou activer de nombreux systèmes de la cellule et créer la mort. Le système protéolytique des caspases compte parmi les systèmes pouvant être régulés par la mitochondrie. En effet, suite aux signaux de mort cellulaire engendrés après liaison des domaines de mort aux récepteurs de surface, la membrane mitochondriale est dépolarisée et il y a relâche du cytochrome C "intramitochondrial" vers le cytosol. Ce cytochrome C se lie ensuite à APAF-1 (apoptosis protease activating factor-1) pour aller activer la caspase-9 qui amplifie la cascade d'événements menant à la mort cellulaire. Dans certaines cellules, la dépolarisation mitochondriale amène aussi la relâche de la procaspase-3 (Mancini et al., 1998) ainsi que du facteur AIF (apoptosis-inducing factor) (Susin et al., 1997) qui active la caspase 3 et finalement les caspases effectrices comme la caspase 9. Ce sont ces dernières caspases, les caspases effectrices qui sont responsables des changements cellulaires menant à l'apoptose. Les caspases inactivent les protéines anti-apoptotiques qui protègent la cellule comme Bcl-2 (B-cell lymphoma / leukemia-2), scindent certaines protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette (gelsoline), inactivent des protéines impliquées dans la réparation ou la réplication de l'ADN ou

détruisent la lamina nucléaire créant la condensation de la chromatine. La cellule apoptotique exhibe alors des signaux qui permettent la reconnaissance par les phagocytes.

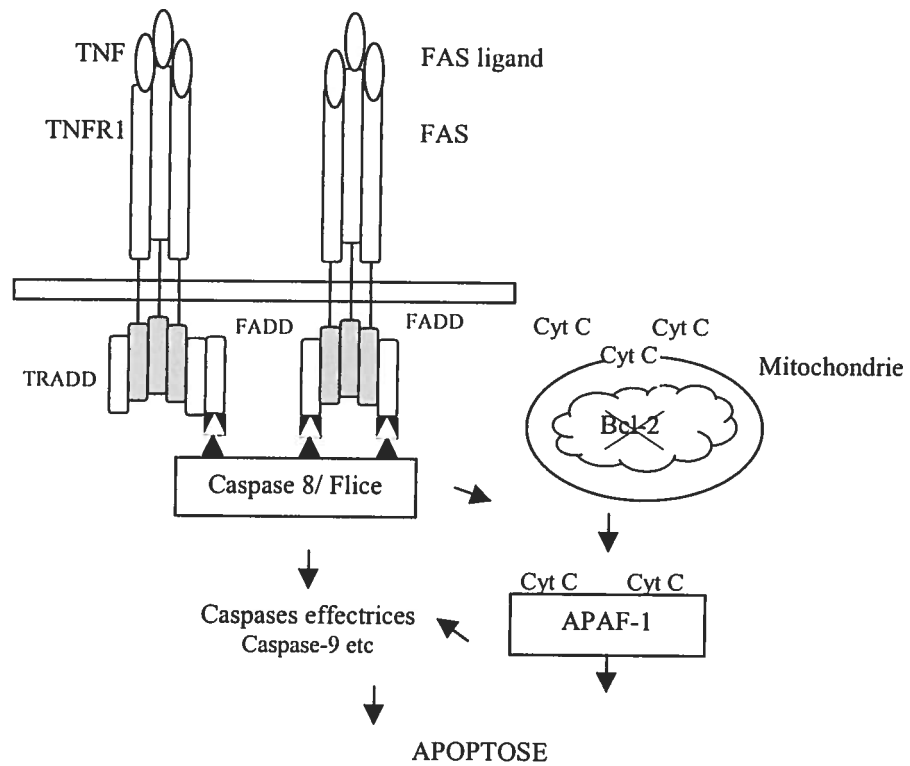


Figure 4 : Mécanisme simplifié de signalisation extra et intracellulaire lors de l'induction de l'apoptose

1.3.4. L'inflammation chronique

Plusieurs facteurs peuvent être responsables de l'inflammation chronique qui se caractérise par une persistance de l'antigène. À ce stade, le processus inflammatoire devient toutefois plutôt pathologique que protecteur. Ainsi, la persistance d'un antigène, la reconnaissance erronée d'antigène du soi, l'hypersensibilité ou l'expression excessive de médiateurs de l'inflammation sont tous des facteurs d'ordre endogène ou exogène qui peuvent causer des inflammations chroniques. Les inflammations chroniques sont la cause de nombreuses maladies qui se caractérisent par une accumulation et une persistance de cellules inflammatoires associées à des lésions des tissus situés à proximité. L'administration d'agents thérapeutiques anti-inflammatoires devient alors essentielle. Toutefois, ces médicaments qui agissent sur l'une ou l'autre des composantes du mécanisme de la réponse inflammatoire permettent seulement de contrôler les symptômes et non d'enrayer la cause initiale de l'induction de l'inflammation (Trowbridge et Emling, 1997 : 129).

2. Le neutrophile

Une réponse immunitaire est essentiellement médiée par l'action des leucocytes présents dans le sang et les tissus. Les leucocytes comprennent plusieurs types de cellules, entre autres, les lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules LGL, les monocytes/macrophages, les neutrophiles, les basophiles et les éosinophiles. Parmi tous ces types cellulaires, les NTs représentent de 50 à 70% des leucocytes circulant et jouent un rôle essentiel dans les réactions immunitaires non-spécifiques et immédiates.

Le NTs est un granulocyte phagocytaire que l'on reconnaît par son noyau polylobé en forme de fer à cheval qui en est à son dernier stade de différenciation (figure 5).

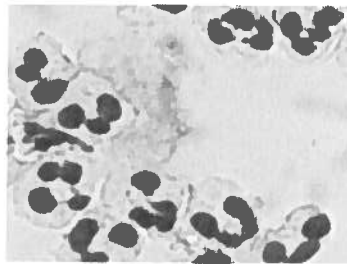


Figure 5 : Photographie de neutrophiles humains fraîchement isolés

Bien qu'ils proviennent des mêmes cellules souches pluripotentes capables de divisions et de différenciations, comme tous les autres leucocytes, les NTs subissent une maturation complète dans la moelle osseuse. Lorsqu'ils sont libérés dans la circulation sanguine, ceux-ci ont une demi-vie très courte d'environ 12h, ce qui entraîne une mortalité quotidienne d'environ 10^{11} cellules qui doivent être continuellement régénérées par la moelle osseuse. La myélopoïèse des NTs est composée de trois étapes de différenciation. Dans la première phase, nommée la phase de progéniture, les cellules souches pluripotentes se différencient sans se diviser en cellules précurseurs de granulocytes ou de monocytes les CFU-GM (colony forming unit granulocyte

macrophage), puis en précurseurs de NTs, les CFU-G (colony forming unit granulocyte). Par la suite, la différenciation de ces précurseurs en myéloblastes, promyélocytes puis en myélocytes, toutes des cellules capables de quelques divisions, assurent la prolifération du réservoir de NTs. Finalement, à leur maturation, les NTs migrent dans la circulation sanguine par des pores trans-endothéliales des sinus de la moelle. Ces NTs représentent alors le réservoir des cellules en circulation qui comptent en moyenne entre 3500 et 5000 cellules/ μL de sang. Ce taux cellulaire peut toutefois être grandement influencé suite à une infection quelconque tel que décrit subséquemment.

2.1. Le rôle des neutrophiles et la réaction inflammatoire

Suite à une infection ou à une lésion, il y a réaction locale de l'organisme afin d'assurer la destruction ou l'inactivation des agresseurs étrangers, c'est la réaction inflammatoire. Les NTs jouent un rôle de premier plan dans l'élaboration et le maintien d'une réaction immunitaire, en libérant des substances chimiques ainsi que dans l'élimination des pathogènes par la phagocytose. Puisque les NTs protègent l'organisme contre les substances étrangères sans avoir à connaître leur nature, ils font partie d'une réaction immunitaire immédiate non-spécifique. En effet, les NTs sont les premières cellules à migrer sur le site d'une inflammation. Contrairement aux monocytes et lymphocytes qui migrent à l'intérieur de quelques heures, les NTs peuvent arriver au foyer inflammatoire au bout de quelques minutes. Une succession de phénomènes locaux et systémiques gouvernent le processus de la réaction inflammatoire par les NTs ainsi que par tous les autres leucocytes. Le rôle des NTs est décrit en détail dans la section suivante.

2.2. La migration des neutrophiles et l'élaboration de la réponse immunitaire

Les NTs en circulation sont activés et attirés vers le site inflammatoire suite à une série d'événements comprenant l'adhésion à l'endothélium et la migration par chimiotactisme. Il existe peu d'affinité entre l'endothélium au repos (non-stimulé) et les cellules circulant dans le sang. Suite à une stimulation par un agent infectieux (bactérie) ou inflammatoire (génération endogène par l'hôte), des substances pro-inflammatoires chimioattractantes comme le LPS (lipopolysaccharide), le $\text{TNF-}\alpha$, l'IL-1 et IFN- γ

(interféron-gamma) sont sécrétées par les cellules initialement présentes sur le site inflammatoire. Ces agents pro-inflammatoires ont des effets autant chez les cellules en circulation près du site que sur l'endothélium vasculaire à proximité (Diamond, 1991, Staunton et al., 1990 et Berendt et al., 1992). En effet, une telle stimulation, augmente la synthèse de molécules d'adhésion qui apparaissent à la surface des cellules de l'endothélium vasculaire. De plus, l'avidité et le nombre de certains récepteurs pour ces molécules d'adhésion augmentent à la surface des NTs.

Les acteurs et la cinétique de cette interaction sont de plus en plus connus. Les sélectines-E et -P sont les premières molécules d'adhésion à être synthétisées et à apparaître à la surface des cellules endothéliales (Hsu-Lin et al., 1984 et Hattori et al., 1989). Même si les NTs circulent avec une certaine vitesse, l'apparition de sélectines-E et -P à la surface des cellules endothéliales forment une liaison carbohydre avec leurs ligands (CD 15 (Le^X)) qui sont aussi augmentés chez les NTs (Bevilacqua et al., 1989 et Fokuda et al., 1984). Suite à cette interaction, la vitesse des NTs circulant est grandement réduite par rapport au flux sanguin et ceux-ci roulent le long de la paroi vasculaire (Lawrence et al., 1990). Pour arrêter complètement le mouvement des NTs afin qu'ils puissent migrer au travers de la paroi de l'endothélium vasculaire, une augmentation de la synthèse d'une deuxième classe de molécules d'adhésion, les ICAM-1 et-2 est observée sur la membrane des cellules de l'endothélium vasculaire (Lo et al., 1989 et Kuijpers et al., 1990). L'expression et l'avidité des ligands correspondant, les intégrines β_2 LFA-1 (lymphocyte function-associated) et MAC-1 sont aussi augmentées chez les NTs (Lo et al., 1989, Kuijpers et al., 1990 et Vedder et Harlan, 1988). Tandis que l'interaction sélectines-ligands réduit la vitesse des NTs (processus de roulement) (Lawrence et al., 1990), l'interaction ICAMs-intégrines est plutôt responsable de l'adhésion ferme des NTs et (Lawrence et al., 1991) induit leur changement de la forme sphérique à la forme aplatie, c'est la "margination" (Williams, 1991 et Abbassi et al., 1991). De plus, cette dernière interaction est responsable d'un changement subséquent des récepteurs de la membrane des NTs. Ceci leur permet de migrer au travers des jonctions des cellules endothéliales jusqu'au foyer inflammatoire par un mouvement amiboïde induit par des changements du cytosquelette et la chimiotaxie. La membrane des NTs ondule et il y a formation de pseudopodes qui s'allongent en lamellipodes, dans la direction du gradient

ascendant de concentration du chimioattractant (Hemler, 1988 et Ruoslahti, 1991). Une rétraction de l'uropode postérieur vers le corps cellulaire permet ainsi à la cellule de migrer au travers de l'endothélium, un processus que l'on nomme la diapédèse (figure 6).

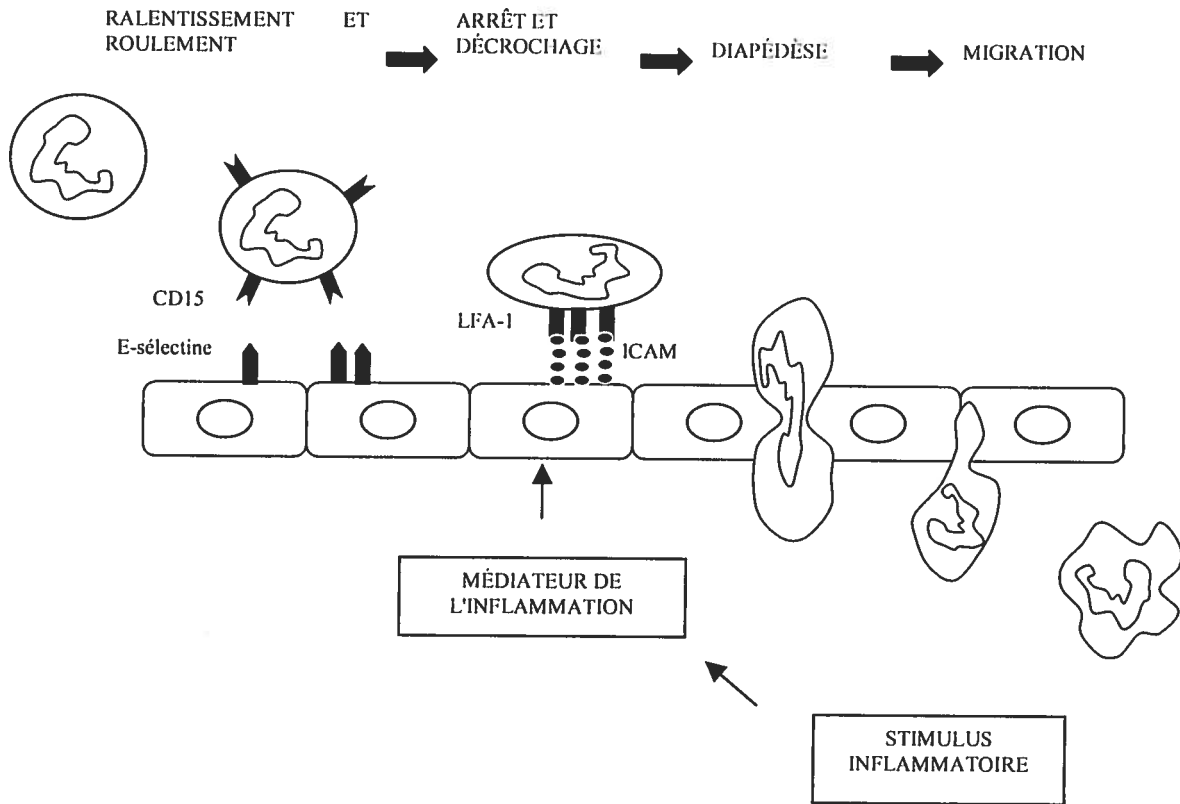


Figure 6 : Adhésion et migration des neutrophiles (Adaptée de Roit, 1998)

Suite à la migration des NTs sur le site inflammatoire et de leur activation, les NTs participent à l'élaboration d'une réaction immunitaire ainsi qu'à l'élimination des agents infectieux qui enclenchent la réponse immunitaire (figure 7). Deux mécanismes entre en jeu pour l'élaboration de la réponse immunitaire. Le premier mécanisme est immédiat, mais transitoire, et implique la relâche de médiateurs de l'inflammation pré-synthétisés et emmagasinés à l'intérieur des NTs. Ces agents sont pro-inflammatoires et sont souvent des facteurs chimioattractants comme le LTB_4 , le PGE_2 et l'IL-8. Comme dans une boucle à rétroaction positive, ces agents augmentent le nombre de NTs au foyer inflammatoire ainsi que la migration des autres types de cellules du système immunitaire. À plus long terme, la production de ces mêmes agents pro-inflammatoires est aussi augmentée chez les NTs.

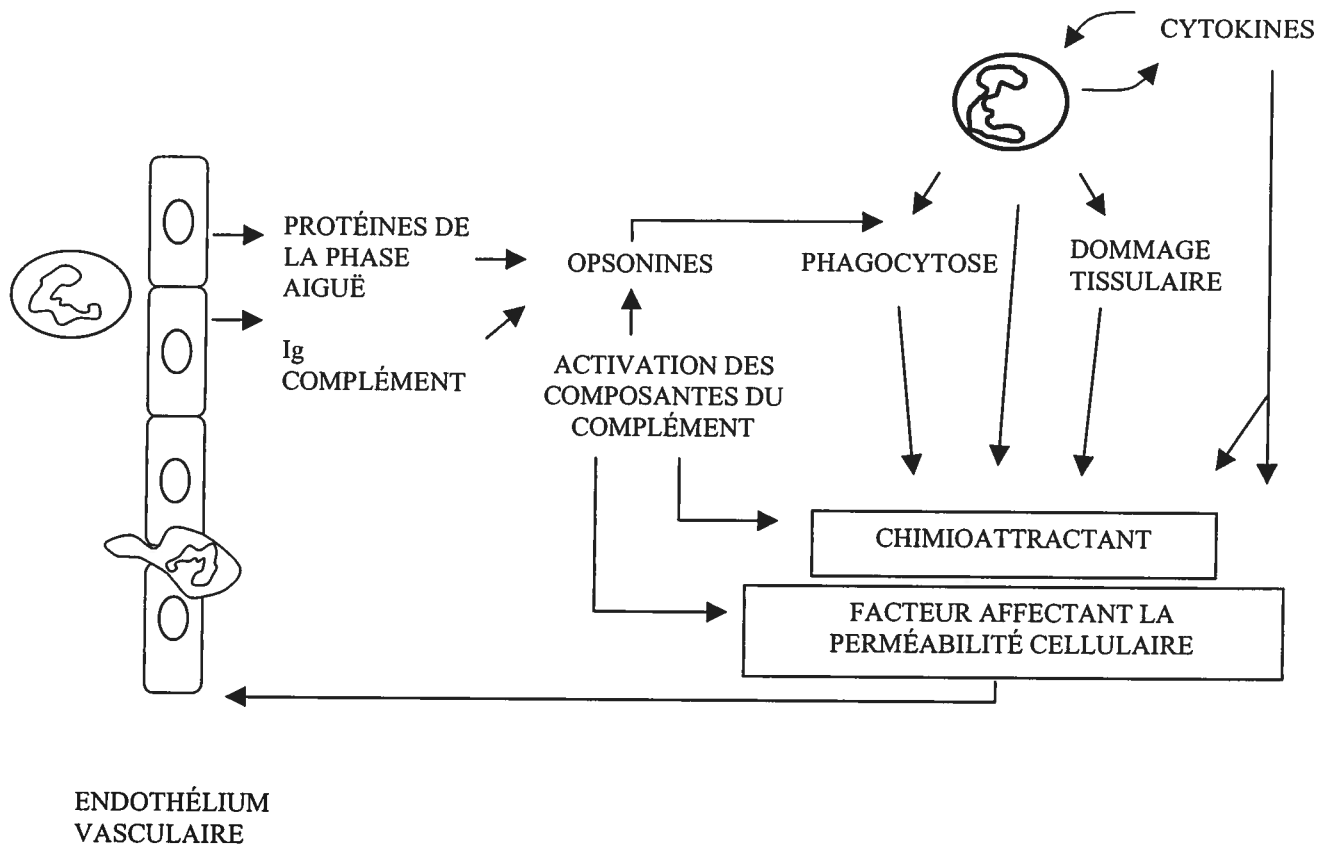


Figure 7 : L'implication du neutrophile dans la réponse inflammatoire

2.3. La phagocytose

En plus d'être essentiels à l'élaboration de la réponse immunitaire, les NTs participent également à la résolution de l'inflammation de par leur capacité de phagocytose. Bien que les lymphocytes soient responsables de la spécificité de la réponse immunitaire, ceux-ci ne sont pas efficaces pour retirer les agents infectieux ou inflammatoires, rôle réservé aux cellules phagocytaires. Lorsqu'un agent infectieux infecte l'organisme, il subit l'opsonisation. L'opsonisation se caractérise par une invasion de compléments ou d'anticorps (IgG) enrobant la particule qui se doit d'être éliminée, par la phagocytose. Les NTs ont des récepteurs pouvant lier certaines composantes activées du complément ainsi qu'aux fragments Fc des molécules d'IgG. Les récepteurs CR1 et CR3 (récepteur du complément) qui se lient respectivement aux composantes C3b (complément 3b) et iC3b, favorisent la fixation du phagocyte à la particule à phagocyter (Metzger, 1990). La présence de l'interaction IgG avec un ligand sur la cellule phagocytaire est toutefois nécessaire à l'ingestion de la particule. On retrouve deux types de récepteur à IgG sur les NTs. Le FcRII se lie aux IgG1 et 3 et le FcRIII qui se lie aux monomères d'IgG (Sawyer, Donowitz et Mandell, 1989).

Tout comme pour la "margination" et la diapédèse, une polymérisation des microfilaments d'actine sous le site d'attachement de la particule au récepteur est responsable du changement du cytosquelette et de la forme de la cellule associés au processus de la phagocytose. Cette polymérisation des microfilaments induit un plissement de la membrane et la formation de pseudopodes qui entourent la particule et forment finalement une vacuole contenant la particule, c'est le phagosome (Sawyer, Donowitz et Mandell, 1989).

2.4. La destruction des pathogènes

Suivant l'internalisation du pathogène, il y a fusion du phagosome avec des lysosomes de la cellule hôte qui contiennent des agents toxiques qui sont responsables de tuer et de digérer la particule. La cellule possède deux mécanismes pour tuer les micro-organismes phagocytés : les mécanismes qui requièrent de l'oxygène et ceux qui en sont

indépendants. Les mécanismes de lyse intracellulaire des bactéries sont très complexes et multiples.

2.4.1. Lyse cellulaire dépendante de l'oxygène

La lyse cellulaire dépendante de l'oxygène fait appel à trois principaux systèmes enzymatiques soit la NADPH oxydase (figure 8), la myéloperoxydase (figure 9) et la monoxyde d'azote synthase (NO synthase) (figure 10) bien connus sous le nom des mécanismes de la flambée oxydative.

Lors du processus impliquant la NADPH oxydase, une enzyme de la membrane des phagolysosomes, est activée et réduit l'oxygène (O_2) en anion superoxyde ($\bullet O_2^-$). L'anion superoxyde est ensuite dismuté en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui en présence de sels de fer produit l'oxygène singulet et des radicaux hydroxyles $OH\bullet$. Certains de ces dérivés sont toxiques pour la bactérie et peuvent même créer des dommages tissulaires importants si la cellule phagocytaire est lysée (Foote et Milstein, 1991). Toutefois, les dommages sont habituellement minimes, car les $OH\bullet$ sont conservés à l'intérieur des cellules, puisque l'apoptose succède généralement à la phagocytose et l'intégrité de la membrane plasmique est conservée (voir section 1.3.3).

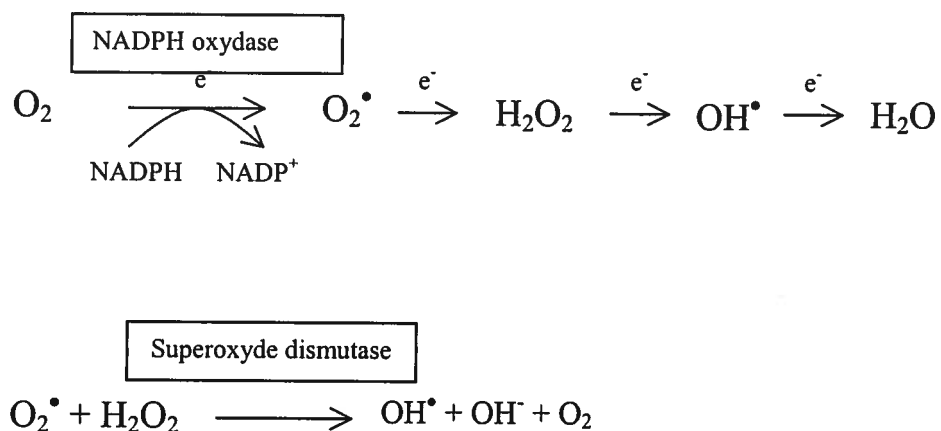


Figure 8 : La formation des anions superoxyde dans la bactéricidie dépendante de l'oxygène.

Lors de la fusion des phagosomes avec les lysosomes, la myéloperoxydase des granules active la production de dérivés toxiques de l'oxygène, tels que l'acide hypochlorique (HOCl), en présence d'halogénures (iode, brome, chlore). Le HOCl (ou HOBr ou HOI) interagit ensuite avec des amines endogènes et permet la formation de monochloramines et de dichloramines très toxiques (Thomas et Lehrer, 1988).

Myéloperoxydase

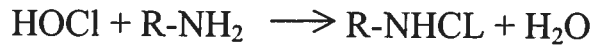


Figure 9 : L'action de la myéloperoxydase et des halogènes dans la bactéricidie

Finalement, la formation de dérivés oxydés de l'azote aboutit à la production de monoxyde d'azote (NO) toxique. NO peut être transformé en différents dérivés très toxiques tels que le nitrosonium (NO^\bullet), les ions nitroxyles (NO^\bullet), le dioxyde d'azote (NO_2), le peroxynitrite (ONOO^\bullet) et les S-nitrosothiols.

NO-synthase
Tétrahydrobioptérine

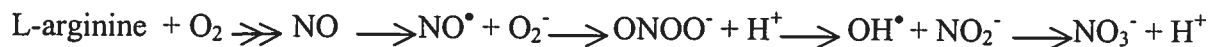


Figure 10 : La voie de l'oxyde nitrique dans l'activité bactéricide

Les dérivés toxiques de l'O₂ et du NO entraînent de multiples altérations des lipides, des protéines, des glycanes et des acides nucléiques, qui dégradent les particules phagocytées, mais dont la cellule hôte doit se protéger. En plus d'avoir des compartiments intracellulaires pour garder ces dérivés toxiques, la cellule hôte possède des agents anti-radicalaires comme la vitamine E, la superoxyde dismutase glutathion, la catalase et la taurine.

2.4.2. Lyse cellulaire indépendante de l'oxygène

Un deuxième mécanisme indépendant de l'O₂ permet aussi de tuer les micro-organismes phagocytés. En fait, les granules qui fusionnent avec le phagosome contiennent des protéases, des enzymes protéolytiques, des lysosomes ainsi que des protéines et peptides qui peuvent interférer avec certaines fonctions microbiennes et détruire des composantes de leur structure. L'activité de ces agents microbicides n'est toutefois spécifique qu'à certaines classes de micro-organismes. Par exemple, le BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) se lie à l'endotoxine des bactéries gram-négatives seulement. Finalement, les produits microbiens sont digérés par des enzymes contenues dans les granules (Thomas et Lehrer, 1988, Sawyer, Donowitz et Mandell, 1989, Klebanoff et Walterdorph, 1990).

2.5. L'élimination des neutrophiles et la résolution de l'inflammation

On a longtemps cru que, suite à leur action sur le site inflammatoire, les neutrophiles se désintégraient et que les fragments et débris cellulaires étaient phagocytés par les macrophages éboueurs (Hurley, 1983). Toutefois, une telle mort cellulaire, nommée nécrose, implique que la cellule est lysée et que son contenu enzymatique hautement toxique est libéré dans le milieu extracellulaire pouvant ainsi causer des dommages graves aux tissus sains. Pourtant, bien avant ces dernières observations, Metchnikoff avait pourtant observé que lors de la résolution de l'inflammation, on retrouvait bel et bien des NTs dans les macrophages, mais que ceux-ci étaient intacts et non fragmentés (Metchnikoff, 1891). Newman (1982) avait aussi remarqué que les NTs

fraîchement isolés n'étaient pas phagocytés par les macrophages tandis que les NTs vieilliss en culture étaient reconnus et ingérés par les macrophages (Newman et al., 1982). Ce n'est que récemment que l'on a découvert que les NTs ainsi phagocytés par les macrophages étaient bel et bien morts, par apoptose plutôt que par nécrose (Savill et al., 1989, Savill, Henson et Haslett 1989 et Stern et al., 1992).

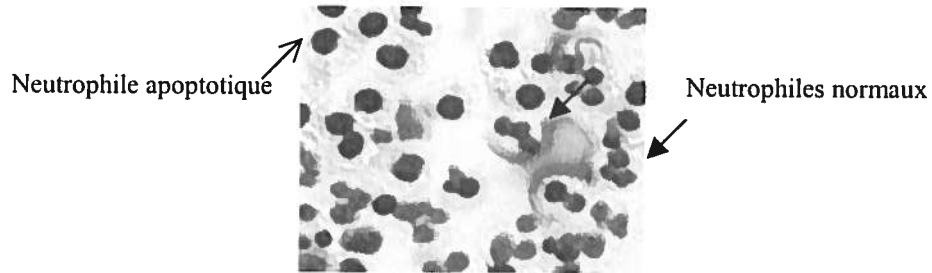


Figure 11 : Comparaison de la morphologie entre un neutrophile normal et un neutrophile apoptotique

Bien que le phénomène de l'apoptose soit assez général chez tous les types cellulaires, on doit toutefois noter des spécificités. Ainsi, les NTs ne forment pas vraiment de corps apoptotiques, tel que mentionné précédemment dans la section 1.3.3, cependant, la cellule rapetisse. L'élimination des NTs apoptotiques a tout de même lieu, par les macrophages éboueurs. De plus, chez les NTs, les niveaux de Ca^{2+} intracellulaire ne semblent pas avoir d'influence sur l'apoptose, bien qu'un bon fonctionnement de la synthèse protéique soit nécessaire, contrairement aux lymphocytes (Whyte et al., 1993 et Haslett, Savill et Meagher, 1990). Il y a aussi perte des récepteurs de surface qui médient certaines fonctions des neutrophiles (Whyte et al., 1993 et Savill et Haslett, 1995) comme le récepteur Fc CD16 responsable de la phagocytose (Dransfield et al., 1994). Suite à la condensation de son ADN, le noyau du NT apoptotique devient plus dense et sphérique (figure 11).

La durée de vie des NTs étant très courte dans la circulation, il est essentiel d'avoir un mécanisme très efficace d'élimination de ces cellules. En fait, les NTs sont des cellules ayant la capacité de se diriger spontanément en apoptose. Des réactions paracrines entre un récepteur (FAS) et son ligand (FAS ligand), tous deux présents à la surface des NTs, pourraient être responsables de ce phénomène d'apoptose spontanée (Liles et al., 1996) qui permet de maintenir un taux constant de NTs en circulation. Lorsque les NTs quittent la circulation pour migrer vers un foyer inflammatoire, le processus d'apoptose spontanée est grandement retardé (Watson et al., 1997) et ces dernières cellules peuvent survivre plusieurs jours. Cette prolongation du taux de survie des NTs sur un site inflammatoire est une adaptation qui permet l'élaboration d'une réponse immunitaire efficace.

La séquence d'événements de l'induction de l'apoptose précédemment mentionnée dans la section 1.3.3.1. est un cheminement classique, suivant la stimulation des récepteurs FAS et TNFR1 chez plusieurs types cellulaires, et semble être un mécanisme pour l'induction de l'apoptose spontanée des NTs (Yamashita et al., 1999, Fadeel et al., 1998, William et al., 1999). Il existe par contre, une particularité aux mécanismes des neutrophiles. Les espèces réactives dérivées de l'oxygène, produites par les NTs, semblent interférer avec le processus d'induction des caspases bien que le niveau d'interaction soit encore nébuleux. Les réactifs oxygénés inhiberaient le fonctionnement des caspases, (Fadeel et al., 1998) bien qu'une augmentation des caspases diminuerait la production d'anions superoxyde (Yamashita et al., 1999). Ces études récentes restent encore à être approfondies.

Comme mentionné précédemment, le phénomène d'apoptose spontanée peut être retardé lorsque les NTs sont activés au cours de la migration au foyer inflammatoire. En fait, certaines cytokines présentes au site inflammatoire, tel le GM-CSF (granulocyte-macrophage stimulating factor), l'IFN- γ , l'IL-2, l'IL-6 et l'IL-1 ont toutes la capacité de moduler l'induction de l'apoptose. (Colotta et al., 1992, Brach et al., 1992, Lee, Whyte et Haslett, 1993, Biffl et al., 1995, Pericle et al., 1994, Girard D et al., 1996). Le point commun entre ces cytokines est qu'elles sont toutes capables de stimuler la synthèse

protéique. En effet, il existerait un lien entre l'activation des caspases et la synthèse protéique, bien que celui-ci n'ait pas encore été formellement démontré. Des études suggèrent plusieurs possibilités. Des agents inhibiteurs de la synthèse protéique, comme la cycloheximide inhiberaient la synthèse de protéines ou de facteurs de survie anti-apoptotiques, tels que les inhibiteurs de caspases (Yamashita et al., 1999).

Bien que certains de ces facteurs (protooncogènes) aient été identifiés chez d'autres types cellulaires (Bcl-2 et Bcl-X), ils ne semblent pas être exprimés chez les NTs (Yuan et al., 1993 et Liles et Klebanoff, 1995). Toutefois, l'expression de Mcl-1 (myeloid cell leukemia sequence 1), une protéine anti-apoptotique, décline avec l'induction de l'apoptose et augmente avec des agents promoteurs de la survie des NTs (GM-CSF et IL-1 β) (Moulding et al., 1998). D'autres facteurs de survie restent aussi sûrement à être identifiés. À l'inverse, l'induction de caspases comme étant en soi-même la cause de l'inhibition de la synthèse de facteurs de survie reste peu probable puisque certaines cytokines n'ayant aucun effet sur les caspases inhibent l'apoptose, en augmentant la capacité de synthèse protéique. (Colotta et al., 1992, Brach et al., 1992, Lee, Whyte et Haslett, 1993, Biffl et al., 1995, Pericle et al., 1994, Girard D et al., 1996). Mais on doit rester prudent, car les caspases pourraient seulement être associées à l'induction de l'apoptose tandis que leur inhibition spécifique pourrait être sous la gouverne de mécanismes différents.

Suite à cette inhibition temporaire de l'apoptose spontanée au site inflammatoire, il y aurait re-stimulation par des mécanismes encore inconnus et une résolution de l'inflammation. Des mécanismes particuliers de reconnaissance des NTs apoptotiques permettent aux macrophages de reconnaître ces NTs de façon à ne pas générer une réponse inflammatoire. Si les neutrophiles étaient reconnus par les récepteurs Fc des macrophages, une réponse complète serait engendrée par le macrophage, incluant la libération de médiateurs pro-inflammatoires, ainsi que la présentation d'antigènes inflammatoires (Meagher et al., 1992). Le macrophage reconnaît plutôt les cellules apoptotiques, via des récepteurs comme celui pour la vitronectine (l'intégrine $\alpha_v\beta_3$) (Hall et al., 1994, Fadok et al 1992, Savill et al., 1990 et Hughes et Savill, 1993), des récepteurs à phosphatidylsérine (Fadok et al 1992 et Fadok et al., 1992) et certains récepteurs lectines (Hall et al., 1994). Ces récepteurs se lient à des sites particuliers aux neutrophiles

apoptotiques (Savill et al., 1992, Ren et al., 1995, Morris et al., 1984 et Dini et al., 1992). Ainsi, lorsqu'un macrophage phagocyte un neutrophile apoptotique, le processus se termine par la destruction du NT sans autres réactions apparentes.

Plusieurs composantes extracellulaires peuvent influencer la capacité d'élimination des NTs apoptotiques par les macrophages. Ainsi, les nombreux médiateurs de l'inflammation, relargués par l'influx de cellules immunitaires, comme les cytokines (Ren et Savill, 1993) ou le pH au site d'inflammation (Savill et al., 1989 et Savill, Henson et Haslett, 1989) peuvent grandement affecter la capacité phagocytaire des macrophages. De plus, certaines cytokines comme l'IL-2, le taux de synthèse protéique (Haslett, Savill et Meagher, 1990) ainsi que des facteurs de croissance (GM-CSF) (Lee, Whyte et Haslett, 1993) peuvent aussi grandement influencer le taux d'apoptose des NTs.

Un dérèglement à un quelconque de ces niveaux peut entraîner des répercussions graves associées à la persistance de l'inflammation qui sont souvent la cause de maladies (Savill et al., 1989, Grigg et al., 1991). Une diminution de la phagocytose par les macrophages peut entraîner une augmentation du taux de cellules en nécrose et ainsi une augmentation des chances de lésions tissulaires. De plus, un retard de l'apoptose des NTs peut causer une accumulation incontrôlée du taux de NTs au site inflammatoire et une persistance de l'inflammation (Haslett et al., 1994).

3. La *Viscum album* Agglutinine-I

3.1. Les protéines inactivatrices du ribosome

L'étude de nombreux types d'immunomodulateurs s'avère d'intérêt dans la résolution de l'inflammation. De tels produits doivent non seulement avoir la capacité de moduler les cellules cibles, mais également d'être puissants et facilement disponibles. Il existe plusieurs types de molécules modulatrices, parmi lesquelles on retrouve un type bien particulier de molécules cytotoxiques nommées les protéines inactivatrices du ribosome (RIP : ribosome inactivating proteins). Celles-ci affectent le fonctionnement de la cellule en endommageant les mécanismes de traduction de l'ARN au niveau du ribosome. Ces protéines ont une activité glycosidase qui leur permet de scinder une base adénosine sur

l'ARNr de la sous-unité 28S et qui, conséquemment, empêche la liaison de la sous-unité 60S au facteur d'élongation 2 inhibant ainsi la synthèse protéique (Stirpe et al., 1992). Il existe deux types de RIP soit le type I et le type II. Les RIP de type I sont des protéines aux propriétés potentiellement cytotoxiques. Cependant, puisque que celles-ci ne possèdent pas de sites de liaison sur les cellules, leur entrée dans les cellules cibles est limitée et elles ne peuvent pas exercer leur potentiel cytotoxique. En effet, seul des cellules à haute activité pinocytaire comme les macrophages sont affectées par ces agents toxiques.

Les protéines appartenant à la seconde classe (type II) sont composées de deux chaînes, soit une chaîne toxique A et une seconde, la chaîne B dite lectine.

La chaîne lectine permet à la molécule de se fixer aux déterminants riches en carbohydrates à la surface des cellules cibles et facilite l'internalisation de la chaîne cytotoxique par endocytose. Grâce à cette liaison, les RIP de type II sont considérées parmi les molécules naturelles les plus toxiques. Afin que la chaîne toxique puisse affecter le ribosome, l'hétérodimère endocyté se doit de résister à la dégradation enzymatique lors de son passage dans les lysosomes. Seule une quantité minimale de lectine résiste et est acheminée à l'appareil de Golgi (Sandvig et van Deurs, 1996), puis au réticulum endoplasmique, pour que la chaîne A soit transloquée au cytosol (Sandvig et van Deurs, 1999). Puisque la chaîne toxique est inactive sous forme d'hétérodimère, les deux chaînes sont séparées par la réduction du pont disulfure qui les relie (Lappi et al., 1978). Suite à la séparation des deux chaînes, il y aurait un réarrangement du site actif de la chaîne toxique, activant ainsi l'enzyme qui ira dépuriner sa cible, l'ARNr, en excisant une adénosine. Ce site actif N-glycosidase est composé de 4 acides aminés hautement conservés parmi les RIPs (Krauspenhaar et al., 1999).

3.2. La ricine et l'abrin

Plusieurs RIP de type II ont été largement étudiées et bien que ces molécules possèdent peu d'homologie entre elles, leur site actif est souvent très semblable. Ceci leur confère une très grande similitude dans leur mécanisme d'action (Gabijs et al., 1992 et Stoeva et al., 1999). Parmi ces lectines, on retrouve la ricine, l'abrin et plus récemment la ML (Mistletoe lectin ou VAA-I: *Viscum album* Agglutinin-I).

La ricine et l'abrin constituent des RIP de type II connues depuis plus d'un siècle pour leur effet toxique. Étant de puissants inhibiteurs de la synthèse protéique, leurs effets cytotoxiques sur une multitude de cellules et de lignées cellulaires ont été caractérisés (Moriwaki et al., 2000) et certains auteurs associent l'inhibition de la synthèse protéique à la capacité de ces lectines à induire l'apoptose (Kochi et Collier, 1993 et Leek, Griffiths et Green, 1990). Bien que les RIP soient fortement toxiques, on doit toutefois admettre que lorsqu' administrées à des doses très faibles non-cytotoxiques, la ricine et l'abrin ont plutôt des effets stimulateurs pour les cellules du système immunitaire. En effet, ce sont de puissants agents mitogènes pour les lymphocytes (Kaufman et McPherson, 1975 et Closs, Saltvedt et Olsnes, 1975) et elles induisent en plus la production de cytokines pro-inflammatoires chez les PBMC (TNF- α et IL-1 β) (Lacastro et al., 1993).

3.2.1. Les immunotoxines

Bien que les RIP possèdent plusieurs particularités, c'est leur propriété très toxique qui les rend d'intérêt en immunologie. En effet, dans le but d'obtenir des molécules sélectivement toxiques, des RIP sont conjuguées à des molécules transporteuses comme des anticorps pour cibler des populations cellulaires spécifiques (Stirpe et al., 1992). De telles immunotoxines s'avèrent d'intérêt dans plusieurs contextes. Dans les cas de maladies associées au rejet de greffes, comme la réaction du greffon contre l'hôte (GvHD : acute graft-vs-host disease), une maladie associée à l'effet des lymphocytes T, l'administration d'anticorps spécifiques au CD5 (un antigène présent sur 95% des lymphocytes T) couplés à la chaîne A toxique de la ricine parvient à supprimer la réponse lymphocytaire dans de nombreux cas (Lambert et al., 1988, Kernan et al., 1988 et Byers et al., 1990). De plus, dans le cas de maladies auto-immunes comme la thyroïdite d'Hashimoto ou la myasthénie grave, le couplage d'auto-antigène avec la chaîne toxique des RIPs démontre que ces immunotoxines peuvent supprimer les lymphocytes producteurs des auto-anticorps responsables de l'élaboration de la maladie (Rennie et al., 1983 et Killen et Lindstrom, 1984).

3.3. Lectines de l'extrait de gui

Bien que les trois dernières lectines de plantes dont nous venons de discuter proviennent de diverses origines phylogéniques, elles ont un niveau d'homologie de leur séquence dépassant 50%. La ricine (*Ricinus communis*) est la plus connue de ces trois lectines homologues, toutefois, la ML-I fait maintenant de plus en plus l'objet d'études diverses, depuis sa commercialisation comme traitement contre le cancer (Bantel et al., 1999). La ML-I est fort semblable à la ricine. La chaîne toxique possède au-delà de 40% d'homologie, tandis que la chaîne lectine représente 64%. Leur site actif est identique et malgré les quelques différences dans leur séquence totale, leur conformation est la même (Krauspenhaar et al., 1999).

Les MLs sont des lectines qui proviennent d'extrait du gui. Avec la popularité de la phytothérapie en Europe, plusieurs extraits de plantes se sont vus être approuvés pour des études cliniques. Toutefois, ces extraits sont formés d'un mélange complexe de plusieurs substances et la nature précise des agents effecteurs de ces extraits est difficile à identifier. Gabius et al. ont identifié que des lectines, et plus précisément la lectine ML, serait responsable de certains des effets de l'extrait complet (Hajto, Hostanska et Gabius, 1989). En donnant des doses identiques soit d'extrait complet ou d'extrait sans ML à des patients, ils ont observé la disparition de certaines propriétés immunomodulatrices de l'extrait comme l'activation des cellules NK et la fréquence de LGL. Toutefois, on ne peut vérifier l'effet direct de la lectine *in vivo* chez les humains, car seuls des tests cliniques sur l'extrait complet sont permis.

Trois lectines très similaires ont ainsi été identifiées dans l'extrait de gui, soit la ML-I, la ML-II et la ML-III (Franz, Ziska et Kindt, 1981). Connaissant l'effet activateur des lectines sur les mécanismes de défense dans le corps humain et en concordance avec les hypothèses que l'interaction lectine-carbohydate pourrait causer l'immunomodulation, l'interaction entre ces lectines et certaines cellules a été caractérisée. La ML-I, une lectine de 63 kDa, est spécifique pour les résidus D-galactose. Celle-ci semble être la lectine la moins toxique parmi les trois ML (Dietrich et al., 1992) bien qu'elle possède de plus grandes capacités immunomodulatrices (Hajto, Hostanska et Gabius, 1989). La ML-II et la ML-III sont plutôt des lectines spécifiques pour les

résidus N-acétylgalactosamine. Elles ont respectivement des masses moléculaires de 60 kDa et de 50 kDa. Les trois lectines sont constituées de deux chaînes liées de façon covalente par des ponts disulfures. Bien qu'elles ne soient pas identiques, leur séquence en acides aminés est d'une très grande homologie, leur conférant des effets biologiques semblables. Des anticorps polyclonaux dirigés contre ML-I n'arrivent pas à différencier les trois lectines (Dietrich et al., 1992).

3.3.1. La VAA-I

La VAA-I (ML-I), une RIP de type II, est donc une des lectines isolées de l'extrait de gui qui contient 11% d'hydrates de carbone et possède un point isoélectrique de 6,1 (Luther et al., 1980). Ces deux sous-unités sont identifiées comme la chaîne A inactivatrice du ribosome (29 kDa) et la chaîne B dite lectine (34 kDa). La structure de la VAA-I est illustrée à la figure 12. Ainsi, la chaîne A peut être considérée comme une enzyme globulaire composée d'un site actif bien à l'intérieur de celle-ci et d'un site de glycosylation. Comme la ricine et l'abrin, la chaîne A inactive catalytiquement la sous-unité 60S du ribosome et inhibe la synthèse protéique (Olsnes et al., 1982, Stirpe et al., 1982 et Franz et al., 1982). La chaîne B, constituée de deux domaines homologues, contient de multiples sites de liaison aux hydrates de carbone, comme le D-galactose qui contient des groupes hydroxyles équatoriaux aux positions C-2, C-3 et C-4 (Ziska et Franz, 1981). Toutefois, seulement deux sites ont conservé leur capacité de liaison au galactose, soit un site de haute affinité dans le sous-domaine $\delta 2$ et un site de faible affinité dans le sous-domaine $\alpha 1$ (Krauspenhaar et al., 1999).

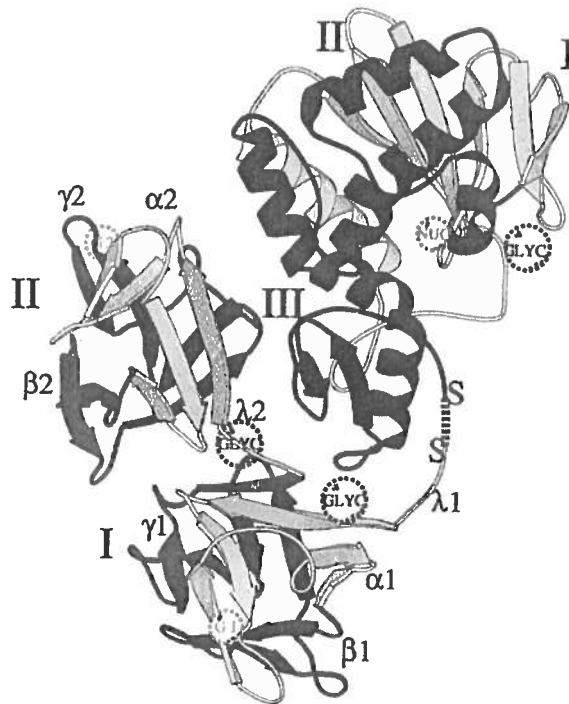


Figure 12: Structure tridimensionnelle de la VAA-I (Krauspenhaar, 1999).

3.3.2. Études précédentes

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont déjà été effectuées avec la VAA-I. La lectine entière aussi bien que ses chaînes séparées font l'objet d'études afin d'assigner l'implication de chacune des chaînes aux effets de la lectine entière. La VAA-I possède une affinité particulière de liaison pour les monocytes et les granulocytes (Hajto et al., 1990). À de faibles concentrations (1-10 ng/mL), la VAA-I entière ou sa chaîne B augmente la production de cytokines pro-inflammatoires telles le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 (Hajto et al., 1990) et l'IL-12 (Hajto et al., 1998). La chaîne A n'a aucun effet à ce niveau. Aux mêmes concentrations, la VAA-I induit aussi modérément l'activité des cellules NK *in vitro*. La VAA-I peut de plus avoir des rôles indirects sur l'activité de certaines cellules. En effet, la VAA-I augmente la production d'IL-12 par les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC : peripheral blood mononuclear cells) qui

module ensuite la production d'IL-2. Cette dernière interaction IL-2/IL-12 a un effet stimulateur bien connu sur l'activité des cellules NK (Hajto et al., 1998).

Bien que la VAA-I soit une molécule pouvant s'avérer très toxique à de fortes concentrations (de l'ordre du $\mu\text{g/mL}$), la VAA-I a un effet mitogène chez les PBMC (Hajto et al., 1990) et augmente la formation de colonies chez les cellules souches à de plus faibles doses (de l'ordre du 10-50 pg/mL) (Hajto et al., 1998).

À cause de sa chaîne A qui lui confère sa propriété de RIP, la VAA-I s'avère aussi très toxique. Ce niveau de toxicité dépend bien entendu de la concentration et du type cellulaire étudié. On peut observer de la cytotoxicité par la VAA-I à partir d'une concentration aussi petite que 10 ng/mL chez les lymphocytes du sang périphérique (PBL : peripheral blood lymphocytes), (Hostanska et al., 1996-97) bien qu'au-delà de 50% des cellules tolèrent encore 500 ng/mL , (Hostanska et al., 1996-97). Aucune cytotoxicité n'est notable chez les macrophages et les neutrophiles à de plus fortes concentrations (Metzner et al., 1985). Toutefois, selon la période à laquelle l'étude a été effectuée, il était difficile de faire la distinction entre l'apoptose et la nécrose. On définit souvent la cytotoxicité comme la mort de la cellule. Bien que l'apoptose soit un processus de mort programmée, l'intégrité de la membrane plasmique est conservée. Les méthodes classiques de détection de la cytotoxicité sont souvent basées sur cette perméabilité différentielle de la membrane (Hoornaert et al., 1997). Selon la technique utilisée afin de mesurer l'apoptose et la nécrose, il est souvent difficile d'interpréter les résultats et la limite de ce que l'on considère comme état de la nécrose, implique aussi des cellules en phase tardive d'apoptose. Ainsi, la VAA-I induit plutôt l'apoptose des cellules aux concentrations allant jusqu'à 1000 ng/mL plutôt que la nécrose. Hostanska et al. ont démontré un tel phénomène d'apoptose mais, une fois de plus, le nombre de cellules nécrotiques était aussi ici surestimé par rapport au nombre de cellules apoptotiques (Hostanska et al., 1996-97).

Bien que la VAA-I soit inductrice d'apoptose ou de nécrose à de fortes concentrations, certains auteurs ont tout de même vérifié l'effet de ces concentrations de la molécule ou de ses chaînes sur les fonctions de certaines cellules. À des concentrations aussi fortes que 5 $\mu\text{g/mL}$, la VAA-I induit l'aggrégation des cellules (Timoshenko, Cherenkevich et Gabius, 1995) et une augmentation de la phagocytose des leucocytes

(Metzner et al., 1985). Les différents types cellulaires répondent toutefois à la VAA-I à différents degrés. Les neutrophiles s'aggrègent beaucoup plus, suivis des monocytes, des thrombocytes et des érythrocytes (Timoshenko, Cherenkevich et Gabius, 1995). Ces différences sont inévitablement associées aux différentes affinités de la cellule pour les liaisons avec la VAA-I (Goulet et al., 1997). Comme mentionné précédemment, Gabius et al. ont justement démontré que la VAA-I se lie avec plus de facilité aux monocytes et aux granulocytes (Gabius et al., 1992).

À ces mêmes concentrations, la VAA-I induit aussi la production de superoxyde chez les NTs (Timoshenko, Cherenkevich et Gabius, 1995 et Timoshenko et Gabius, 1993). Bien qu'aucun test de cytotoxicité ne fut effectué lors de ces dernières études, il est plausible de croire que les concentrations utilisées étaient cytotoxiques (Hostanska et al., 1996-97). La chaîne B serait la chaîne responsable de l'aggrégation et de l'induction de la production de superoxyde, tandis que la chaîne A n'a pas d'effet aux concentrations utilisées (Timoshenko, Cherenkevich et Gabius, 1995 et Timoshenko et Gabius, 1993). Ainsi, la chaîne B aurait un effet avant même que la chaîne A n'ait pu engendrer la toxicité, puisque la VAA-I doit être endocytée afin que la chaîne A puisse exercer son effet catalytique. Ce phénomène d'endocytose de la VAA-I serait dépendant du calcium (Stirpe et al., 1982).

Comme mentionné précédemment, les tests *in vivo* chez l'humain se limitent toutefois à l'utilisation de l'extrait complet du gui, puisque seul l'utilisation de l'extrait complet est permise pour les études cliniques. Ainsi *in vivo*, il a été démontré que des injections de l'extrait complet (0,33 mL/kg correspondant à environ 1,65 ng/kg de VAA-I) augmentent l'activité des cellules NK et le nombre de LGL chez l'humain (Hajto, Hostanska et Gabius, 1989). Parallèlement, la même équipe a aussi administré des doses identiques de la VAA-I (0,8 ng/kg) et de la chaîne B (0,4 ng/kg) à des lapins, et ont observé la même hausse de l'activité des cellules NK et le nombre de LGL. De plus, une hausse du taux de neutrophiles, une augmentation de cellules immatures et une augmentation de la température, des signes d'une réaction immunitaire de phase aiguë (Hajto, Hostanska et Gabius, 1989), ont été observées. Une augmentation de l'activité phagocytaire des granulocytes a également été observée (Hajto, 1986). Il est à noter que lors de cette série d'expériences, la chaîne A, à des concentrations identiques à la chaîne

B, n'a eu aucun effet, et que des concentrations plus élevées de VAA-I se sont avérées être moins efficaces. Selon les auteurs, les doses utilisées semblent être optimales. En effet, une autre étude *in vivo* effectuée chez le rat, indique une augmentation du nombre de monocytes, de cellules NK et de LGL dans le sang périphérique ainsi qu'une augmentation de l'activité des cellules NK dans la rate à des concentrations de 0,5 à 1 ng/kg de VAA-I recombinante. Ces réponses sont grandement inhibées à des concentrations plus fortes de VAA-I (3 ng/kg) et il y a une immunosuppression significative, à des concentrations de 10 et 30 ng/kg (Hajto et al., 1998). Ces dernières concentrations sont sûrement des concentrations s'avérant toxiques pour les cellules, c'est-à-dire où la chaîne A est en quantité suffisante pour exprimer sa toxicité.

3.3.2.1. L'apoptose et la VAA-I

Le mécanisme apoptotique décrit dans la section 1.3.3.1. et à la figure 4, est un mécanisme général impliqué dans l'induction de l'apoptose par les récepteurs FAS et TNFR de nombreux types de cellules, ainsi que dans l'apoptose spontanée des NTs (qui semble être dépendante du récepteur FAS). On ne peut toutefois généraliser ce mécanisme à tous les types d'induction d'apoptose car d'autres récepteurs et d'autres voies de signalisation peuvent être empruntés.

L'induction de l'apoptose par la VAA-I semble en être un exemple bien précis. L'inhibition de la synthèse protéique plutôt que la liaison à un récepteur pourrait être responsable de l'induction de l'apoptose. Premièrement, seule la chaîne A est responsable de l'induction de l'apoptose chez les lymphocytes (Hostanska et al., 1996-97). De plus, des inhibiteurs du transport vésiculaire comme le brefeldin A inhibent l'apoptose des lymphocytes induite par la VAA-I (Bantel et al., 1999). Des auteurs suggèrent ainsi que l'arrêt de la synthèse de protéines pro-apoptotiques enclencherait le phénomène (Bantel et al., 1999). Ainsi, chez les lignées cellulaires lymphocytaires, une voie de signalisation impliquant les mêmes éléments que la voie classique de l'induction de l'apoptose est impliquée, mais l'ordre des éléments de la cascade est modifié.

La VAA-I emprunte aussi la voie de signalisation des caspases, bien que la caspase-9 serait une caspase initiatrice en amont de la cascade. Les protéines anti-apoptotiques seraient en fait des inhibiteurs de caspases initiatrices, comme la caspase-9

(Bantel et al., 1999). Ces mêmes auteurs suggèrent finalement que la caspase-9 activerait la caspase-3 et la caspase-8 avant que la mitochondrie ne libère le cytochrome C. Selon leur étude de cinétique, la dépolarisation mitochondriale surviendrait même un certain temps après la relâche du cytochrome C. Cette étude est toutefois réservée aux lymphocytes et semble être la seule impliquant la mécanistique de l'apoptose par la VAA-I.

4. L'interleukine-15

L'interleukine-15 (IL-15) est une nouvelle cytokine qui a été clonée à partir d'une lignée cellulaire épithéliale rénale (Grabstein et al., 1994) en 1994. C'est une glycoprotéine d'environ 14 kDa qui appartient à la famille des cytokines utilisatrices d'une sous-unité commune d'un récepteur, la sous-unité γ_c comme l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7 et l'IL-9. En fait, le récepteur IL-15 est un complexe de trois sous-unités très semblables au récepteur IL-2 ; on y retrouve les sous-unités α , β et γ . Le récepteur IL-15 partage les mêmes sous-unités β et γ que l'IL-2 d'où l'appellation d'IL-2R β et d'IL-2R γ pour ces 2 composantes du récepteur. Toutefois, l'IL-2R α ne participe pas à la liaison ou aux fonctions de l'IL-15. Le récepteur IL-15 est donc composé d'une troisième sous-unité, l'IL-15R α (Giri et al., 1995). Des expériences avec des anticorps bloquant une des sous-unités ou avec des cellules déficientes en sous-unités ont permis de déterminer les rôles des différentes composantes du récepteur IL-15. Ainsi, les deux sous-unités hétérodimériques que l'IL-15 partagent avec l'IL-2 soit l'IL-2R β et l'IL-2R γ sont essentielles à l'internalisation du ligand ainsi qu'à la transduction des signaux (Robb et Green, 1987, Hatakeyama et al., 1989 et Asao et al., 1993). Suite à la liaison de l'IL-15 à son récepteur, il y a une phosphorylation des résidus tyrosines de certaines protéines intracellulaires liées aux sous-unités β et γ du récepteur, et activation des protéines de signalisation JAK-1 et JAK-3 (JANUS kinase) (Taniguchi, 1995, Adunyah, Wheeler et Cooper, 1997 et Johnston et al., 1995) suivie d'une activation des facteurs de transcription STAT-3 et STAT-5 (signal transducers and activators of transcription) (Johnston et al., 1995).

Bien que la chaîne IL-15R α soit différente de la chaîne IL-2R α , on y retrouve la présence d'un motif de liaison très conservé, connu sous le nom de "sushi domain". C'est une liaison non-covalente de l'IL-15R α avec l'IL-2R $\beta\gamma$ qui confère une haute affinité de liaison au complexe récepteur entier, sans directement participer à la transduction des signaux (Anderson et al., 1995).

De nombreux types de cellules possèdent de l'ARNm d'IL-15. Parmi ceux-ci, on retrouve les PBMC adhérents, les cellules épithéliales et les fibroblastes, les cellules du placenta, des muscles squelettiques, du cœur, des poumons, du foie et des reins (Grabstein et al., 1994). Ce type de présence suggère que l'IL-15 participerait à l'élaboration d'un système de surveillance de l'organisme prêt à engendrer une réaction. En fait, la sécrétion de l'IL-15 est majoritairement régulée au niveau post-transcriptionnel (Carson et al., 1995). L'IL-15 est emmagasinée sous forme d'ARNm inactif (Doherty, Seder et Sher, 1996) jusqu'à ce qu'un signal (facteur bactérien ou inflammatoire) enclenche sa traduction en protéine active. (Bamford, Tagaya et Waldmann, 1996). Toutefois, la protéine a seulement été détectée dans des surnageants provenant de monocytes (Carson et al., 1995) et chez des lignées cellulaires de la moelle osseuse. Ceci suggère un rôle intracellulaire encore inconnu de l'IL-15.

4.1. Rôle de l'IL-15 dans la réponse immunitaire et inflammatoire

L'IL-15 est une cytokine aux propriétés pro-inflammatoires. Cette cytokine participe non-seulement à l'élaboration d'une réaction inflammatoire, mais aussi à sa persistance. L'IL-15 serait, entre autre, impliquée dans plusieurs maladies inflammatoires chroniques comme l'arthrite rhumatoïde, la sarcoïdose, l'hépatite C et la colite ulcéreuse (McInnes et al., 1996, Agostini et al., 1996, Kamuku et al., 1997 et Kirman et Nielson, 1996).

Suite à un stimulus pro-inflammatoire quelconque, l'IL-15 serait initialement relarguée des monocytes présents sur le site inflammatoire avec évidemment de nombreux autres agents. Suite à un jumelage avec d'autres cytokines (comme l'IL-12 ou le TNF- α) ou à elle seule, l'IL-15 active de nombreux autres types cellulaires comme les cellules NK, les lymphocytes et les NTs qui à leur tour produisent certains facteurs

stimulateurs des monocytes créant une boucle à rétroaction positive (Biron et Gazzinelli, 1995).

Bien que les séquences de l'IL-15 et de l'IL-2 ne soient pas très homologues (Grabstein et al., 1994), ces deux cytokines partagent plusieurs activités biologiques semblables. Cette similarité serait associée à leur partage des sous-unités responsables de la transduction des signaux du récepteur. Toutefois, puisque les récepteurs à l'IL-15 sont présents sur une plus grande variété de cellules, incluant des cellules non-immunitaires, certaines activités biologiques de l'IL-15 lui sont très spécifiques. Vu la distribution très large de son récepteur, l'IL-15 exerce de nombreuses activités sur différents types de cellules. Dans le thymus, l'IL-15 stimule le développement des cellules T. Une fois leur maturité atteinte, l'IL-15 agit comme un agent chimioattractant pour ces cellules, en induisant la redistribution de certaines molécules d'adhésion (Wilkinson et Liew, 1995 et Nicot, del Pozo et Sanchez-Madrid, 1996). De plus, l'IL-15 induit l'activation et la prolifération des lymphocytes, (Grabstein et al., 1994) ainsi que la production de certaines cytokines comme l'IFN- γ (Seder, 1996). L'IL-15 est aussi un facteur de croissance, de différenciation et d'activation pour les cellules NK (Carson, 1994 et Leclercq et al., 1996). Elle provoque la production d'IFN- γ (Carson et al., 1995), de GM-CSF et de TNF- α en conjonction avec d'autres cytokines comme l'IL-12 (Carson et al., 1994 et Giri et al., 1994). L'IL-15 induit en plus la production d'anticorps (Armitage, et al., 1995).

Finalement, l'IL-15 exerce sans aucun doute un effet sur les NTs. Bien que les NTs n'expriment pas l'IL-2R α , ceux-ci possèdent l'IL-15R α (Girard, Boiani et Beaulieu, 1998). Ainsi, l'IL-15 active les NTs et stimule certaines fonctions. L'activité phagocytaire des NTs est augmentée par l'IL-15, créant une ré-organisation du cytosquelette évidente par un changement de forme de la cellule et une augmentation de l'actine. L'IL-15 augmente de plus la synthèse totale d'ARN et de protéines et retarde l'apoptose des NTs (Girard et al., 1996).

Seconde section : Les articles scientifiques

Résumé du premier article

Activation des neutrophiles humains par la lectine de plante *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) : Modulation de la synthèse protéique *de novo* et implication des caspases dans l'induction de l'apoptose.

Il a récemment été démontré que la *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I), une lectine de plante, pouvait moduler la synthèse protéique et induire l'apoptose de nombreux types de cellules d'origine immunitaire. Dans cette étude, nous démontrons qu'à de faibles concentrations (<100 ng/mL), la VAA-I induit la synthèse protéique *de novo* des neutrophiles (NTs) humains marqué métaboliquement au [³⁵S] tandis qu'elle agit comme inhibiteur à des concentrations plus fortes. À l'aide des techniques de cytométrie en flux (marquage au FITC-Annexine-V / PI) et de cytologie (coloration Diff-Quick), nous démontrons que la VAA-I ne module pas l'apoptose des NTs à de faibles concentrations bien qu'elle l'induit à >98% à une concentration de 500 et 1000 ng/mL. La VAA-I renverse de plus l'effet inhibiteur du GM-CSF sur l'apoptose des NTs et inhibe la synthèse protéique *de novo* induite par le GM-CSF. Toutefois, la VAA-I n'induit pas la phosphorylation de résidus tyrosine et n'affecte pas cette réponse induite par le GM-CSF. Parmi des inhibiteurs comme la génistéine, le *Pertussis toxin*, la staurosporine, le H7, le calphostin C, le monoalide, le BpB, la quinacrine, le HA-1077 et le z-VAD-FMK, seul ce dernier (un inhibiteur des caspases-1, -3, -4 et -7) inhibe l'apoptose induite par la VAA-I car le pourcentage de cellules apoptotiques a chuté de 98 ± 1 à 54 ± 3 % (moyenne \pm SEM, n=4). Nous confirmons de plus l'implication des caspases dans l'apoptose induite par la VAA-I en observant une fragmentation de la gelsoline, une protéine du cytosquelette qui est connue pour être dégradée par de la caspase-3. Une telle dégradation a été renversée par l'inhibiteur z-VAD-FMK. Nous concluons que l'induction de l'apoptose des NTs par la VAA-I est un mécanisme dépendant des caspases qui n'implique pas d'événements de phosphorylation de résidus tyrosine, des protéines G, des PKC et/ou des PLA₂. Nous démontrons de plus l'implication spécifique de la caspase-3. Une corrélation entre l'apoptose induite par la VAA-I et l'inhibition de la synthèse protéique induite par la VAA-I est discutée.

Pour des raisons de droits d'auteur, les pages de l'article ont été retirées de ce document.
L'article se trouve à l'adresse URL suivante : <http://www.jleukbio.org/content/68/6/845.long>

Résumé du second article

Article en préparation

Modulation des réponses du neutrophile induites par l'interleukine 15 par la *Viscum album* agglutinine-I (VAA-I), une lectine de plante.

La *Viscum album* agglutinine-I (VAA-I) est une lectine de plante avec des propriétés thérapeutiques connues comme étant des modulateurs des fonctions du neutrophile. Dans cette étude, nous démontrons que la VAA-I n'induit pas en soi de phosphorylation (résidus tyrosine, sérine ou thréonine) chez les neutrophiles humains. Les cellules étaient toutefois réceptrices car des événements de phosphorylation ont été observés suite à une stimulation avec du GM-CSF ou de l'IL-15. La VAA-I induit aussi la phagocytose des neutrophiles bien qu'elle ne module pas celle induite par l'IL-15. Aucun effet additif ou synergique n'a été observé sur la synthèse protéique *de novo* lorsque les cellules ont été incubées avec 250 ng/mL d'IL-15 et des concentrations faibles de VAA-I (1-100 ng/mL), une condition connue comme étant inductrice de cette réponse biologique lorsque les deux agonistes sont utilisés séparément. À l'opposé, quand les cellules ont été incubées avec l'IL-15 et de fortes concentrations de VAA-I (>500 ng/mL), nous avons observé que la VAA-I inhibe la synthèse protéique *de novo* induite par l'IL-15. Une forte concentration de VAA-I peut aussi contrecarrer l'effet retardataire de l'IL-15 sur l'apoptose des neutrophiles évaluée par couplage au FITC-annexine-V et par la fragmentation de la gelsoline. L'utilisation de 50 μ M de z-VAD-FMK (un inhibiteur des caspases-1,-3,-4 et -7) renversa cette dégradation de gelsoline, avec ou sans IL-15. De plus, nous démontrons que le tyrphostin B42 (AG490), un inhibiteur spécifique de JAK-2/JAK-3, inhibe l'effet de l'IL-15 sur l'apoptose des neutrophiles sans avoir d'effet sur l'apoptose induite par la VAA-I après 21h. Nous concluons que la VAA-I peut être utilisée pour moduler certaines réponses du neutrophiles induites par l'IL-15 par un mécanisme ne nécessitant pas de phosphorylation.

Modulation of interleukin-15 (IL-15)-induced neutrophil responses by the plant lectin *Viscum album* Agglutinin-I (VAA-I).

Anik Savoie*, Valérie Lavastre*, Martin Pelletier*, Reinhard Saller† Katarina Hostanska†, and Denis Girard*‡

**From INRS-Institut Armand-Frappier/Santé humaine, Université du Québec, Pointe-Claire, PQ, Canada. †From Department of Internal Medicine, University Hospital Zürich, Switzerland.*

‡Correspondance to: Dr Denis Girard, INRS/Institut Armand-Frappier/Santé humaine, 245 boul. Hymus, Pointe-Claire (PQ), Canada, H9R 1G6.

Tel/Fax: (514) 630-8847/8850.

e-mail: Denis.Girard@INRS-Sante.Uquebec.ca

Running title: Activation of neutrophils with VAA-I and interleukin-15

Suggested sections: Receptors and signal transduction or Cell biology and development

ABSTRACT

Viscum album Agglutinin-I (VAA-I) is a plant lectin with therapeutic properties known to modulate neutrophil functions. In this report, we found that VAA-I does not induce phosphorylation events by itself (tyrosine-, threonine-, or serine-phosphorylations) in human neutrophils. This was not due to an unresponsiveness state of the cells since both granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-15 were found to induce phosphorylation events. VAA-I was found to enhance phagocytosis when used alone but did not alter IL-15-induced phagocytosis. No additive or synergistic effects were observed on the *de novo* protein synthesis when cells were incubated with both 250 ng/ml IL-15 and a low concentration of VAA-I (1-100 ng/ml), a condition known to induce this biological response when both agonists are used separately. In contrast, when cells were incubated with both IL-15 or high concentration of VAA-I (>500 ng/ml), we observed that VAA-I inhibits the IL-15-induced *de novo* protein synthesis. A high concentration of VAA-I was found to inhibit the IL-15-induced suppression of neutrophil apoptosis as assessed by cytology, FITC-annexin-V binding, and by fragmentation of the cytoskeletal protein gelsolin. The use of 50 μ M z-VAD-FMK (caspases-1,-3,-4,-7 inhibitor) was found to reverse the degradation of gelsolin induced by VAA-I, whether cells were co-incubated with or without IL-15. In addition, we report that the specific Jak-2 inhibitor, tyrphostin B42 (AG490) can reverse the IL-15-induced suppression of neutrophil apoptosis but does not alter the VAA-I-induced apoptosis after 21h. We conclude that VAA-I can be used to modulate some, but not all, IL-15-induced neutrophil responses, by a mechanism that is independent of phosphorylation events.

INTRODUCTION

Neutrophils are involved in the inflammation process and since clearance of apoptotic neutrophils by cells such as macrophages can lead to the resolution of inflammation (1-3), it is important to develop therapeutic strategies based on the activation of neutrophil apoptosis to reverse or attenuate an inflammatory state rather than delaying this phenomenon. In addition to inflammation, deregulation of normal cell turnover via modulation of apoptosis may lead to cancer or autoimmunity.

Interleukin-15 (IL-15)¹ is a cytokine known to mediate its biological actions by binding to a specific cell surface receptor and inducing phosphorylation events in immune cells such as B and T lymphocytes, NK cells, and other non-immune cells such as the human intestinal epithelial cell line Caco-2 (4). The IL-15R is composed of at least three subunits, named γ_c (CD132), IL-2R β (CD 122), and the more recently identified IL-15R α (5). The γ_c chain is shared by other receptors such as IL-2R, IL-4R, IL-7R, and IL-9R (6-8). In addition to the γ_c chain, both the IL-2R and IL-15R share the IL-2R β subunit. This may explain why these two cytokines possess some redundant biological actions (9-10). However, we have previously documented that, unlike IL-2, IL-15 by itself is a neutrophil agonist (11) as this cytokine induces RNA synthesis, *de novo* protein synthesis, phagocytosis, and delays apoptosis. More recently, IL-15, unlike IL-2, was found to induce the production of the potent neutrophil chemoattractant IL-8 and activation of NF- κ B (12). The differential effect of IL-15 and IL-2 on human neutrophils could now be explained by the fact that these cells express a high affinity IL-15R (γ_c , IL-2R β , and IL-15R α) (13) whereas they express an IL-2R of intermediate affinity since they lack one component, namely, the IL-2R α (CD25) (14,15). In agreement with the observation that IL-15 acts differently than IL-2 on human neutrophils, it was recently reviewed that IL-15, based on its activity on NK and T cells, is not so a IL-2 like cytokine (16).

Viscum album Agglutinin-I (VAA-I) is a galactoside-specific plant lectin with an apparent molecular mass of 63 kDa that is composed of two distinct subunits, the A

chain (29 kDa) and the B chain (34 kDa) (17,18). It is the A chain that confers the protein synthesis inhibitory property to the VAA-I molecule by acting as a ribosome inactivating agent. This is due to the RNA-glycosidase activity that inhibits N-glycosylation of a single adenine within a universally conserved GAGA sequence on the 28S rRNA (at position 4324 in rat liver cells) (19,20). The B chain allows the VAA-I molecule to bind to the terminal galactoside residues on the cell surface. VAA-I belongs to the family of type II ribosome-inactivating proteins including abrin, modeccin, and ricin, and was recently found to be a potent immunomodulator (17-25). At low concentrations, VAA-I is known to induce protein synthesis while it inhibits this biological response when used at high concentrations (> 500 ng/ml). This lectin is known to induce pro-inflammatory cytokine expression at both gene and protein levels in human peripheral blood mononuclear cells and to induce apoptosis in human lymphocytes, monocytes, monocytic THP-1 cells and murine thymocytes (17,18). VAA-I was also found to bind with higher affinity on monocytes and granulocytes than on lymphocytes as demonstrated by flow cytometry experiments using FITC-conjugated VAA-I (18). The mode of action of VAA-I remains obscure, particularly on human neutrophils. Recently, we have demonstrated that VAA-I can induce *de novo* protein synthesis from [³⁵S]-metabolically labeled human neutrophils when used at low concentrations while it inhibits this response at high concentrations (26). Although low concentrations of VAA-I did not alter the neutrophil apoptotic rate, we found that high concentrations of the lectin accelerated apoptosis. Induction of apoptosis by VAA-I was reversed by z-VAD-FMK, a caspase inhibitor, but not by inhibitors of tyrosine kinases, G proteins, PKCs, and PLA₂. Finally, no apparent tyrosine phosphorylation event was observed on VAA-I-induced human neutrophils (26).

The present study was conducted in order to better understand the mode of action of VAA-I and to elucidate how low or high concentrations of this lectin could modulate IL-15-induced neutrophil responses since both molecules possess interesting therapeutic properties when used alone. So far, no data are available concerning their utilization in concert. In addition to its inability to induce tyrosine phosphorylation (26), we found that VAA-I cannot induce both serine or threonine phosphorylation events and that it cannot alter IL-15-induced phagocytosis. However, we found that VAA-I can reverse the ability

of IL-15 to induce *de novo* protein synthesis and to delay apoptosis when used at high non cytotoxic concentrations.

Abbreviations used: IL-15, interleukin-15; R, receptor; VAA-I, *Viscum album* Agglutinin-I; SRBCs, sheep red blood cells; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and agonists. The plant lectin VAA-I derived from *Viscum album* was isolated and purified as previously published (22). Endotoxin contamination was measured by LAL assay and was <5 pg/ml (22). The lectin was dissolved in HBSS as previously described (26). The caspases-1,-3,-4, and -7 inhibitor z-VAD-FMK was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA) and the specific Jak-2 inhibitor (AG490) from Sigma Chemical Company (St-Louis, MO). IL-15 was obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN).

Neutrophil isolation. Cells were isolated from venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech Inc, Qc), as previously described (11,13,14). Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to our institutionally approved procedures. Cell viability (>99%) was monitored by Trypan blue exclusion and the purity (>98%) was verified by cytology from cytocentrifuged preparations colored by Diff-Quick staining (11,13,14). Treatment of neutrophils with VAA-I (0.1 through 1000 ng/ml) for up to 24 h did not induce cell necrosis in contrast to methylmercury (26, *data not shown*).

Phosphorylation events. Neutrophils (4×10^7 cells/ml in RPMI-1640) were incubated for 1, 5, 15, or 30 min at 37 °C with buffer alone or with increasing concentrations of VAA-I (1-1000 ng/ml) in a final equal volume of 120 μ l. In some experiments, cells were also incubated with GM-CSF (65 ng/ml) or IL-15 (250 ng/ml). Reactions were stopped by adding 125 μ l of 2X Laemmli's sample buffer as we have detailed elsewhere (26,27). Aliquots corresponding to 10^6 cells were loaded onto 10% SDS-PAGE and transferred from gel to PVDF membranes (millipore, Bedford, MA) according to Towbin et al. (28). Nonspecific sites were blocked with 1% BSA in TBS-Tween (25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 190 mM NaCl, 0.15% Tween-20) for 1 h at room temperature. The membranes were then incubated with monoclonal anti-phosphotyrosine UB 05-321 (1:4000) (UBI); rabbit polyclonal anti-phosphoserine (1:500) (Chemicon International, Inc.) or the rabbit

polyclonal anti-phosphothreonine (1:500) (Zymed Laboratories, Inc.) for 1 h at room temperature. Membranes were then washed and incubated with a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG + IgM (1:10,000) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) for 1 h at 37 °C in fresh blocking solution for the anti-phosphotyrosine antibody or a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:10,000) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) for the anti-phosphothreonine or the anti-phosphoserine antibodies. Membranes were washed three times with TBS-Tween, and phosphorylated bands were revealed with the enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting detection system (Amersham, Pharmacia Biotech Inc). Protein loading was verified by staining the membranes with Coomassie blue at the end of the experiments.

Phagocytosis of sheep erythrocytes. Sheep red blood cells (SRBCs) were opsonized with a final 1/200 dilution of rabbit IgG anti-SRBCs antibody (Sigma) by an incubation of 45 min at 37 °C as previously described (11). Neutrophils (1×10^7 cells/ml in RPMI-1640) pretreated 30 min with buffer, IL-15 (250 ng/ml), VAA-I alone (1-1000 ng/ml), or a combination of IL-15 + increasing concentrations of VAA-I (1-1000 ng/ml), were incubated with 5×10^7 opsonized SRBCs for 45 min as above. The samples were centrifuged $200 \times g$ at 4°C for 10 min. Supernatants were discarded and an osmotic shock was performed on the pellets by treating them with 300 μ l H₂O for 20 seconds followed immediately by the addition of 4.5 ml ice cold HBSS. The samples were washed twice with ice cold HBSS and the final pellets were suspended to a final concentration of 1×10^7 cells/ml. Duplicate cytocentrifuged preparations (Cyto-tek[®] centrifuge, Miles Scientific, IN, USA) were prepared in aliquots of $\sim 200 \mu$ l and processed essentially as previously documented (11). Phagocytosis was measured as percentage of neutrophils ingesting at least one opsonized SRBC. IL-15 could be considered as a positive control in the present set of experiments since we have previously reported that this cytokine can increase neutrophil phagocytosis in a concentration-dependent fashion (11).

Metabolic labeling and *de novo* protein synthesis assay. Cells (1×10^7 cells/ml in RPMI-1640 supplemented with 1% autologous serum) were metabolically labeled with 125 μ Ci of the Redivue Pro-Mix L-[³⁵S] *in vitro* cell labeling mix (Amersham

Biopharmacia) in the presence or absence of agonists as indicated in the figure legends, for 21h as previously published (11,14,26,27). Cell lysates were prepared, and one dimensional 10% SDS-PAGE was performed. An equivalent of 10^6 cells were loaded per well (in order to compare appropriately *de novo* protein synthesis) (11,14,26,27). After electrophoresis, gels were stained with Coomassie blue (to verify equivalent loading), dried, and exposed with Kodak film X OMAT-RA at -80 °C for 1-3 days.

Assessment of neutrophil apoptosis. Freshly isolated human neutrophils (10×10^6 cells/ml in RPMI-1640 supplemented with 10% autologous serum) were incubated for the indicated times in the presence or the absence of VAA-I or appropriate controls as illustrated in figure legends and apoptosis was evaluated by cytology, flow cytometry, and the degradation of the cytoskeletal protein gelsolin (29). Cytoцентрифугed preparations of neutrophils were performed as above. Cells were examined by light microscopy at 400 X final magnification and apoptotic neutrophils were defined as cells containing one or more characteristic darkly stained pyknotic nuclei. An ocular containing a 10 x 10 squares grill was used in order to count at least five different fields (>100 cells) for the assessment of apoptotic cells. Results were expressed as percentage of apoptotic cells. This assay was found to correlate very well with other techniques (11) and is of particular interest for studying apoptotic neutrophils as the easily identifiable normal multi-lobed nucleus is replaced by dense rounded material (11,15). Apoptosis was also assessed by flow cytometry using the FITC-annexin-V coloration assay (PharMigen Canada) according to the manufacturer's recommendations. In other experiments, apoptosis was evaluated according to the fragmentation of the cytoskeletal gelsolin protein (29). To do so, cells were incubated as above and harvested for the preparation of cell lysates in Laemmli's sample buffer. In certain wells, cells were pre-incubated 1 h with the diluent or 50 μ M z-VAD-FMK prior an additional 20 h of incubation (total period of 21h). Aliquots corresponding to 225,000 cells were loaded onto 10% SDS-PAGE and transferred from gel to PVDF membranes as for the tyrosine phosphorylation assay. Nonspecific sites were blocked with 1% BSA in TBS-Tween (25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 190 mM NaCl, 0.15% Tween-20) overnight at 4 °C. Membranes were incubated with monoclonal anti-human gelsolin (Sigma, clone GS-2C4) in a final dilution of 1:500 for 1 h (room temperature)

followed by washes, and incubated with a horseradish peroxidase-labeled sheep anti-mouse IgG (1:20000) (Bio/Can) for 1 h (room temperature) in fresh blocking solution. The other steps were performed exactly as described in the tyrosine phosphorylation assay.

RESULTS

VAA-I does not induce phosphorylation events in human neutrophils. We have recently reported that VAA-I does not induce apparent tyrosine phosphorylation events in human neutrophils (26). In the present study, we were interested in answering whether or not VAA-I could activate serine and/or threonine phosphorylations. As illustrated in **Fig. 1A**, VAA-I does not induce serine or threonine phosphorylation events in human neutrophils. However, cells were responsive since, as expected, GM-CSF was found to induce tyrosine phosphorylation (**Fig 1B**). Unlike VAA-I, IL-15 was found to induce tyrosine phosphorylation events by itself (**Fig 1, inset**). Note that we have performed time-course experiment studies (1,5,15,30, and 60 min) but only the results obtained after 5 min are shown for simplicity since no response was observed for up to 60 min. In two separate experiments, we also found that VAA-I could not alter the IL-15-induced tyrosine phosphorylation events (*data not shown*) exactly as we have recently demonstrated that it could not alter GM-CSF-induced tyrosine phosphorylations in human neutrophils (26).

VAA-I does not alter the ability of IL-15 to increase phagocytosis. Because we have previously documented that IL-15 can enhance the capacity of human neutrophils to phagocytose opsonized-SRBCs in a concentration-dependent fashion (11), we decided to investigate how VAA-I could alter this important function expecting that high concentrations of VAA-I would inhibit this IL-15-induced response. As illustrated in **Fig 2**, VAA-I alone can increase phagocytosis as the number of cells (mean \pm SEM, n=3) that ingests at least one opsonized-SRBC were 11.3 ± 2.5 ; 15 ± 3.6 ; 13 ± 1.5 ; 19.3 ± 3.8 ; and 30.7 ± 3.2 % for cells treated with buffer, VAA-I at 1, 10, 100, or 1000 ng/ml, respectively. Addition of IL-15 was found to increase the ability of control neutrophil to exert phagocytosis as we observed a raise from 11.3 ± 2.5 to $23 \pm 4\%$. Addition of increasing concentrations of VAA-I to a fixed concentration of IL-15 (250 ng/ml) did not alter the biological activity of IL-15, but increased the ability to phagocytose as the results were 24.7 ± 6.2 ; 30.7 ± 7.4 ; and 41.7 ± 8.3 for cells treated with VAA-I at 10, 100, or 1000 ng/ml, respectively, with the addition of IL-15.

VAA-I inhibits the IL-15-induced de novo protein synthesis at high concentrations. IL-15 is known to induce de novo protein synthesis in human neutrophils (11). Since we have recently found that VAA-I can inhibit this response in neutrophils, we decided to investigate how it could alter the biological activity of IL-15. As illustrated in **Fig. 3**, untreated cells can newly synthesize polypeptides on a 21 h period of incubation (lane 1) whereas 500 ng/ml VAA-I completely reversed this response when used alone (lane 4) or in combination with IL-15 (lane 5). As expected, IL-15 was able to induce this response in a concentration-dependent fashion (lanes 2 and 3). Equivalence in protein loading was confirmed by staining the gels with Coomassie blue (data not shown). A co-incubation of a low concentration of VAA-I (1 or 10 ng/ml) with IL-15 did not promote additive nor synergistic effects (data not shown).

VAA-I can reverse the IL-15-induced suppression of apoptosis at high concentrations. We next studied how VAA-I can alter the IL-15-induced suppression of neutrophil apoptosis. As illustrated in **Fig. 4A**, IL-15 delays neutrophil apoptosis after a 21 h incubation (11.4 ± 6.5 vs $37.5 \pm 8.0\%$ (mean \pm SEM, n=3) for cells incubated with IL-15 and buffer, respectively), whereas virtually all cells were apoptotic when incubated with a high concentration of VAA-I. This figure also illustrates that during co-incubation of neutrophils from the same blood donors with IL-15 and VAA-I, the lectin prevents the delaying effect of IL-15. In contrast, this was not observed when cells were co-incubated with IL-15 and 1, 10, or 100 ng/ml VAA-I as IL-15 was still found to delay neutrophil apoptosis (*data not shown*). In addition, **Fig 4** illustrates that the specific Jak-2 inhibitor AG490 was found to reverse the IL-15 response since the number of apoptotic neutrophils remains near control (ctrl) values as following treatment of cells with the diluent or AG490 alone. The VAA-I-induced response was however not reversed by the AG490 inhibitor (29) in contrast to the caspase inhibitor z-VAD-FMK.

The fragmentation of gelsolin into a ~41 kD fragment was recently found to be dependent of caspase-3 activity during neutrophil apoptosis (29). Using this approach, we have recently demonstrated that z-VAD-FMK could inhibit the VAA-I-induced gelsolin

fragmentation in human neutrophils (26). According to these observations, we next verified the ability of VAA-I to inhibit IL-15-induced suppression of neutrophil apoptosis by this assay. As illustrated in **Fig. 5**, native gelsolin was fragmented to a ~41 kD fragment whether cells were co-incubated or not with 250 ng/ml IL-15, a concentration known to inhibit neutrophil apoptosis. Although the level of expression of native gelsolin was higher in neutrophils co-incubated with VAA-I and IL-15 when compared to VAA-I, this ability of IL-15 to slightly delay the fragmentation is not sufficient to reverse apoptosis as virtually all cells are characteristically apoptotic (cytology).

DISCUSSION

IL-15 is a pro-inflammatory cytokine which is suspected to be an important pathogenic factor in immunoinflammatory disorders. In this sense, high concentrations of IL-15 have been detected in the synovial fluid and in synovial membrane cells from rheumatoid patients (30-33). In addition, the identification of IL-15 as a neutrophil agonist (11,12) together with the ability of this cytokine to enhance the production of TNF- α through activation of synovial T cells and the production of IL-8 by human neutrophils support a pathogenic role of IL-15 in inflammatory disorders. Moreover, elevated levels of IL-15 have been demonstrated in peripheral blood mononuclear cells from patients with active ulcerative colitis and in alveolar macrophages from patients with active sarcoidosis, and in chronic hepatitis C (34-37). Although numerous studies have been conducted in order to better understand how IL-15 can act on different cell types by studying a variety of functional cell responses, fewer have been performed in regard to the modulation of IL-15-induced responses by agents.

This is the first study reporting modulation of IL-15-induced neutrophil responses by a lectin, namely, VAA-I. This lectin possesses anti-tumor properties and is known to act as a potent immunomodulator including pro or anti-inflammatory properties depending on the concentrations used. Studies dealing with its effect on immune cells lead to the conclusion that low concentrations of the lectin favor an immunostimulation whereas high concentrations promote inhibitory effects. This explains why we have studied, in each of our assays, low and high concentrations of VAA-I on IL-15-induced human neutrophil responses aiming to answer whether or not there will be additive, synergistic, or inhibitory effects. In parallel, we were interested in determining whether or not it can induce serine and/or threonine phosphorylation events as we have previously found that it does not induce tyrosine phosphorylations (26). Our results indicate that VAA-I cannot induce such events suggesting that this plant lectin does not activate intracellular proteins known to be involved in several signaling pathways. We propose that VAA-I bypasses such events and acts by a yet unknown mechanism that requires at least some caspases and the inhibition of *de novo* protein synthesis for induction of apoptosis (26). This is unlike IL-15 which mediates its biological actions via at least tyrosine phosphorylation

events. Moreover, when studying apoptosis, we found that the specific Jak-2 inhibitor, AG 490, can reverse the delaying effect of IL-15 but does not alter the VAA-I-induced effect. We suggest that IL-15 recruits Jak-2 for delaying spontaneous neutrophil apoptosis. Such results are in agreement with the fact that human neutrophils express the completed IL-15R composed with γ_c , IL-2R β , and IL-15R α (11). Binding of IL-15 to its receptor is known to induce tyrosine phosphorylation in other cells such as intestinal epithelial Caco-2 cells (4). Jak-2 was recently found to be a candidate involved in GM-CSF-induced suppression of apoptosis by another type of granulocyte, the eosinophil (38). Preliminary data in our laboratory suggest that IL-15 induces phosphoserine but not phosphothreonine phosphorylation events and that VAA-I does not alter these responses (*data not shown*). This could partly explain the complex mode of action of IL-15 since it is plausible that this cytokine can utilize other signaling pathways than Jaks-STATs. This remains to be determined. One element in agreement with this is that Cassatella and McDonald (39), have never detected any effects of IL-15 on STAT protein activation in human neutrophils.

VAA-I was previously suspected to inhibit protein synthesis since it belongs to the family of type II ribosome-inactivating proteins but no study has clearly demonstrated this by monitoring *de novo* protein synthesis. In this sense, we have demonstrated that high concentrations of VAA-I can inhibit *de novo* neutrophil protein synthesis using metabolically [^{35}S]-labeled cells visualized by SDS-PAGE (26) while low concentrations (1-100 ng/ml) of VAA-I could induce such a response. We believe that it is of major importance not only to visualize the polypeptides by SDS-PAGE (or by quantification after TCA precipitation) but also to study in parallel the apoptotic rate of cells. In this sense, the well characterized protein synthesis inhibitor, cycloheximide, was found to induce neutrophil apoptosis in a concentration-dependent fashion (40). One has to consider this in future experimentations in order to allow a clear conclusion on whether the down-regulation of a particular protein is inhibited by cycloheximide rather than simply being the result of an inability of cells to exert protein synthesis because they undergo apoptosis.

Herein, we report that VAA-I can be used to inhibit IL-15-induced neutrophil protein synthesis. This could be of importance in order to attenuate the agonistic effect of IL-15 on neutrophils during an inflammatory state. In this sense, knowing that IL-15 is a pro-inflammatory cytokine that delays neutrophil apoptosis (which is not beneficial during inflammation as neutrophils will perpetuate their deregulated functions), the ability of VAA-I to induce neutrophil apoptosis at a concentration known to inhibit *de novo* protein synthesis is of interest since their elimination could lead to the resolution of inflammation (1-3).

IL-2, an IL-15 like cytokine, is an important cytokine used as a therapeutic agent in advanced cancers. However, the use of IL-2 in such patients may result in recurrent infections since this cytokine was found to alter the phagocytic rate (41). Unlike IL-2, IL-15 was found to enhance phagocytosis of opsonized SRBCs by human neutrophils (11). This may be an advantage that merits consideration for future therapy with IL-15 as it could be used in replacement to IL-2 or in combination with other treatments. In this sense, IL-15 was recently found to augment the antitumor effect of the potent immunoregulatory cytokine IL-12 in a B16F10 melanoma model in mice (42). In addition, tumor cells engineered to secrete IL-15 were found to increase antitumor immune responses *in vivo* (43). Takeuchi and colleagues have studied IL-15-induced human killer cell activity against lung cancer cell lines and concluded that this cytokine has the potential for the immunotherapy of lung cancers (44). One study has compared the toxicity and antitumor efficacy of IL-15 with IL-2 in the context of syngeneic bone marrow transplantation. The authors concluded that IL-15 is a better candidate than IL-2 since it stimulates antitumor response post-bone marrow transplantation with less toxicity than IL-2 (45). Although some studies indicate that IL-15 is a promising therapeutic agent in cancers, works from Tinhofer and colleagues show that IL-15 should be added to the list of factors that promotes survival of multiple myeloma cells (46). Their results suggested that the expression of the IL-15R and production of IL-15 is a mechanism of tumor propagation in multiple myeloma. This indicates the complexity of the biological activity of IL-15.

The fact that VAA-I was found to enhance the ability of neutrophils to phagocytose opsonized SRBCs by itself (and that it does not alter the IL-15-induced phagocytosis response at high concentrations) may be in favor to develop or improve a therapeutic strategy with VAA-I. This is in agreement with its ability to reverse the IL-15-induced response discussed above. Developing an immunotoxin with VAA-I in order to specifically target neutrophils in an inflammatory state could be of biological or medicinal interests. In this sense, ricin, another ribosome inactivating agent similar to VAA-I, was used for the development of an immunotoxin and experiments lead to the conclusion that it can kill targeted cells by two mechanisms: one requiring caspases activation and the other due to the arrest of protein synthesis (47). This is in agreement with our observations that VAA-I could induce neutrophil apoptosis through caspases and that it can inhibit protein synthesis at a same concentration. Recently, the protein synthesis inhibitor, cycloheximide, was found to accelerate neutrophil apoptosis and to enhance their recognition by monocyte-derived macrophages (48). Whether VAA-I could act similarly by enhancing macrophage recognition of apoptotic neutrophils remains to be determined. Developing therapeutic strategies with the use of VAA-I could be envisaged for the resolution of inflammation. In addition, its utilization in concert with other molecule(s) or for modulating an immune response by itself merits to be further studied. The results of the present study indicate that VAA-I could modulate IL-15-induced human neutrophil responses.

ACKNOWLEDGMENTS

We appreciate the technical help of Annie Couture. This study was partly supported by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR). DG is a Scholar from FRSQ, AS holds a M.Sc Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) award, and MP holds a M.Sc FRSQ-FCAR-Santé award.

REFERENCES

1. Savill, J. (1997) *J. Leukoc. Biol.* **61**, 375-380
2. Ren, Y. and Savill, J. (1998) *Cell. Death Differ.* **5**, 563-568
3. Savill, J. and Haslett, C. (1995) *Semin. Cell Biol.* **6**, 385-393
4. Reinecker, H.-C., MacDermott, R.P., Mirau, S., Dignass, A. and Podolsky, D.K. (1996) *Gastroenterology* **111**, 1706-1713
5. Anderson, D.M., Kumaki, S., Ahdieh, M., Bertles, J., Tometsko, M., Loomis, A., Giri, J., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., et al. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 29862-29869
6. Demoulin, J.B. and Renauld, J.C. (1998) *Cytokines Cell Mol Ther* **4**, 243-256
7. Boesteanu, A., Silva, A.D.D., Nakajima, H., Leonard, W.J., Peschon, J.J. and Joyce, S. (1997) *J. Exp. Med.* **186**, 331-336
8. Bauer, J.H., Liu, K.D., You, Y., Lai, S.Y. and Goldsmith, M.A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 9255-9260
9. Leonard, W. J. and O'Shea, J.J. (1998) *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 293-322
10. Leonard, W.J. (1994) *Curr. Opin. Immunol.* **6**, 631-5
11. Girard, D., Paquet, M.E., Paquin, R. and Beaulieu A.D. (1996) *Blood* **88**, 3176-3184
12. McDonald, P.P., Russo, M.P., Ferrini, S. and Cassatella, M.A. (1998) *Blood* **92**, 4828-4835

13. Girard, D., Boiani, N. and Beaulieu, A.D. (1998) *Clin. Immunol. Immunopathol.* **88**, 232-240
14. Girard, D., Gosselin, J., Heitz, D., Paquin, R. and Beaulieu, A.D. (1995) *Blood* **86**, 1170-1176
15. Djeu, J.Y., Liu, J.H., Wei, S., Rui, H., Pearson, C.A., Leonard, W.J. and Blanchard, D.K. (1993) *J. Immunol.* **150**, 960-967
16. Ma, A., Boone, D.L. and Lodolce, J.P. (2000). *J. Exp. Med.* **191**, 753-755
17. Hostanska, K., Hajto, T., Weber, K., Fischer, J., Lentzen, H., Sütterlin, B. and Saller, R. (1996-97) *Nat. Immun.* **15**, 295-304
18. Hostanska, K., Hajto, T., Spagnoli, G.C., Fischer, J., Lentzen, H. and Herrmann, R. (1995) *Nat. Immun.* **14**, 295-311
19. Endo, Y., Tsurugi, K. and Franz, H. (1988) *FEBS Lett.* **231**, 378-380
20. Dietrich, J.B., Ribéreau-Gayon, G., Jung, M.L., Franz, H., Beck, J.P. and Anton, R. (1992) *Anticancer Drugs* **3**, 507-511
21. Vehmeyer, K., Hajto, T., Hostanska, K., Könemann, S., Löser, H., Saller, R. and Wörmann, B. (1998) *Eur. J. Haematol.* **60**, 16-20
22. Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C. and Gabius, J.-H. (1990) *Cancer Res.* **50**, 3322-3326
23. Hajto, T., Hostanska, K., Weber, K., Zinke, H., Fischer, J., Mengs, U., Lentzen, H. and Saller, R. (1998) *Nat. Immun.* **16**, 34-46

24. Kovacs, E., Hajto, T. and Hostanska, K. (1991) *Eur. J. Cancer* **27**, 1672-1676.
25. Hajto, T., Hostanska, K., Fischer, J. and Saller, R. (1997) *Anticancer Drugs*, 8 Suppl **1**, S43
26. Savoie, A., Pelletier, M., Hajto, T., Hostanska, K. and Girard, D (2000) *J. Leukoc. Biol.* (In press)
27. Girard, D., Paquin, R., Naccache, P.H. and Beaulieu, A.D. (1996) *J. Leukoc. Biol.* **59**, 412-419
28. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354
29. Kothakota, S., Azuma, T, Reinhard, C, et al. (1997) *Science* **278**, 294-298
30. Meydan, N., Grunberger, T., Dadi, H., Shahar, M., Arpaia, E., Lapidot, Z., Leeder, J.S., Freedman, M., Cohen, A., Gazit, A., Levitzki, A. and Roifman, C.M. (1996) *Nature* **379**, 645-648
31. McInnes, I.B. and Liew, F.Y. (1998) *Immunol. Today* **19**, 75-79
32. McInnes, I.B., Leung, B.P., Sturrock, R.D., Field, M. and Liew, F.Y. (1997) *Nat. Med.* **3**, 189-95
33. McInnes, I.B., al-Mughales, J., Field, M., Leung, B.P., Huang, F.P., Dixon, R., Sturrock, R.D., Wilkinson, P.C. and Liew, F.Y. (1996) *Nat Med* **2**, 175-82
34. Thurkow, E.W., van der Heijden, I.M., Breedveld, F.C., Smeets, T.J., Daha, M.R., Kluin, P.M., Meinders, A.E. and Tak, P.P. (1997) *J. Pathol.* **181**, 444-450
35. Kirman, I., Vainer, B. and Nielsen, O.H. (1998) *Inflamm. Res.* **47**, 285-289

36. Agostini, C., Trentin, L., Facco, M., Sancetta, R., Cerutti, A., Tassinari, C., Cimarosto, L., Adami, F., Cipriani, A., Zambello, R. and Semenzato, G. (1996) *J. Immunol.* **157**, 910-918
37. Kakumu, S., Okumura, A., Ishikawa, T., Yano, M., Enomoto, A., Nishimura, H., Yoshioka, K. and Yoshika, Y. (1997) *Clin. Exp. Immunol.* **109**, 458-463
38. Kirman, I. and Nielsen, O.H. (1996) *Am. J. Gastroenterol.* **91**, 1789-1794
39. Simon, H.U., Yousefi, S., Dibbert, B., Levi-Schaffer, F. and Blaser, K. (1997) *Eur. J. Immunol.* **27**, 3536-3539
40. Cassatella, M. and McDonald P.P. (2000) *Curr. Opin. Hematol.* **7**, 174-177.
41. Cox, G. and Austin, R.C. (1997) *J. Leukoc. Biol.* **61**, 224-230
42. Jablons, D., Bolton, E., Mertins, S., Rubin, M., Pizzo, P., Rosenberg, S.A. and Lotze, M.T. (1990) *J. Immunol.* **144**, 3630-3636
43. Lasek, W., Golab, J., Maslinski, W., Switaj, T., Balkowiec, E.Z., Stoklosa, T., Giermasz, A., Malejczyk, M. and Jakobisiak, M. (1999) *Eur. Cytokine Netw.* **10**, 345-356
44. Hazama, S., Noma, T., Wang, F., Iizuka, N., Ogura, Y., Yoshimura, K., Inoguchi, E., Hakozaiki, M., Hirose, K., Suzuki, T. and Oka, M. (1999) *Br. J. Cancer.* **80**, 1420-1426
45. Takeuchi, E., Yanagawa, H., Suzuki, Y., Bando, H. and Sone, S. (1998) *Br. J. Cancer.* **78**, 616-620

46. Munger, W., DeJoy, S.Q., Jeyaseelan, R. Sr, Torley, L.W., Grabstein, K.H., Eisenmann, J., Paxton, R., Cox, T., Wick, M.M. and Kerwar, S.S. (1995) *Cell. Immunol.* **165**, 289-293

47. Tinhofer, I., Marschitz, I., Henn, T., Egle, A. and Greil, R. (2000) *Blood* **95**, 610-618

48. Keppler-Hafkemeyer, A., Brinkmann, U. and Pastan, I. (1998) *Biochemistry* **37**, 16934-16942

49. White, M.K.B., Savill, J., Meagher, L.C., Lee, A. and Haslett, C. (1997) *J. Leukoc. Biol.* **62**, 195-202

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Phosphorylation events in *VAA-I-induced and IL-15-induced neutrophils*. Freshly isolated human neutrophils (4×10^7 cells/ml) were incubated with or without agonists and cell lysates were prepared before performing western blot experiments as described under Materials and Methods. A and B, cells were treated for 5 min with buffer (lane 1), 65 ng/ml GM-CSF (lane 2), 1 or 1000 ng/ml VAA-I (lanes 3 and 4, respectively). Results shown are from one representative out of four experiments conducted with different blood donors. P-Thr, anti-phosphothreonine; P-Ser, anti-phosphoserine; and P-Tyr, anti-phosphotyrosine. The same membrane was used in A and B (mini-gel) and cell lysates were prepared from the same blood donor in the inset but transferred on another membrane (standard gel). Arrows indicate two bands that are highly tyrosine phosphorylated by GM-SCF. Inset, cells were treated for 1 min with buffer (lane a), 65 ng/ml GM-CSF (lane b), or 250 ng/ml IL-15 (lane c). These results are one representative experiments out of three.

Figure 2. *VAA-I does not alter the IL-15-induced phagocytosis*. Neutrophils (1×10^7 cells/ml) were stimulated for 30 min with an increasing concentration of VAA-I alone (1, 10, 100, or 1000 ng/ml), with IL-15 alone (250 ng/ml) or with a mixture of IL-15 (250 ng/ml) + an increasing concentration of VAA-I, and then phagocytosis was assessed as described under Materials and Methods. Results are means \pm SEM (n=3). *, $p < 0.05$ vs control by Student's *t*-test.

Figure 3. *Inhibition of IL-15-induced de novo protein synthesis by high concentrations of VAA-I*. Human neutrophils (1×10^7 cells/ml) were metabolically-labeled as described under Materials and Methods and incubated for 21 h in the presence or absence of stimuli. Intracellular fractions were prepared and then ran by one dimensional 10% SDS-PAGE. Lane 1, unstimulated cells; lane 2, 100 ng/ml IL-15; lane 3, 250 ng/ml IL-15; lane 4, 500 ng/ml VAA-I; and lane 5, 250 ng/ml IL-15+500 ng/ml VAA-I. Results are one representative experiment out of five.

Figure 4. *Inhibition of IL-15-induced suppression of neutrophil apoptosis by high concentration of VAA-I and by a Jak-2 inhibitor.* Neutrophils (1×10^7 cells/ml) were treated for 1h with or without inhibitor (50 μ M z-VAD-FMK or 10 μ M AG490) prior to a 20h incubation in RPMI-1640 supplemented with 10% autologous serum in the presence or absence of stimuli. A, apoptosis was assessed by cytology from cytocentrifuged preparations stained with Diff-Quick as described under Materials and Methods. Results are means \pm SEM ($n \geq 3$). $p < 0.05$, * vs control; ** vs IL-15; *** vs VAA-I; and **** vs AG, by Student's *t*-test. Ctrl, control; Dil, diluent (<1% DMSO); AG, the Jak-2 inhibitor AG490; Z-VAD, the caspases-1,-3,-4,-7 inhibitor z-VAD-FMK. B, representative cytocentrifuged preparations. Arrows, typical apoptotic neutrophils; arrowheads, normal neutrophils. C, FITC-Annexin-V stained neutrophil after 21h. Numbers in parenthesis are the mean fluorescence. Data are from one representative experiment out of three.

Figure 5. *Fragmentation of gelsolin during co-incubation of VAA-I with IL-15.* Freshly isolated human neutrophils (1×10^7 cells/ml) were incubated for 21 h with or without stimuli and apoptosis was assessed by monitoring gelsolin fragmentation as described under Materials and Methods. Lane 1, no stimulus; lane 2, 1000 ng/ml VAA-I; lane 3, 250 ng/ml IL-15; and lane 4, 1000 ng/ml VAA-I+250 ng/ml IL-15. Numbers in the left are molecular weight standards. Both native gelsolin (90 kD) and the specific 47 kD product (p47) are recognized by the mAb. Note that the 41 kD fragment (arrow) can be observed where VAA-I was added to the culture (lanes 2 and 4) and that native gelsolin is fragmented. Results are one representative experiment out of six.

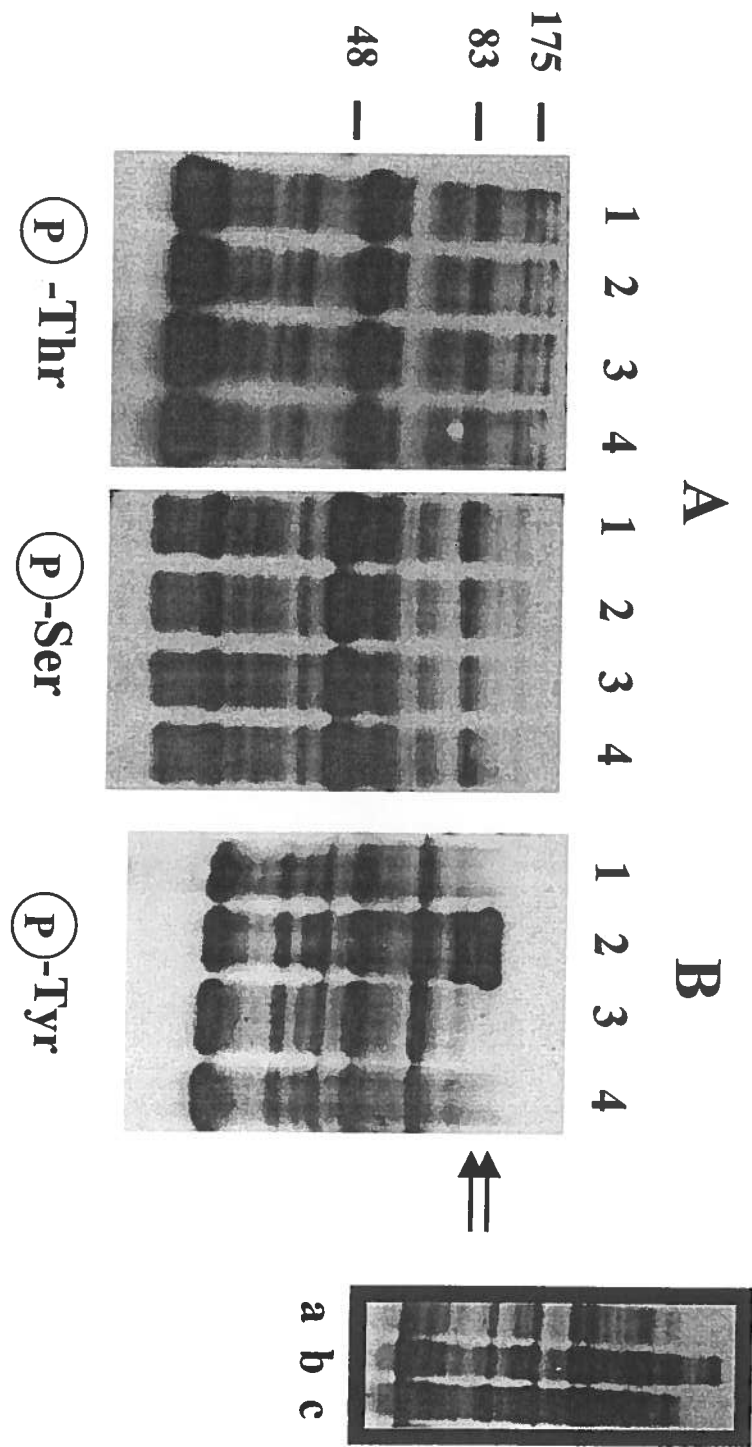


Figure 1

Figure 2

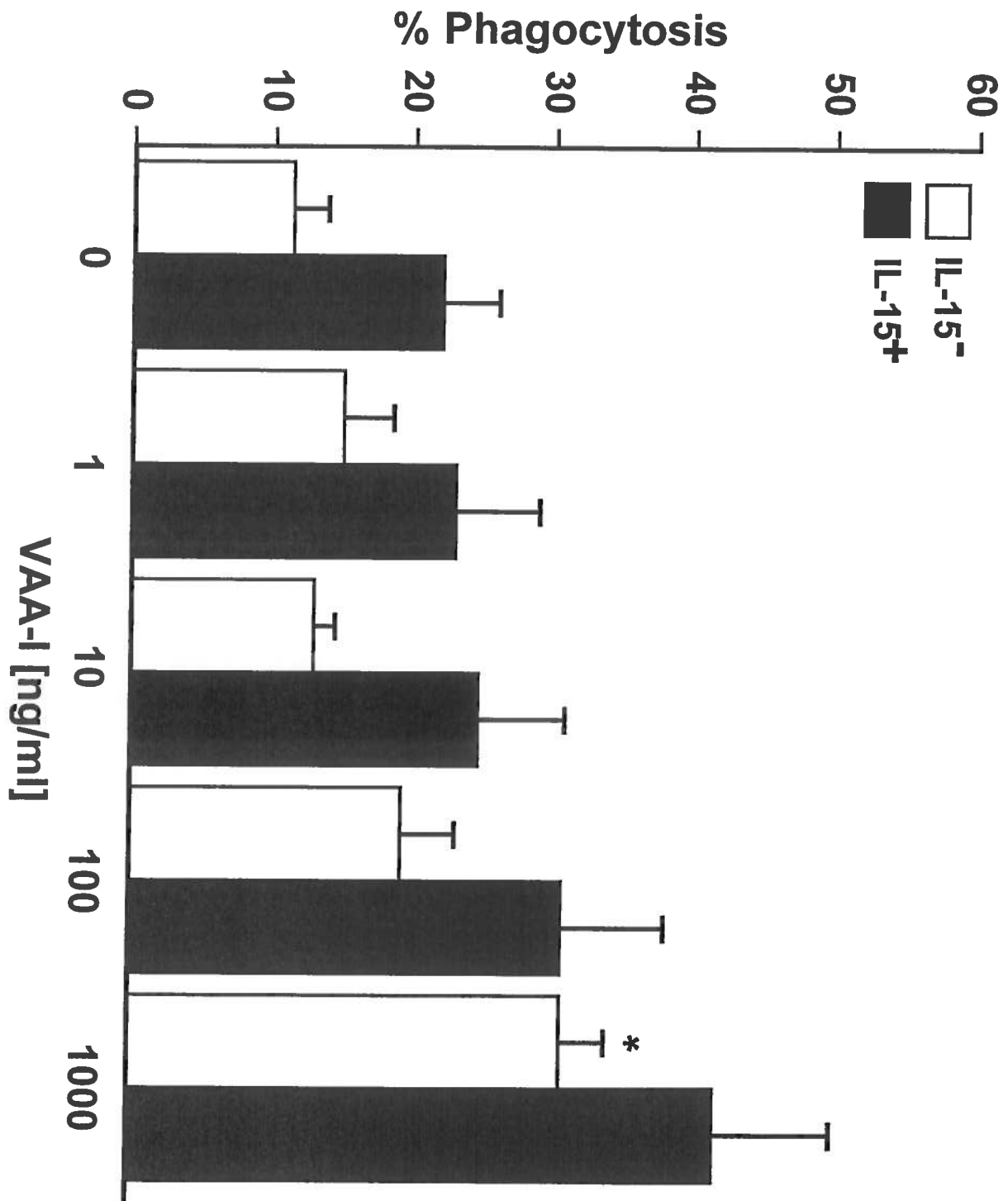
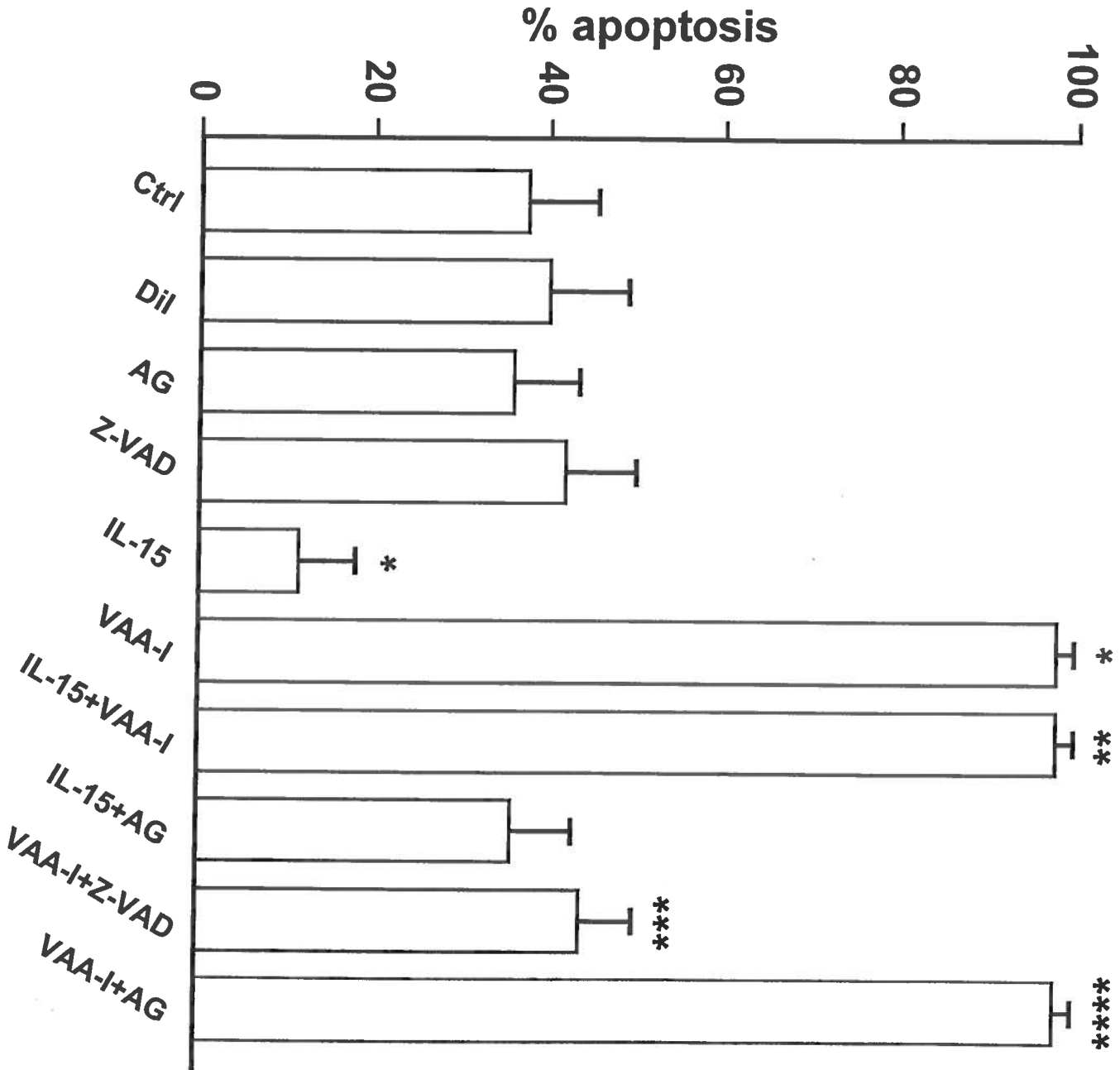


Figure 4 A



A

Figure 3

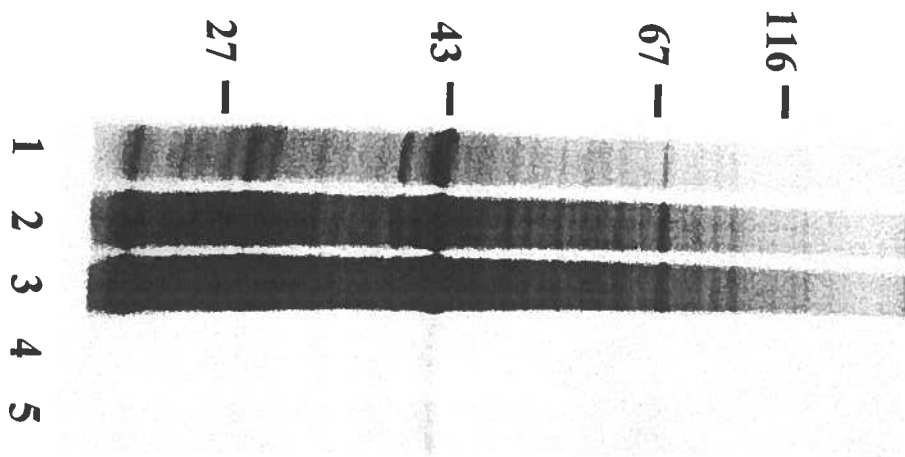


Figure 4 B

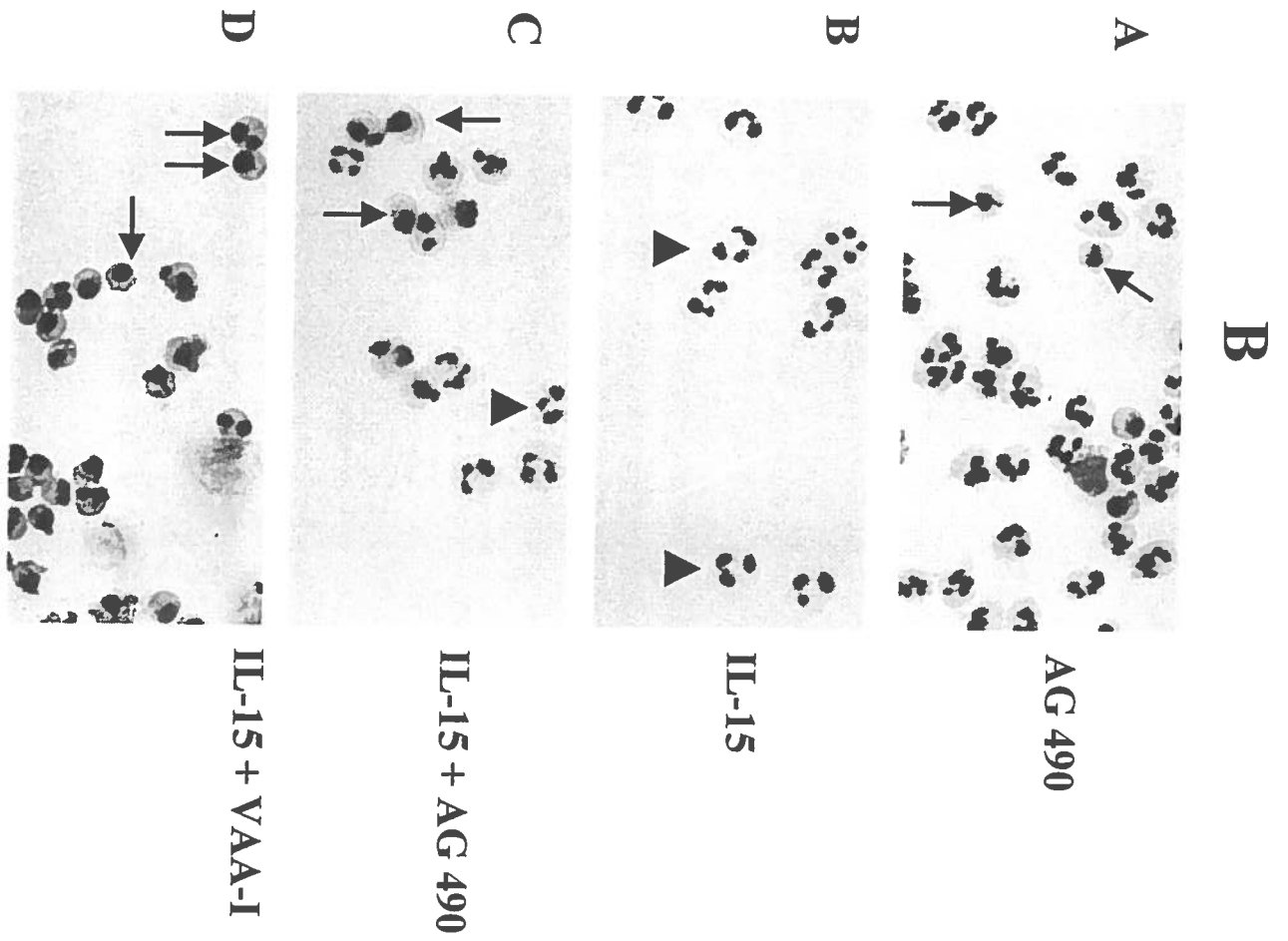
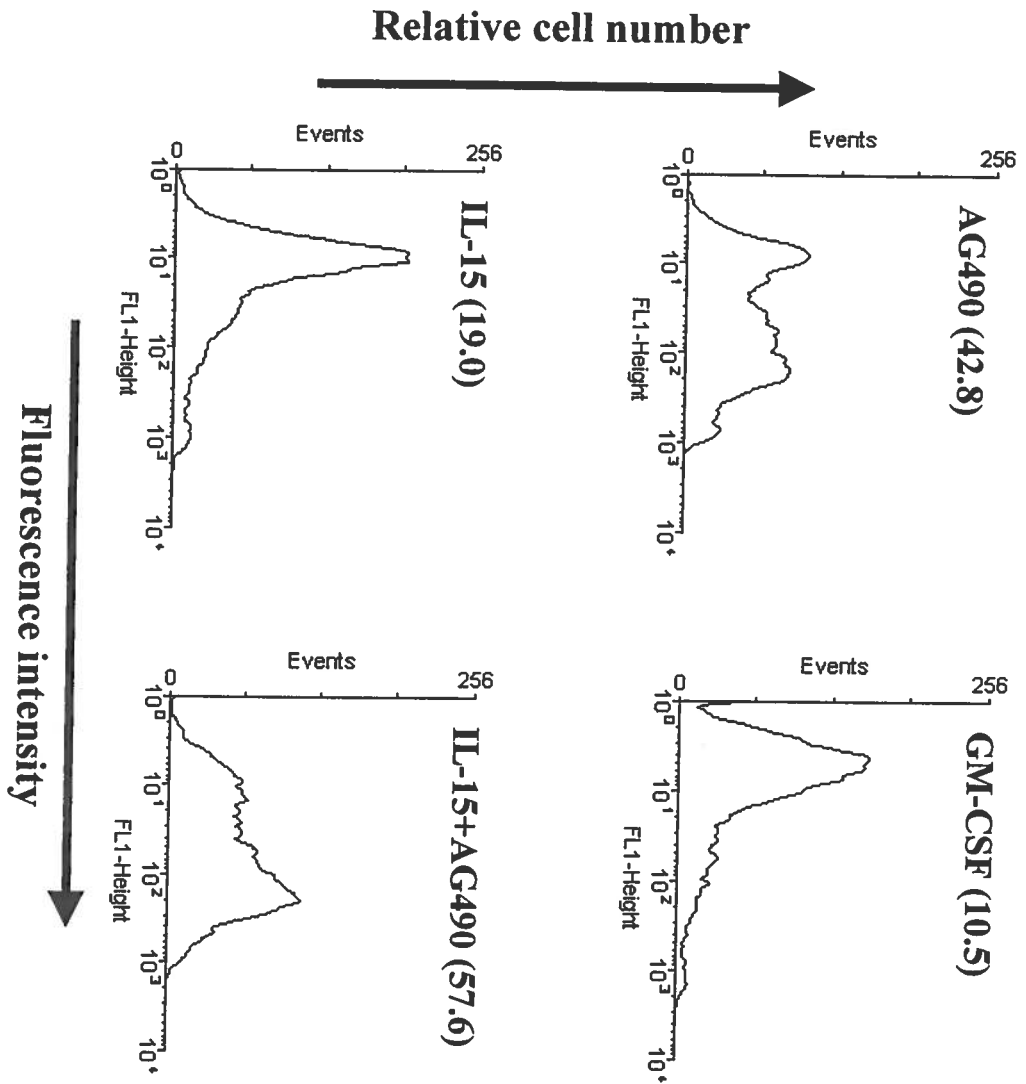
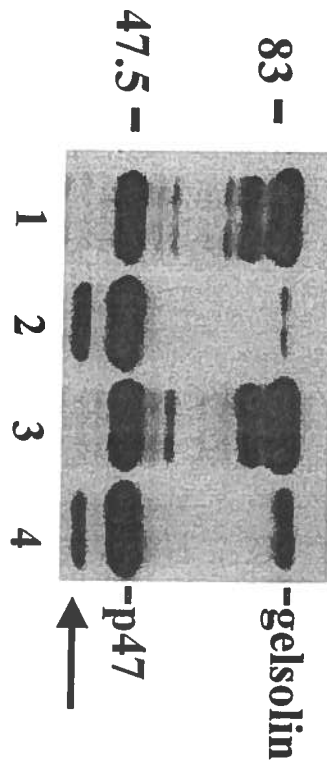


Figure 4 C



C

Figure 5



Troisième section : Discussion

Discussion

Nous avons démontré que la VAA-I à 1000 ng/ml est un puissant inhibiteur de la synthèse protéique *de novo* des NTs. Contrairement à la cycloheximide (Stringer, Hart et Edwards, 1996 et Cox et Austin, 1997) qui est un puissant inhibiteur de la synthèse protéique *de novo* autant dans les fractions intra ou extra cellulaires, la VAA-I affecte particulièrement la synthèse des protéines retrouvées dans la fraction intracellulaire. De plus, l'inhibition de la synthèse protéique par la VAA-I est moins marquée qu'avec la cycloheximide. Aux conditions analysées, la VAA-I et la cycloheximide étaient non-cytotoxiques puisque toutes les cellules étaient négatives au test du bleu de trypan. Toutefois, bien que la VAA-I ne soit pas cytotoxique à ces concentrations, elle induit fortement l'apoptose. Il pourrait en fait exister un lien entre l'inhibition de la synthèse protéique et l'induction de l'apoptose. La nature du lien reste encore complexe. À premier abord, l'induction de l'apoptose ne semble pas être la cause de l'inhibition de la synthèse protéique. En inhibant l'apoptose avec un inhibiteur de caspase, l'inhibition marquée de la synthèse protéique par la VAA-I est soutenue (*résultats non-publiés*). L'inverse demeure toutefois très probable. L'inhibition de la synthèse protéique pourrait être la cause de l'induction de l'apoptose. Le NT semble déjà posséder toute la machinerie nécessaire à l'induction de l'apoptose car la VAA-I accélère l'apoptose des NTs sans synthétiser de nouveaux facteurs apparents. Des auteurs ont déjà avancé que l'inhibition de la synthèse protéique inhiberait la production de certains facteurs de survie (Bantel et al., 1999). Toutefois, bien des facteurs anti-apoptotiques que l'on retrouve chez d'autres types cellulaires comme Bcl-2 et Bcl-X_L ne sont pas présents chez le NT. On connaît d'ailleurs une seule molécule anti-apoptotique chez le NT, soit le Mcl-1. L'implication de Mcl-1 dans l'apoptose induite par la VAA-I se doit d'être vérifiée. D'autres facteurs anti-apoptotiques encore inconnus sont probablement aussi impliqués. Une série d'expériences sur la production de cytokines pro-inflammatoires, nous a permis de démontrer que la VAA-I à des concentrations non-apoptotiques de 1 ng/ml augmente la production d'IL-8 et d'IL-1 β (*Article en préparation*). Il y aurait de plus une corrélation entre la diminution de l'IL-8 et l'induction de l'apoptose. La synthèse de ces cytokines diminue, à des concentrations de VAA-I inductrices d'apoptose. Ainsi, l'IL-8,

une cytokine connue pour son effet inhibiteur d'apoptose pourrait être un facteur anti-apoptotique chez les NTs. Des expériences avec des inhibiteurs de la synthèse d'IL-8 permettraient d'analyser une telle hypothèse (utilisation d'antisense IL-8 par exemple). Il faut toutefois demeurer prudent avant d'établir une telle corrélation entre la production d'IL-8 et la modulation de l'apoptose des NTs car il existe de nombreux résultats contradictoires sur le sujet. En effet, certains résultats démontrent que l'IL-8 pourrait retarder l'apoptose des NTs (Kettritz et al., 1998) tandis que d'autres n'ont aucun effet (Brach et al., 1992). Ces résultats démontrent bien que s'il existe un réseau de cytokine pour gouverner le taux d'apoptose des NTs, ce dernier serait très complexe. Ainsi, l'effet de la VAA-I sur la production ou le relâchement de certaines cytokines chez les NTs s'avère d'intérêt afin d'élucider un tel réseau. De plus, l'implication de telles cytokines dans le processus inflammatoire complet reste à être déterminée. Même si l'IL-1 β et l'IL-8 produits par les NTs n'ont pas d'effet direct sur la morphologie de ceux-ci, ils demeurent possible que ces dernières activent d'autres types cellulaires. Par exemple, la production d'IL-8 induite par la VAA-I pourrait servir de chimioattractant au foyer inflammatoire aussi bien pour les neutrophiles que pour les autres types cellulaires. Il faut noter que la VAA-I exerce une certaine spécificité chez les NTs car, contrairement à d'autres types cellulaires, aucune production de TNF- α et de GM-CSF n'est induite par cette lectine (*résultats non-publiés*). La VAA-I pourrait ainsi servir d'outil supplémentaire dans l'identification des mécanismes apoptotiques.

L'induction de l'apoptose des NTs est d'intérêt particulier dans l'étude de la résolution de l'inflammation aiguë. La VAA-I et sa capacité d'induire l'apoptose des NTs devient donc une molécule d'intérêt dans le domaine de l'inflammation. Les RIPs, comme la VAA-I, sont connues comme étant de bons candidats pour la production d'immunotoxine (Stirpe et al., 1992). Ainsi, le développement d'une immunotoxine avec la VAA-I dirigée contre des NTs pourrait s'avérer d'intérêt thérapeutique dans les cas de maladies associées à une inflammation. En effet, il est connu que dans plusieurs maladies d'ordre inflammatoire, comme l'arthrite rhumatoïde, il y a une accumulation accrue de NTs, suite à un bouleversement de causes encore obscures. Une telle accumulation est très toxique et dommageable pour les tissus environnants en plus de participer à l'élaboration non-contrôlée, par rétroaction positive, d'une réponse inflammatoire

indésirable. Dans de tels cas, l'induction de l'apoptose des NTs, une étape essentielle pour la résolution de l'inflammation, permettrait sûrement de contrôler les symptômes de certaines pathologies. Une telle immunotoxine devrait toutefois être dirigée contre un marqueur des NTs activés spécifiques pour les cellules présentes au foyer inflammatoire, afin de ne pas causer des effets secondaires majeurs, comme une immunosuppression complète de l'organisme. De plus, afin d'augmenter l'efficacité de la résolution de l'inflammation, les NTs apoptotiques doivent être phagocytés par les macrophages. Il a été démontré que l'induction de l'apoptose des NTs par la cycloheximide, un puissant inhibiteur de la synthèse protéique, menait à une augmentation du taux de phagocytose des NTs apoptotiques par les macrophages. Toutefois, un tel phénomène reste à être démontré suite à l'interaction VAA-I / NT.

Bien que l'hypothèse de l'implication de certains facteurs de survie soit fort probable pour l'induction de l'apoptose des NTs par la VAA-I, celle-ci implique que la molécule doit être endocytée. La chaîne A de la molécule, qui est responsable de l'inactivation du ribosome, est acheminée aux ribosomes par transport vésiculaire où elle est de plus activée. Afin de s'assurer d'une telle endocytose chez les NTs, des inhibiteurs du transport vésiculaire, comme le Brefeldin A, devraient inhiber l'apoptose. Ceci permettrait de déterminer, que la simple liaison de la molécule à son récepteur sur la cellule ne suffit pas à induire l'apoptose. L'étude de l'effet des chaînes séparées de la VAA-I sur la physiologie des NTs est de grand intérêt bien que les études précédentes sur les RIP et la VAA-I nous donnent toutes les raisons de croire que le fonctionnement de la VAA-I sur le NT serait le même qu'observé chez les autres types cellulaires.

Les voies de signalisation impliquées dans les phénomènes induits par la VAA-I demeurent encore inconnues. Nous avons démontré que des événements de phosphorylation de résidus sérine, tyrosine ou thréonine, ne se manifestent pas suite à une activation avec la VAA-I. Les NTs étaient toutefois bel et bien réceptifs, car le GM-CSF induisait une phosphorylation de tyrosine et de thréonine, tandis que l'IL-15 induisait la phosphorylation de résidus tyrosine et sérine (résultats non-publiés). Des auteurs avaient antérieurement démontré la phosphorylation d'une protéine de 28 kDa, suite à l'interaction VAA-I / lignée monocyttaire THP-1 bien qu'aucune indication ne soit disponible quant aux types de résidus impliqués puisqu'il s'agissait d'études d'incorporation de ^{32}P (Gabijs

et al., 1992). Pourtant, la molécule de VAA-I, comme les autres RIP de type II doit être endocytée par la cellule afin d'exercer son effet et la réorganisation du cytosquelette nécessaire à ce processus est dépendante d'événements de phosphorylation.

La VAA-I est un inducteur très puissant de l'apoptose, car celle-ci peut contrecarrer l'effet de molécules anti-apoptotiques comme le GM-CSF et l'IL-15. L'IL-15 est en fait fortement présent dans certains foyers inflammatoires chroniques et la VAA-I peut inhiber plusieurs de ces effets pro-inflammatoires. En plus d'enrayer l'effet anti-apoptotique de l'IL-15, la VAA-I inhibe aussi sa capacité d'induire la synthèse protéique chez les NTs. Elle pourrait également inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires induites par l'IL-15.

L'induction de l'apoptose par la VAA-I semble emprunter des voies de signalisation distinctes de celles empruntées par des inhibiteurs de l'apoptose comme le GM-CSF. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs des tyrosine kinases (la génistéine) et de l'inhibiteur spécifique de Jak-2 et Jak-3 (le tyrphostin B42) peuvent renverser la capacité du GM-CSF à retarder l'apoptose sans avoir d'effet sur la modulation de l'apoptose induite par la VAA-I. Nous démontrons aussi que l'IL-15 nécessite aussi le recrutement de Jak-2 et/ou Jak-3 pour retarder l'apoptose car l'inhibiteur tyrphostin B42 renverse l'effet de l'IL-15 sur les NTs. Ces résultats suggèrent une fois de plus que l'induction de l'apoptose par la VAA-I est indépendante de l'activation des tyrosine kinases. La VAA-I agit même sans recruter Jak-2 et/ou Jak-3, deux molécules très importantes dans la signalisation intracellulaire des NTs.

Nous avons de plus tenté de renverser l'effet inducteur de l'apoptose par la VAA-I en utilisant une gamme d'inhibiteurs de nombreuses voies incluant des inhibiteurs des PKCs; le calphostin C, la staurosporine et le H7, des inhibiteurs des PLA₂; le manoalide, le bromure de 4-bromophénacyle et la quinacrine et finalement un inhibiteur des protéines G; le *Pertussis toxine*. Nous avons trouvé que seul un inhibiteur de caspase (z-VAD FMK inhibiteur des caspases -1, -3, -4 et -7) rétablit le niveau de l'apoptose au niveau basal. Cette implication des caspases a été de plus confirmée par la fragmentation de la gelsoline du cytosquellette lors de l'induction de l'apoptose (Kothakota et al., 1998). Nous avons confirmé ces résultats suite à l'interaction VAA-I /NTs et VAA-I /NTs/IL-15. De plus, l'addition d'inhibiteurs de caspases (z-VAD-FMK) inhibe cette fragmentation.

D'autres caspases pourraient être impliquées, car l'inhibiteur z-VAD-FMK n'est pas spécifique à une caspase. Toutefois, les auteurs précédemment mentionnés ont identifié la gelsoline comme étant un substrat de la caspase-3.

L'activité phagocytaire des NTs est essentielle au bon déroulement de la résolution de l'inflammation. Bien que l'IL-15 possède plusieurs propriétés pro-inflammatoires, il a déjà été démontré que cette molécule induit une augmentation de l'activité phagocytaire des NTs (Girard et al., 1996). La VAA-I augmente aussi cette activité sans altérer l'effet de l'IL-15. Il existe plutôt un effet additif de l'activité phagocytaire des NTs, suite à une interaction entre ces deux molécules. L'implication d'une augmentation de la phagocytose est une fois de plus un pas vers un meilleur mécanisme de résolution de l'inflammation.

Somme toute, la VAA-I possède des effets importants sur la physiologie des NTs. Ces effets aux propriétés anti-inflammatoires sont si puissants qu'ils inhibent des systèmes pro-apoptotiques comme celui du GM-CSF ou de l'IL-15. Suite à ces résultats, nous pouvons conclure que la VAA-I peut devenir un outil important dans l'étude de l'inflammation et plus spécifiquement dans la résolution de l'inflammation chronique. Cette présente étude est donc un premier pas dans ce domaine et laisse entrevoir de nombreuses perspectives futures aussi bien théoriques que thérapeutiques, qui sont déjà en évaluation dans notre laboratoire.

Il devient donc intéressant de continuer à trouver les composantes mécanistiques de la modulation par la VAA-I afin de pouvoir proposer un modèle d'action des plus complet. De plus, l'étude de l'interaction VAA-I /NT dans un contexte plus global d'inflammation comprenant d'autres types cellulaires ainsi que l'effet de la VAA-I dans des modèles *in vivo* d'inflammation comme le modèle des poches d'air ou celui de l'arthrite induite au collagène est essentielle afin de bien caractériser le rôle de la VAA-I dans le processus inflammatoire.

Bibliographie

- ABBASSI, O., C.L. Lane, S. Krater, T.K. Kishimoto, D.C. Anderson, L.V. McIntyre et W.C. Smith. 1991. «Canine Neutrophil Margination Mediated by Lectin Adhesion Molecule-1 in vitro». Journal of Immunology, vol. 147, p.2107-2125.
- ABRAMSON, J.S. et J.G. Wheeler (éd.). 1997. The Natural Immune System : The Neutrophil. Toronto : Oxford University Press, 306p.
- ADUNYAH, S.E., B.J. Wheeler et R.S. Cooper. 1997. «Evidence for the Involvement of LCK and MAP Kinase (ERK-1) in the Signal Transduction Mechanism of Interleukin-15». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol.232, p.754-758.
- AGOSTINI, C., L. Trentin, M. Facco, R. Sancetta, A. Cerutti, C. Tassinari, L. Cimarosto, F. Adami, A. Cipriani, R. Zambello et G. Semenzato. 1996. «Role of IL-15, IL-2 and their Receptors in the Development of T Cell Alveolitis in Pulmonary Sarcoidosis». Journal of Immunology, vol. 157, p. 910-918.
- AKBAR, A.N., J. Savil, W. Gombert, M. Bofill, N.J. Borthwick , F. Whitelaw, J. Grundy, G. Janossy et M. Salmon. 1994. «The Specific Recognition by Macrophages of CD8+, cd45RO+ T Cells Undergoing Apoptosis: A Mechanism for T cell Clearance During Resolution of Viral Infections». Journal of Experimental Medicine, vol. 180, p.1943-1947.
- ALNEMRI, E.S., D.J. Livingstone, D.W. Nicholson, G. Salvesen, N.A. Thronberry, W.W. Wong et J. Yuan. 1996. «Human ICE/CED-3 Proteases Nomenclature». Cell, vol. 87, p.171.
- ANSERSON, D.M., S. Kumaki, M. Ahdieh, J. Bertles, M. Tometsko, A. Loomis, J. Giri , N.G. Copeland , D. J. Gilbert , N. A. Jenkins , V. Valentine , D. N. Shapiro, S. W. Morris, L. S. Park et D. Cosman. 1995. «Functionnal Characterization of the Human Interleukin-15 Receptor Alpha Chain and Close linkage of IL-15RA and IL-2RA Genes». Journal of Biological Chemistry, vol. 270, p. 29862-29869.
- ARMITAGE, R.J., B.M. MacDuff, J. Eisenman, R. Paxton et K.H. Grabstein. 1995. «IL-15 has Stimulatory Activity for the Induction of B Cell Proliferation and Differentiation». Journal of Immunology, vol. 154, p.483-490.
- ASAO, H., T. Takeshita, N. Ishii, S. Kumaki, M. Nakamura et K. Sugamura. 1993. «Reconstitution of Functional Interleukin 2 Receptor Complexes on Fibroblastoid Cells: Involvement of the Cytoplasmic Domain of the Gamma Chain in Two Distinct Signaling Pathways». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol.90, p.4127-4131.
- BAMFORD, R.N., Y. Tagaya et T.A.Waldmann. 1996. «Interleukine-15- What it does and how it is Controlled». Immunologist, vol 5, p.52-56.

BANTEL, H., I.H. Engels, W. Voelter, K. Schulze-Osthoff et S. Wesselborg. 1999. «Mistletoe Lectin Activates Caspase-8/FLICE Independently of Death Receptor Signaling and Enhances Anticancer Drug-induced Apoptosis». Cancer research, vol 59, p. 2083-2090.

BENJAMINI, E., G. Sunshine et S. Leskowitz. 1996. Immunology : A Short Course. 3^eédition. New York : Wiley-Liss, 484p.

BERENDT, A.R., A. McDowall, A.G. Craig, P.A. Bates, M.J.E. Sternberg, K. Marsh, C. I. Newbold et N. Hogg. 1992. «The Binding Site on ICAM-1 for *Plasmodium falciparum*-infected Erythrocytes Overlaps, but is Distinct from, the LFA-1-binding Site». Cell, vol. 68, p.71-81.

BEVILACQUA, P.M., G. Stengelin, M. A. Jr Gimbrone et B. Seed. 1989. «Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule 1: an Inducible Receptor for Neutrophils Related to Complement Regulatory Proteins and Lectines». Science, vol. 243, p.1160-1165.

BIFFL, W.L., E.E. Moore, F.A. Moore et C.C.J. Barnett. 1995. «Interleukin-6 Suppression of Neutrophil Apoptosis is Neutrophil Concentration dependent». Journal of Leukocyte Biology, vol.58, p.582-584.

BIRON, C.A. et R.T. Gazzinelli. 1995. «Effects of IL-12 on Immune Responses to Microbial Infections: A Key Mediator in Regulating Disease Outcome». Current Opinions in Immunology, vol.7, p.485-496.

BOLDIN, M.P., T.M. Goncharov, Y.V. Goltsev et D. Wallach. 1996. «Involvement of MACH, a Novel MORT1/FADD-interacting Protease, in Fas/APO-1 and TNF Receptor-induced Cell Death». Cell, vol.85, p.803-815.

BRACH, M.A., S. deVos, H.-J. Gruss et F. Hermann. 1992. «Prolongation of Survival of Human Polymorphonuclear Neutrophils by Granulocyte-macrophage Colony Stimulating Factor is Caused by Inhibition of Programmed Cell Death». Blood, vol 80, p.2920-2924.

BYERS, V.S., P.J Henslee, N.A. Kernan, B.R. Blazar, R. Gingrich, G.L. Phillips, C.F. LeMaistre, G. Gilliland, J.H Antin, P. Martin et al. 1990. «Use of an Anti-pan T-lymphocyte Ricin a Chain Immunotoxin in Steroid-resistant Acute Graft-versus-host Disease». Blood, vol 75, no.7, p.1426-1432.

CARSON, W.E., J.G. Giri, M.J. Lindemann, M.L. Linett, M. Ahdieh, R. Paxton, D. Anderson, J. Eisenmann, K. Grabstein et M.A. Caligiuri. 1994. «Interleukin (IL) 15 is a Novel Cytokine that Activates Human Killer Cells via Components of the IL-2 Receptor». Journal of Experimental Medicine, vol. 180, p.1395-1403.

CARSON, W.E., M.E. Ross, R.A. Baiocchi, M.J. Marien, N. Boiani, K. Grabstein et M.A. Caligiuri. 1995. «Endogenous Production of Interleukin 15 by Activated Human Monocytes is Critical for Optimal Production of Interferon- γ by Natural Killer Cells in Vitro». Journal of Clinical Investigation, vol. 96, p.2578-2582.

- CHINNAIYAN, A.M., K. O'Rourke, M. Tewari et V.M. Dixit. 1995. «FADD, a Novel Death Domain-containing Protein, Interacts with the Death Domain of Fas and Initiates Apoptosis». Cell, vol. 81, p. 505-512.
- CLOSS, O., E. Saltvedt et S. Olsnes. 1975. «Stimulation of Human Lymphocytes by Galactose-specific Abrus et Ricinus Lectins». Journal of Immunology, vol.115, no.4, p.1045-1048.
- COHEN, J.J. 1993. «Apoptosis». Immunology Today, vol. 14, no. 3, p. 126-130.
- COLOTTA, F., F. Re, N. Polentarutti, S. Sozanni et A. Mantovani. 1992. «Modulation of Granulocyte Survival and Programmed Cell Death by Cytokines and Bacterial Products». Blood, vol. 80, p.2012-2020.
- COX, G. et R.C. Austin. 1997. «Dexamethasone-induced Suppression of Apoptosis in Human Neutrophils Requires Continuous Stimulation of New Protein Synthesis». Journal of leukocyte biology, vol. 61, p. 224-230.
- DENIS, F., E. Rhéaume, S.M. Aouad, R.-P. Sékaly et L.Y. Cohen. 1998. «The Role of Caspases in T Cell Development and the Control of Immune Responses». Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 54, p.1005-1019.
- DIAMOND, M.D. 1991. «Binding of the Integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the Third Immunoglobulin-like Domain of ICAM-1». Cell, vol 65, p.961-971.
- DIETRICH, J.B., G. Ribéreau-Gayon, M.L. Jung, H. Franz, J.P. Beck et R. Anton. «Identity of the N-terminal Sequence of the Three A Chains of Mistletoe (*Viscum album* L.) lectins : Homology with Ricin-like Plant Toxins and Single-chain Ribosome-inhibiting Proteins». Anti-Cancer Drug, vol.3 pp.507-511.
- DINI, L., F. Autori, A. Lentini, S. Oliviero et M. Piacentini. 1992. «The Clearance of Apoptotic Cells in the Liver is Mediated by the Asialoglycoprotein Receptor». FEBS Letter, vol. 296, p.174-178.
- DOHERTY, T.M., R.A. Seder et A. Sher. 1996. «Induction and Regulation of IL-15 Expression in Murine Macrophages». Journal of Immunology, vol 156, p.735-741.
- DRANSFIELD, I., A.-M. Buckel, J.S. Savill, A. Macdowall, C. Haslett et N. Hogg. 1994. «Neutrophil Apoptosis is Associated with a Reduction in CD16 (FcγRIII) Expression». Journal of Immunology, vol. 153, p. 1254-1263.
- EDWARDS, S.W. 1994. Biochemistry and Physiology of the Neutrophil. New York : Cambridge University Press, 299p.
- FADEEL, B., A Ahlin, J.-I. Henter S. Orrenius et M.B. Hampton. 1998. «Involvement of Caspases in Neutrophil Apoptosis: Regulation by Reactive Oxygen Species». Blood, vol.92, no. 12, p.4808-4818.

FADOK, V. A., D.R. Voelker, P.A. Campbell, J.J. Cohen, D.L. Bratton et P.M. Henson. 1992. «Exposure of Phosphatidylserine on the Surface of apoptotic Lymphocytes Triggers Specific Recognition and Removal by Macrophages». Journal of Immunology, vol. 148, p. 2207-2216.

FADOK, V.A., J.S. Savill, C. Haslett, D.L. Bratton, D.E. Doherty, P.A. Campbell et P.M. Henson. 1992. «Different populations of Macrophages Use Either the Vitronectin Receptor or the Phosphatidylserine Receptor to Recognise and Remove Apoptotic Cells». Journal of Immunology, vol. 149, p.4029-4035.

FOKUDA, M., E. Spooncer, J.A. Oates, A. Dell et C.J. Klock. 1984. «Structure of Sialylated Fucosyl Lactosaminoglycan Isolated From Human Granulocytes». Journal of Biological Chemistry, vol. 259, p.10925-10935.

FOOTE, J. et C. Milstein. 1991. «Kinetic Maturation of an Immune Response». Nature, vol. 353, 530-532.

FRANZ, H., A. Kindt, P. Ziska, H. Bielka, R. Benndorf et L. Venker. 1982. «The Toxic A-chain of Mistletoe Lectin I: Isolation and its Effects on Cell-free Protein Synthesis». Acta Biologica et Medica Germanica, vol.41, p.K9-K16.

FRANZ, H., P. Ziska et A. Kindt. 1981. «Isolation and Properties of Three Lectins from Mistletoe (*Viscum album* L.)». Biochemical journal, vol. 195, p.481-484.

GABIUS, H.-J., H. Walzel, S.S. Joshi, J. Kruip, S. Kojima, V. Gerke, H. Kratzin et S. Gabius. 1992. «The Immunomodulatory β -Galactoside-Specific Lectin from Mistletoe : Partial Sequence Analysis, Cell and Tissue Binding, and Impact on Intracellular Biosignalling of Monocytic Leukemia Cells». Anticancer Research, vol.12, p.669-676.

GIRARD, D., M.-E. Paquet, R. Paquin et A.D. Beaulieu. 1996. «Differential Effects of Interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on Human Neutrophils: Modulation of Phagocytosis, Cytoskeleton Rearrangement, Gene Expression, and Apoptosis by IL-15». Blood, vol. 88, p.3176-3184.

GIRARD, D., N. Boiani et A.D. Beaulieu. 1998. «Human Neutrophils Express the Interleukin-15 Receptor α Chain (IL-15R α) but Not the IL-9R α Component». Clinical Immunology and Immunopathology, vol 88, no.3, p.232-240.

GIRI, J.G., M. Eisenman, K. Shanebeck, K. Grabstein, S.Kumaki, A. Namen L.S. Park, D. Cosman et D. Anderson. 1994. «Utilization of the Beta and Gamma Chains of the IL-2 Receptor by the Novel Cytokine IL-15». EMBO Journal, vol 13, p.2822-2830.

GIRI, J.G., S. Kumaki, M. Ahdieh, D.J. Friend, A. Loomis, K. Shanebeck, R.D. DuBose, Cosman, L.S. Park et D.M. Anderson. 1995. «Identification and Cloning of a Novel IL-15 binding Protein that is Structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor». EMBO Journal, vol. 14, no. 15, p.3654-3663.

- GOULET, A.-C., V.S. Goldmacher, J.M. Lambert, C. Baron, D.-C. Roy et E. Kouassi. 1997. «Conjugation of Blocked Ricin to an Anti-CD19 Monoclonal Antibody Increases Antibody-Induced Cell Calcium Mobilization and CD19 Internalization». Blood, vol. 90, no. 6, p. 2364-2375.
- GRABSTEIN, K.H., J. Eisenman, K. Shanebeck, C. Rauch, S. Srinivasan, V. Fung, C. Beers, J. Richardson, M.A. Schoenborn, M. Ahdieh, L. Johnson, M.R. Alderson, J.D. Watson, D.M. Anderson et J.G. Giri. 1994. «Cloning of a T Cell Growth Factor That Interacts with the β Chain of the Interleukin-2 Receptor». Science, vol. 264, p.965-968.
- GREEN, D.R. et J.C. Reed. 1998. «Mitochondria and Apoptosis». Science, vol. 281, p.1309-1316.
- GROGG, J.M., J.S. Savill, C. Sarraf, C. Haslett et M. Silverman. 1991. «Neutrophil Apoptosis and Clearance from Neonatal Lungs». Lancet, vol. 338, p.720-722.
- HAJTO T. 1986. «Immunomodulatory Effects of Iscador: A *Viscum album* Preparation». Oncology, vol 43, supp. 1, p.51-65.
- HAJTO, T., K. Hostanska et H.-J. Gabius. 1989. «Modulatory Potency of the β -Galactoside-specific Lectin from Misteltoe Extract (Iscador) on the Host Defense System *in Vivo* in Rabbits and Patients». Cancer Research, vol. 49, p.4803-4808.
- HAJTO, T., K. Hostanska, K. Frei, C. Rordorf et H.-J. Gabius. 1990. «Increased Secretion of Tumor Necrosis Factor α , Interleukin-1, and Interleukin-6 by Human Mononuclear Cells Exposed to β -Galactoside-specific Lectin from Clinically Applied Mistletoe Extract». Cancer research, vol 50, p.3322-3326.
- HAJTO, T., K. Hostanska, K. Weber, H. Zinke, J. Fischer, U. Mengers, H. Lentzen et R. Saller. 1998. «Effects of a Recombinant Lectin, *Viscum album* Agglutinin on the Secretion of Interleukin-12 in Cultured Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and on NK-Cell-Mediated Cytotoxicity of Rat Splenocytes *in vitro* and *in vivo*». Natural Immunity, vol. 16, no. 1, p.34-46.
- HALL, S., J. Savill, P. Henson et C. Haslett. 1994. «Apoptotic Neutrophils are Phagocytosed by Fibroblasts with Participation of the Fibroblast Vitronectin Receptor and Involvement of a Mannose/fucose-specific Lectin». Journal of Immunology, vol. 153, p. 3218-3227.
- HASLETT, C., J. Savill et L. Meagher. 1990. «Macrophage Recognition of Senescent Granulocytes. Biochemical Society Transactions, vol. 18, p.225-227.
- HASLETT, C., J.S. Savill, M.K.B. Whyte, M. Stern, I. Dransfield et L.C. Meagher. 1994. «Granulocyte Apoptosis and the Control of Inflammation». Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, vol. 345, p.327-333.

- HATAKEYAMA, M., H. Mori, T. Doi et T. Taniguchi. 1989. «A Restricted Cytoplasmic Region of IL-2 Receptor Beta Chain is Essential for Growth Signal Transduction but not for Ligand Binding and Internalization». Cell, vol. 59, p.837-845.
- HATTORI, R., K.K. Hamilton, R.D. Fugate, R.P. McEver et P.J. Sims. 1989. «Stimulated Secretion of Endothelial von Willebrand Factor is Accompanied by Rapid Redistribution to the Cell Surface of the Intracellular Granule Membrane Protein GMP-140». Journal of Biological Chemistry, vol.264, p.7768-7771.
- HEMLER, M.E. 1988. «Adhesive Protein Receptors on Hematopoietic Cells». Immunology Today, vol. 9, p.109-113.
- HOORNAERT, S., E. Hanon, J. Lyaku et P.-P. Pastoret. 1997. «The Use of Annexin for Concomitant detection of Apoptosis and Cellular Phenotype». Biochemica, no.3, p.19.
- HOSTANSKA, K., T. Hajto, K. Weber, J. Fischer, H. Lentzen, B. Sütterlin et R. Saller. «A Natural Immunity-Activating Plant Lectin, *Viscum album* Agglutinin-I, Induces Apoptosis in Human Lymphocytes, Monocytes, Monocytic THP-1 Cells and Murine Thymocytes». Natural Immunity, vol.15, p. 295-311.
- HSU, H., J. Xiong et D.V. Goeddel. «The TNF Receptor 1-associated Protein TRADD Signals Cell Death and NK-kB Activation». Cell, vol. 81, p.495-504.
- HSU-LIN, S., C.L. Berman, B.C. Furie, D. August et B. Furie. 1984. «A Platelet Membrane Protein Expressed During Platelet Activation and Secretion. Studies Using Monoclonal Antibody Specific for Thrombin-activated Platelets». Journal of Biological Chemistry, vol. 259, p. 9121-9126.
- HUGHES, J. et J. Savill. 1992. «The Human Mesangial Cell Vitronectin Receptor Mediates Phagocytosis of Senescent Neutrophils Undergoing Apoptosis». Journal of the American Society of Nephrology, vol. 3, p.566.
- HURLEY, J.V. (éd). 1983. Acute inflammation. 2^e édition. London : Churchill Livingstone, 144p.
- JANEWAY, C.A. et P. Travers. 1997. Immunobiologie. Traduit de l'anglais par A. Depelchin. 2^eédition. Paris : De Boeck & Larcier, 582p.
- JOHNSTON, J.A., C.M. Bacom, D.S. Finbloom, R.C. Rees, D. Kaplan, K. Shibuya, J.R. Ortaldo, S. Gupta, Y.Q. Chen, J.D. Giri et al. 1995. «Tyrosine Phosphorylation and Activation of STAT5, STAT3, and Janus Kinases by Interleukin-2 and -15». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol 92, p.8705-8709.
- KAMUKU, S., A. Okumura, T. Ishikawa, M. Yano, A. Enomoto, H. Nishimura, K. Yoshioka ET Y. Yoshika. 1997. «Serum Level of IL-10, IL-15 and Soluble Tumour Necrosis Factor- α Receptors in Type C Chronic Liver Disease». Clinical and Experimental Immunology, vol. 109, p. 458-463.

- KAUFMAN, S.J. et A. McPherson. 1975. «Abrin and Hurin : Two New Lymphocyte Mitogens». Cell, vol.4, no. 3, p 263-268.
- KERNAN, N.A., V. Byers, P.J. Scannon, R.P. Mischak, J. Brochstein, N Flomenberg, B. Dupont et R.J. O'Reilly. 1988. «Treatment of Steroid-resistant Acute Graft-vs-host Disease by In Vivo Administration of an Anti-cell Ricin A chain Immunotoxin». The Journal of the American Medical Association, vol.259, no.21, p.3154-3157.
- KETTRITZ, R., M.L. Gaido, H. Haller, F.C. Luft, C.J. Jennette et R.J. Falk. 1998. «Interleukin-8 Delays Spontaneous and Tumor Necrosis Factor-alpha-mediated Apoptosis of Human NTs». Kidney International, vol. 53, p. 84-91.
- KILLEN, J.A. et J.M. Lindstrom. 1984. «Specific Killing of Lymphocytes That Cause Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis by Ricin Toxin-acetylcholine Receptor Conjugates». Journal of Immunology, vol.133, no.5 pp.2549-2553.
- KIRMAN, I. et O.H. Nielson. 1996. «Increased Numbers of Interleukine-15-expressing Cells in Active Ulcerative Colitis». American Journal of Gastroenterology, vol. 91, p. 1789-1794.
- KISCHKEL, F.C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P. Krammer et al. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated Proteins from a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor». EMBO Journal, vol. 14, p.5579-5588.
- KLEBANOFF, S.J. et A.M. Walterdorff. 1990. «Prooxidant Activity of Transferrin and Lactoferrin». Journal of Experimental Medicine, vol. 172, p.1293-1303.
- KOCHI, S.K. et R.J. Collier. 1993. «DNA Fragmentation and Cytolysis in U937 Cells Treated with Diphtheria Toxin or Other Inhibitors of Protein Synthesis». Experimental Cell Research, vol.208, no.1, p.296-302.
- KOTHAKOTA, S., T Azuma, C. Reinhard, A Klippel, J. Tang, K Chu, T.J. McGarry, M.W. Kirschner, K. Koths, D.J. Kwiatkowski et L.T. William. 1997. «Caspase-3-Generated Fragment of Gelsolin : Effector of Morphological Change in Apoptosis». Science, vol 278, no. 5336, p. 294-298.
- KRAUSPENHAAR, R., S. Eschenburg, M. Perbandt, V. Kornilov, N. Konareva, I. Mikailova, S. Stoeva, R. Wacker, T. Maier, T. Singh, A. Mikhailov, W. Voelter et C. Betzel. 1999. «Crystal Structure of Mistletoe Lectin I from *Viscum album*». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol.257, p.418-424.
- KUIJPERS, T.W., B.C. Hakkert, J.A. van Mourik et D. Ross. 1990. «Distinct Adhesive Properties of Granulocytes and Monocytes to Endothelial Cells Under Static and Stirred Conditions». Journal of Immunology, vol.145, p. 2588-2594.

- LAMBERT, J.M., W.A. Blätter, G.D. McIntyre, V.S. Goldmacher and C.F. Scott Jr. 1988. «Immunotoxins Containing Single-chain Ribosome-inactivating Proteins». Cancer Treatment and Research, vol.37, p.175-209.
- LAPPI, D.A., W. Kapmeyer, J.M. Beylaur et N.O. Kaplan. 1978. «The Disulfide Bond Connecting the Chains of Ricin». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 75, p. 1096-1100.
- LAWRENCE, M.B. et T.A. Springer. 1991. «Leucocytes Roll on a Selectin at Physiologic Flow Rates: Distinction from a Prerequisite for Adhesion Through Integrins». Cell, vol.65, p. 859-873.
- LAWRENCE, M.B., C.W. Smith, S.G. Eskin et L.V. McIntyre. 1990. «Effect of Venous Shear Stress on CD18-mediated Neutrophil Adhesion to Cultured Endothelium». Blood, vol. 75, p. 227-237.
- LECLERCQ, G., V. Debacker, M. de Smedt et J. Plum. 1996. «Differential Effects of Interleukin-15 and Interleukin-2 on differentiation of Bipotential T/Natural Killer Progenitor Cells». Journal of Experimental Medicine, vol.184, p.325-336.
- LEE, A., M.K.B. Whyte et C. Haslett. 1993. «Inhibition of Apoptosis and Prolongation of Neutrophil Functionnal Longevity by Inflammatory Mediators». Journal of Leukocyte Biology, vol. 54, p.283-289.
- LEE, A., M.K.B. Whyte et C. Haslett. 1993. «Prolongation of in vitro Lifespan and Functionnal Longevity of Neutrophils by Inflammatory Mediators Acting Through Inhibition of Apoptosis». Journal of Leukocyte Biology, vol 54, p. 283-288.
- LEEK, M.D., G.D. Griffiths et M.A. Green. 1990. Pathological Aspects of Ricin Toxicity in Mammalian Lymph Node and Spleen. Medicine, Science and the Law, vol 30, no.2, pp.141-148.
- LICASTRO, F., M.C. Morini, A. Bolognesi et F. Stirpe. 1993. «Ricin Induces the Production of Tumour Necrosis Factor-alpha and Interleukin-1 beta by Human Peripheral-blood Mononuclear Cells». Biochemical Journal, vol 294, pt 2, p.517-520.
- LILES, W.C. et S.J.Klebanoff. 1995. «Regulation of Apoptosis in Neutrophils-Fas Track to Death»? Journal of Immunology, vol. 155, p. 3289-3291.
- LILES, W.C., P.A. Kiener, J.A. Ledbetter, A. Aruffo et S.J. Klebenoff. 1996. «Differential Expression of Fas (CD95) and Fas Ligand on Normal Human Phagocytes: Implications for the Regulation of Apoptosis in Neutrophils». Journal of Experimental Medicine, vol. 184, p. 429-440.
- LO, S.K., G.A. VanSeventer, S.A. Levin et S.D. Wright. 1989. «Two Leucocytes Receptors (CD11a/CD18 and CD11b/CD18) Mediate Transient Adhesion to Endothelium by Binding to Different Ligands». Journal of Immunology, vol. 143, p.3325-3329.

- LUTHER, P., H. Theise, B. Chatterjee, D. Karduck, G. Uhlenbruck. 1980. «The Lectin from *Viscum album* L.- Isolation, Characterization, Properties and Structure». International Journal of Biochemistry, vol.11, p. 429-435.
- MALE, D. 1999. Immunologie aide-mémoire illustré. Traduit de l'anglais par P. Fronteneau. 2^eédition. Paris : De Boeck & Larcier, 129p.
- MANCINI, M., D.W. Nicholson, S. Roy, N.A. Thornberry, E.P. Peterson, L.A. Casciola-Rosen et A. Rosen. 1998. «The Caspase-3 Precursor has a Cytosolic and Mitochondrial Distribution: Implications for Apoptotic Signaling». Journal of Cell Biology, vol. 140, p. 1485-1495.
- MANGRAN, D.F., G.R. Welch et S.M. Wahl. 1991. «Lipopolysaccharide, Tumour Necrosis Factor- α and Interleukin-1 β Prevent Programmed Cell Death (Apoptosis) in Human Peripheral Blood Monocytes». Journal of Immunology, vol. 146, p.1541-1545.
- MCINNES, I.B., J. Al-Mughales, M. Field, B.P. Leung, F.P. huang, R. Dixon et al. 1996. «The Role of Interleukine-15 in T-cell Migration and Activation in Rheumatoid Arthritis». Natural Medicine, vol. 2, p.175-182.
- MEAGHER, L.C., J.S. Savill, A. Baker et C.Haslett. 1992. «Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils does not Induce Macrophage Release of Thromboxane B2». Journal of Leukocyte Biology, vol. 52, p. 269-273.
- METCHNIKOFF, E. 1891. «Lectures on the Comparative Pathology of Inflammation». Lecture VII. Delivered at the Pasteur Institutue. Translated by F.A. Starling & E.H. Starling. New York: Dover, 1968.
- METZGER, H. (éd). 1990. Fc receptors and the action of antibodies. Washington : ASM Publications.
- METZNER, G., H. Franz, A. Kindt, B. Fahlbusch et J. Süß. 1985. «The *in vitro* Activity of LectinI from Mistletoe (ML I) and its Isolated A and B Chains on Functions of Macrophages and Polymorphonuclear Cells». Immunobiology, vol.169, p.461-471.
- MORIWAKI, S., H. Ohba, O. Nakamura, I. Sallay, M. Suzuki, H. Tsubouchi, N. Yamasaki et K. Itoh. 2000. «Biological Activities of the Lectin, Abrin-a Against Human Lymphocytes and Cultured Leukemic Cell Lines». Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research, vol.9, no.1, pp.47-53.
- MORRIS, R.G., A.D. Hargreaves, E. Duvall et A.H. Wyllis. 1984. «Hormone Induced Cell Death 2. Surface changes in Thymocytes Undergoing Apoptosis». American Journal of Pathology, vol. 115, p. 426-436.
- MOULDING, D.A., J.A. Quayle, C.A. Hart et S.W. Edwards. 1998. «Mcl-1 Expression in Human Neutrophils: Regulation by Cytokines and correlation With Cell Survival». Blood, vol. 92, no. 7, p. 2495-2502.

- MUIRA, M., H. Zhu, R. Rotello, E.A. Hartweg et J. Yuan. 1993. «Induction of Apoptosis in Fibroblast by IL-1 β -converting Enzyme, a Mammalian Homolog of the *C. elegans* Cell Death Gene *ced-3*». Cell, vol. 75, p.653-660.
- MUZIO, M., A.M. Chinnaiyan, F.C. Kischkel, K. O'Rourke, A. Shevchenko, J. Ni, C. Scaffidi, J.D. Bretz, M. Zhang, R. Gentz, M. Mann, P.H. Krammer, M.E. Peter et V.M. Dixit. 1996. «FLICE, a Novel FADD-homologous ICE-CED-3-like Protease, is Recruited to the CD95 (Fas/APO1) Death-inducing Signaling Complex». Cell, vol.85, p.817-828.
- NEWMAN, S.L., J.E. Henson et P.M. Henson. 1982. «Phagocytosis of Senescent Neutrophils by Human Monocyte-derived Macrophages and Rabbit Inflammatory Macrophages». Journal of Experimental Medicine, vol. 156, p.430-442.
- NICTO, M., M.A. del Pozo et F. Sanchez-Madrid. 1996. «Interleukin-15 Induces Adhesion Receptor Redistribution in T Lymphocytes». European Journal of Immunology, vol. 26, p.1302-1307.
- OLSNES, S., F. Stirpe, K. Sandvig et A Pihl. 1982. «Isolation and Characterization of Viscumin, a toxic Lectin from *Viscum album L.* (Mistletoe)». The Journal of Biological Chemistry, vol.257. no.22, p.13263-13270.
- PERICLE, F., J.H. Liu, J.I. Diaz, D.K. Blanchard, S. Wei, G. Forni et J.Y. Djeu. 1994. «Interleukin-2 Prevention of Apoptosis in Human Neutrophils». European Journal of Immunology, vol. 24, p. 440-444.
- REN, Y. R.L. Silverstein, J. Allen et J. Savill. 1995. «CD36 Gene Transfer Confers Capacity for Phagocytosis of Cells Undergoing Apoptosis». Journal of Experimental Medicine, vol. 181, p. 1857-1862.
- REN, Y., et J.S. Savill. 1995. «Proinflammatory Cytokines Potentiate Thrombospondin-mediated Phagocytosis of Neutrophils Undergoing Apoptosis». Journal of Immunology, vol. 154, no. 5, p.2366-2374.
- RENNIE, D.P., A.M. McGregor, J. Wright, A.P. Weetman, R. Hall et P. Thorpe. 1983. «An Immunotoxin of Ricin A Chain Conjugated to Thyroglobulin Selectively Suppresses the Antithyroglobulin Autoantibody Response». Lancet, vol.2, no.8363, p.1338-1340.
- RÉVILLARD, J.-P. 1998. Immunologie. 3^eédition. Paris : De Boeck & Larcier, 461p.
- ROBB, R.J., et W.C. Greene. 1987. «Internalization of Interleukin 2 is Mediated by the Beta Chain of the High-affinity Interleukin 2 Receptor». Journal of Experimental Medicine, vol. 165, p. 1201-1206.
- ROIT, I., J. Brostoff et D. Male. 1997. Immunologie. Traduit de l'anglais par J.-P. Révillard et W.H. Fridman. 4^eédition. Paris : De Boeck & Larcier, 406p.
- RUOSLAHTI, E. 1991. «Integrins». Journal of Clinical Investigation, vol. 87, p.1-5.

- SANDVIG, K. et B. van Deurs. 1996. «Endocytosis, Intracellular Transport, and Cytotoxic Action of Shiga Toxin and Ricin». Physiology Review, vol. 76, no. 4, p. 949-966.
- SANDVIG, K. et B. van Deurs. 1999. «Endocytosis and Intracellular Transport of Ricin : Recent Discoveries». FEBS Letter, vol. 452, no. 1-2, p. 67-70.
- SAVILL, J. et C. Haslett. 1995. «Granulocyte Clearance by Apoptosis in the Resolution of Inflammation». Cell Biology, vol. 6, p.385-393.
- SAVILL, J., I. Dansfield, N. Hogg et C. Haslett. 1990. «Vitronectin Receptor Mediated Phagocytosis of Cell Undergoing Apoptosis». Nature, vol. 343, p.170-173.
- SAVILL, J., N. Hogg, Y. Ren et C. Haslett. 1992. Thrombospondin Cooperates with CD36 and the Vitronectin Receptor in Macrophage Recognition of Neutrophils Undergoing Apoptosis». Journal of Clinical Investigation, vol. 90, p.1513-1522,
- SAVILL, J.S., A.H. Wyllie, J.E. Henson, P.M. Henson et C. Haslett. 1989. «Macrophage Phagocytosis of Aging Neutrophils in Inflammation». Journal of Clinical Investigation, vol 83, p. 865-875.
- SAVILL, J.S., P.M. Henson et C. Haslett. 1989. «Phagocytosis of Aged Human Neutrophils by Macrophages is Mediated by a Novel "Charge sensitive" Recognition Mechanism». Journal of Clinical Investigation, vol. 84, p.1518-1527.
- SAWYER, D.W., G.R. Donowitz et G.L. Mandell. 1989. «Common Themes in Microbial Pathogenicity». Microbiological Reviews., vol. 53, p. 210-230.
- SEDER, R.A. 1996. «High-dose Il-2 and IL-15 Enhance the in vitro Priming of Naïve CD4⁺ T Cells for IFN-gamma but have Differential Effects on Priming for IL-4». Journal of Immunology, vol. 56, p.2413-2422.
- STAUNTON, D.E., M.L. Dustin, H.P. Erickson et T.A. Springer. 1990. «The Arrangement of the Immunoglobulin-like Domains of ICAM-1 and the Binding Sites for LFA-1 and Rhinovirus». Cell, vol. 61, p. 243-254.
- STERN, M., L. Meagher, J. Savill et C. Haslett. 1992. «Apoptosis in Human Eosinophils. Programmed Cell Death in the Eosinophil Leads to Phagocytosis by Macrophages and is Modulated by Il-5». Journal of Immunology, vol 148, p. 3542-3549.
- STIRPE, F., K. Sandvig, S. Olsnes et A. Pihl. 1982. «Action of Viscumin, a Toxic Lectin from Mistletoe, on Cells in Culture». The Journal of Biological Chemistry, vol.257, no. 22, p.13271-13277.
- STIRPE, F., L Barbieri, M.G. Batteli, M. Soria et D.A. Lappi. 1992. «Ribosome-inactivating Prtoeins from Plants: Present Status and Future Prospects». Bio/technology, vol. 10, p. 405-412.

- STOEVA, S., T. Maier, M.H. Soler et W. Voelter. 1999. «Carbohydrate Chains and Their Binding Sites in Mistletoe Lectin I». Polish Journal of Chemistry, vol.73, p.125-133.
- STRINGER, R.E., C.A. Hart et S.W. Edwards. 1996. «Sodium Butyrate Delays Neutrophil Apoptosis: Role of Protein Biosynthesis in Neutrophil Survival». British Journal of Haematology, vol. 92, p. 169-175.
- SUSIN, S., S.A. Susin, N. Zamzami, M. Castedo, E. Daugas, H.G. Wang, S. Geley, F. Fassy, J.C. Reed et G. Kroemer. 1997. «The Central Executioner of Apoptosis: Multiple Connections Between Protease Activation and Mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and Ceramide-induced Apoptosis». Journal of Experimental Medicine, vol.186, p.25-37.
- TAKEDA, Y., H. Watanabe, S. Yonehara, T. Yamashita, S. Saito et F. Sendo. 1993. «Rapid Acceleration of Neutrophil Apoptosis by Tumor Necrosis Factor- α ». International Immunology, vol. 5, p. 691-694.
- TANIGUCHI, T. 1995. «Cytokine Signaling Through Nonreceptor Protein Kinase». Science, vol. 268, p.251-255.
- THOMAS, L.T., R.I. Lehrer. 1988. «Human Neutrophil Antimicrobial Activity». Reviews of Infectious Diseases, vol. 10, supp. 2, p.S450-S456.
- THORNBERRY, N.A., H.G. Bull, J.R. Calaycay, K.T. Chapman, A.D. Howard, M.J. Kostura, D.K. Miller, S.M. Molineaux, J.R. Weidner, J. Aunins, et al. 1992. «A Novel Heterodimeric Cysteine Protease is Required for Interleukin-1 Beta Processing in Monocytes». Nature, vol. 356, p.768-774.
- TIMOSHENKO, A.V. et H.-J.Gabius. 1993. «Efficient Induction of Superoxide Release from Human Neutrophils by the Galactoside-Specific Lectin from *Viscum album*». Biological Chemistry Hoppe-Seyler, vol. 374, p. 237-243.
- TIMOSHENKO, A.V., S.N. Cherenkevich et H.-J. Gabius. 1995. «*Viscum album* agglutinin-induced Aggregation of Blood Cells and the Lectin Effects on Neutrophil Function». Biomedicine and Pharmacotherapy, vol 49, p.153-158.
- TROWBRIDGE, H.O. ET R.C. Emling. 1997. Inflammation : A Review of the Process. 5^e édition. Chicago : Quintessence Publinsing Co, 236p.
- VEDDER, N.B., J.M. Harlan. 1988. «Increased Surface Expression of CD11b/CD18 (Mac-1) is not Required for Stimulated Neutrophil Adherence to Cultured Endothelium». Journal of Clininal Investigation, vol.81, p.676-682.
- VEHMEYER, K., T. Hajto, K. Hostanska, S. Könemann, H. Löser, R. Saller et B. Wörmann. 1998. «Lectin-induced Increase in Clonogenic Growth of Haematopoietic Progenitor Cells». European Journal of Haematology, vol 60, p.16-20.

- WATSON, R.W.G., O.D. Rotstein, M. Jimanize, J. Parodo et J.C. Marshall. 1997. «Augmented Intracellular Glutathione Inhibits Fas-triggered Apoptosis of Activated Human Neutrophils». Blood, vol. 89, p.4175-4181.
- WATSON, R.W.G., O.D. Rotstein, A.B. Nathens et J.C. Marshall. 1997. «Neutrophil Apoptosis is Modulated by Endothelial Transmigration and Adhesion Molecule Engagement». Journal of Immunology, vol. 158, p.945-953.
- WHYTE, M.K.B., L.C. Meagher, J. MacDermot et C. Haslett. 1993. «Impairment of Function in Aging Neutrophils is Associated with Apoptosis». Journal of Immunology, vol. 150, p.5123-5134.
- WILKINSON, P.C. et F.Y. Liew. 1995. «Chemoattraction of Human Blood T Lymphocytes by IL-15». Journal of Experimental Medicine, vol.181, p.1255-1259.
- WILLIAM, R., G. Watson, A. O'Neill, A.E. Brannigen, R. Coffey, J.C. Marshall, H.R. Brady et J.M. Fitzpatrick. 1999. «Regulation of Fas Antibody Induced Neutrophil Apoptosis is Both Caspase and Mitochondrial Dependent». FEBS Letters, vol. 453, p. 67-71.
- WILLIAMS, A.F. 1991. «Out of Equilibrium». Nature, vol. 353, p. 473-474.
- YAMASHITA, K., A. Takahashi, S. Kobayashi, H. Hirata, P.W. Jr Mesner, S.H. Kaufmann, S. Yonehara, K. Yamamoto, T. Uchiyama et M. Sasada. 1999. «Caspases Mediate Tumor Necrosis Factor- α -Induced Neutrophil Apoptosis and Downregulation of Reactive Oxygen Production». Blood, vol. 93, no. 2, p. 674-685.
- YUAN, J., S. Shaham, S. Ledoux, H.M. Ellis et H.R. Horvitz. 1993. «The C.elegans Cell Death Gene ced-3 Encodes a Protein Similar to Mammalian Interleukine-1 β -converting Enzyme». Cell, vol. 75, p. 641-652.
- ZISKA, P., H. Franz. 1981. «Studies on the Interaction of the Mistletoe Lectin I with Carbohydrates». Experientia, vol.37, p.219.