

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
CENTRE – INSTITUT ARMAND FRAPPIER

« LES NEUTROPHILES HUMAINS EN CULTURE *IN VITRO*
PROLONGÉE »

Comportement en réponse aux Interleukines 4 et 15

Par

Théo STAFFORD R.

Bachelier en Science Biologique

Mémoire présenté pour obtenir le grade de

Master ès Sciences

Science expérimentale de la santé

Avril 2012

Ce Mémoire intitulé

« LES NEUTROPHILES HUMAINS EN CULTURE *IN VITRO* PROLONGÉE »

Comportement en réponse aux Interleukines 4 et 15

et présenté(e) par

Théo STAFFORD R.

a été évalué par un jury composé de

Mme. Isabelle PLANTE, présidente

M. Denis GIRARD, directeur de recherche

Mme. Isabelle PLANTE, examinatrice interne

Mme. Caroline GILBERT, examinatrice externe


Merci à mon directeur de recherche Denis Girard, pour m'avoir donné la chance de travailler sur un sujet novateur dans un laboratoire dynamique.

Merci, également à l'équipe du labo Girard, aux collègues du PRF, ainsi qu'aux joueurs de hockey de l'IAF pour leur présence et leur bonne humeur contribuant à créer un environnement de travail agréable.

Merci à ma conjointe Edilsys Carralero pour son soutien et ses encouragements.

RÉSUMÉ

Chez l'humain, les granulocytes polymorphonucléaires (PMNs) ou neutrophiles sont les cellules immunitaires les plus abondantes dans la circulation sanguine et forment la pierre angulaire de l'immunité innée. Ce sont des cellules de courte durée de vie qui entrent rapidement en apoptose dans les premières 24 heures suivant leur mise en culture *in vitro*. Dans un contexte *In vivo* et en condition homéostatique, les PMNs apoptotiques sont rapidement éliminés par les autres phagocytes. Toutefois, dans certaines situations, les PMNs apoptotiques ne sont pas convenablement reconnus et phagocytés, comme c'est le cas en culture *in vitro* purifiée où il n'y a pas présence d'autres phagocytes. Ainsi, les PMNs apoptotiques peuvent progresser vers le stade subséquent qu'est la nécrose secondaire. Dans cette étude, nous avons évalué les fonctions inflammatoires des PMNs humains maintenus en culture *in vitro* jusqu'à 48 heures et comparé leur réponse à celle de PMNs fraîchement isolés. Nous avons démontré que les PMNs cultivés préservent leur capacité à répondre aux signaux pro-inflammatoires, à adhérer sur un substrat cellulaire, ainsi qu'à suivre un gradient chimiotactique et transmigrer à travers une matrice de polycarbonate. Les fonctions antimicrobiennes, incluant la phagocytose et la production de radicaux oxygénés, sont également maintenues chez les PMNs cultivés et peuvent encore être potentialisées par des agonistes inflammatoires. Alors qu'il est bien connu que les PMNs apoptotiques perdent leurs capacités fonctionnelles, que la durée de vie de ces cellules, y compris leur fonction effectrices, peuvent être prolongées jusqu'à un certain point en les cultivants en présence d'agents anti-apoptotiques, il s'agit de la première étude démontrant que les PMNs humains demeurent biologiquement fonctionnel au terme d'une culture *in vitro* prolongée. Ces résultats sont en accord avec le concept selon lequel au moins une proportion de neutrophiles peuvent survivre plus longtemps qu'on le croyait auparavant.



Directeur de recherche



Étudiant

ABSTRACT

In humans, polymorphonuclear neutrophils (PMNs) are the most abundant immune cells in the bloodstream, forming the cornerstone of innate immunity. They possess a very short lifespan, undergoing spontaneous apoptosis within 24h when cultured *in vitro*. *In vivo* and under normal circumstances, once inflammation has been resolved, PMNs undergo apoptosis and are then recognized and eliminated by other phagocytes. However, in some situations, PMNs undergo secondary necrosis if not properly recognized by phagocytes; which is the case when they are cultured *in vitro*, since other cells are removed during isolation. Here, we focused on evaluating inflammatory functions of freshly isolated PMNs and comparing them to PMNs maintained in culture for up to 48h. We showed that *in vitro* cultured PMNs are still able to respond to inflammatory signals, adhere to cellular substrates, follow chemotactic gradients and transmigrate through a polycarbonate matrix. Anti-microbial activities such as phagocytosis and ROS production remain functional in cultured cells and these functions can still be potentiated by pro-inflammatory agonists. While it is well known that apoptotic PMNs lose their functional activities and that the lifespan of these cells, as well as their functionality, can be preserved to some degree by culturing them with anti-apoptotic cytokines, this is the first study to demonstrate that PMNs are biologically responsive during prolonged *in vitro* culture, consistent with the concept that at least a portion of PMNs can live longer than previously thought.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	II
ABSTRACT	II
LISTE DES TABLEAUX.....	V
LISTE DES FIGURES	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES.....	VII
INTRODUCTION.....	1
REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
Les neutrophiles, gardiens de l'immunité innée	4
Les cytokines « <i>gamma c users</i> »	7
interleukine-4.....	9
interleukine-15	10
La mort cellulaire programmée	11
Apoptose et nécrose primaire	11
La nécrose secondaire ou « après l'apoptose »	13
L'apoptose « spontanée » et la nécrose des neutrophiles	15
La pré-activation ou « priming »	17
Les neutrophiles en culture <i>in vitro</i> prolongée	22
vieillesse cellulaire ou pré-activation à long terme?	23
modulations phénotypiques et fonctionnalités	24
MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	29
Produits et anticorps	29
Isolement et incubation des neutrophiles.....	29
Lignée cellulaire	30
Évaluation de l'apoptose par cytologie et cytométrie en flux.....	30
Chimiotaxie et transmigration	30
Adhésion aux cellules A-549	31
Phagocytose	31

Déplétion des éosinophiles et des cellules nécrotiques	32
Production de réactifs oxygénés	33
Dégranulation	33
Analyses statistiques.....	33
RÉSULTATS	34
Adhésion sur un substrat cellulaire.....	35
Chimiotaxie et transmigration	36
Phagocytose	38
Production de réactifs oxygénés.....	39
Dégranulation	40
Réponse aux signaux anti-apoptotiques	42
DISCUSSION ET CONCLUSION	45
Les fonctions des neutrophiles âgés en culture	46
Adhésion	46
Chimiotaxie.....	48
Phagocytose.....	49
Production de ROS.....	50
Dégranulation.....	52
Réponse aux signaux anti-apoptotiques.....	54
Modulation phénotypique et pré-activation.....	55
Conclusions	57
BIBLIOGRAPHIE	59

LISTE DES TABLEAUX

<u>numéro</u>	<u>titre</u>	<u>pages</u>
TABLEAU I	Description des principales fonctions inflammatoires des neutrophiles humain.....	6
TABLEAU II	Les cytokines « <i>gamma c users</i> » et leurs effets.....	8
TABLEAU III	Effets de l'interleukine-4 sur les principales fonctions des neutrophiles humains.....	10
TABLEAU IV	Effets de l'interleukine-15 sur les principales fonctions des neutrophiles humains.....	11
TABLEAU V	Morphotypes des neutrophiles humains apoptotiques et nécrotiques.....	12

LISTE DES FIGURES

<u>numéro</u>	<u>titre</u>	<u>pages</u>
FIGURE 1 :	Représentation simplifiée de l'hématopoïèse.....	5
FIGURE 2 :	Famille des cytokines dépendantes du CD132.....	9
FIGURE 3 :	Apparence cytologique des neutrophiles humains en culture <i>in vitro</i>	16
FIGURE 4 :	Modèle de couplage entre les sérines-kinase et les tyrosines-kinases.....	19
FIGURE 5 :	Mécanismes de la flambée respiratoire lors de la pré-activation.....	21
FIGURE 6 :	Sous-population de neutrophiles en culture <i>in vitro</i> prolongée	34
FIGURE 7 :	Adhésion des neutrophiles sur un substrat cellulaire.....	35
FIGURE 8 :	Capacité chimiotactique et migratoire des neutrophiles agés.....	37
FIGURE 9 :	Phagocytose des globules rouges de mouton opsonisés.....	38
FIGURE 10 :	Production d'espèces réactives oxygénées par les neutrophiles agés.....	39
FIGURE 11 :	Exocytose des vésicules sécrétoires, des granules azurophiles et spécifiques..	41
FIGURE 12 :	Réponse des neutrophiles cultivés aux signaux anti-apoptotiques.....	43
FIGURE 13 :	Production d'IL-8 par les neutrophiles cultivés 24 à 72 heures.....	56

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES

ATP	Adénosine-triphosphate
CD	<i>Cluster of différenciation</i>
CMHII	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe 2
DAMP	<i>Damage-Associated-Molecular-Patern</i>
DC	Cellules dendritiques
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated-Kinase</i> (isotype 1 et 2)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
fMLP	Formyl-Méthionine-Leucine-Phénylalamine
GM-CSF	<i>Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt solution</i>
IL	Interleukine
IL-2R α	Sous-unité alpha du récepteur à l'IL-2
IL-15R α	Sous-unité alpha du récepteur à l'IL-15
IL-2/15R β	Sous-unités beta des récepteurs à l'IL-2 et l'IL-15
IL-10R(1/2)	Récepteur à l'IL-10 (sous-unités 1 et 2)
INF- γ	Interféron gamma
LDH	Lactate Déshydrogénase
LPS	Lipopolysaccharides
Lymphocytes Th	Lymphocytes T auxiliaires
M ϕ	Macrophages
MapK p38	<i>Mitogen-Activated-Protein-Kinase</i> p38
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NET	<i>Neutrophil Extra-cellular Trap</i>
P(40/47/67)phox	Phagosome-Oxydase (sous-unités de poids moléculaire 40, 47 et 67 kd)

PAMP	<i>Pathogen-Associated-Molecular-Patern</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline solution</i>
PE	Phycoérythrine
PKC	Protéine Kinase C
PMA	Phorbol-myristate-acetate
PMNs	granulocytes PolymorphoNucléaires (neutrophiles)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SCID	<i>Severe Combined Immuno Deficiency</i>
SRBC	<i>Sheep Red Blood Cells</i>
SVF	Sérum de veau fétal
Syk	<i>Spleen-Tyrosine-Kinase</i>
TNF- α	<i>Tumor-Necrosis-Factor alpha</i>
<i>γc users</i>	récepteurs aux cytokine utilisateurs de la chaine commune γ (gamma)

INTRODUCTION

Les Granulocytes polymorphonucléaires (PMNs) ou neutrophiles sont les cellules leucocytaires les plus abondantes dans la circulation sanguine et sont collectivement reconnues comme étant d'importants médiateurs de l'inflammation. Ce sont en effet les premiers arrivants aux sites inflammés où ils occupent un rôle de premier plan dans la lutte contre les infections bactériennes et fongiques; et sont également connus pour leur fonction de régulateurs de l'immunité innée via la sécrétion d'une panoplie de cytokines et chimiokines orchestrant la réponse inflammatoire subséquente. Le rôle central tenu par les neutrophiles au sein d'un focus inflammatoire implique donc que ces cellules soient soumises à une régulation étroite afin de limiter les effets délétères associés à une activation exacerbée et soutenue de leurs fonctions pro-inflammatoires. En ce sens, l'une des principales voies de régulation de l'homéostasie immunitaire repose sur *la mort cellulaire programmée* ou apoptose, et de nombreux signaux pro et anti-inflammatoires sont connus pour moduler la susceptibilité des cellules à ce mécanisme[1].

Les neutrophiles sont décrits depuis longtemps comme des cellules de courte durée de vie ayant atteint leur phase terminale de différenciation. Ils ne présentent que peu d'activités transcriptionnelles et sont incapables de se diviser. Dans la circulation sanguine, ces cellules se retrouvent en un état quiescent dit « naïf »; leurs fonctions effectrices sont alors très limitées et leur habileté à répondre à certains signaux est restreinte. La perception d'un premier signal par les neutrophiles « naïfs » potentialise leurs fonctions inflammatoires et module leur réponse aux signaux subséquents; on parle alors de cellules « activées ». Ultiment, la résolution de l'inflammation et le retour à l'homéostasie passe par l'apoptose des neutrophiles « activés ». Ainsi, le passage des neutrophiles de l'état « naïf » à l'état « activé » est traditionnellement reconnu comme un processus irréversible engageant irrémédiablement les neutrophiles dans une destinée apoptotique. Ceci étant dit, les neutrophiles entreprennent également un programme de mort cellulaire à l'état « naïf » dans la circulation sanguine afin de maintenir la population granulocytaire à un niveau homéostatique.

On considère désormais un autre état possible chez le neutrophile, qui se situe entre l'état « naïf » et l'état « activé », et que l'on nomme « pré-activé »[2]. Il s'agit d'un état pour lequel les neutrophiles ont perçu un premier signal qui, à lui seul, ne semble pas engendrer d'effets quelconque au niveau phénotypique et fonctionnel (signal pré-activateur), mais qui prépare en quelque sorte les cellules à répondre de façon différentielle aux signaux suivants

(signaux activateurs). Étant donné qu'en condition inflammatoire *in vivo*, les neutrophiles sont vraisemblablement soumis à une multitude d'événements de signalisation en simultanément, mais également séquentiellement, on suppose que le concept de « pré-activation » y tient un rôle central en dictant la façon dont les neutrophiles se comportent en réponse à ces signaux. Ainsi, l'ordre dans lequel les signaux seront perçus pourrait modifier la réponse des cellules au final, et dans cet optique, la conception traditionnelle selon laquelle les cellules « naïves » répondent toujours de telle façon à tel signal en devenant « activée » avant de se diriger vers l'apoptose, apparaît comme une vision limitée de ce qui se déroule en réalité dans un contexte *in vivo*.

Bien qu'il a été rapporté que les neutrophiles humains du sang périphériques auraient une durée de vie d'un peu plus de 5 jours en circulation *in vivo*[3], il est bien connu depuis longtemps qu'en culture *in vitro*, ces cellules meurent majoritairement dans les 48 heures suivants leur isolement, laissant moins de 5% de cellules vivantes au terme de 72 heures de culture. Les données dans la littérature suggèrent que les neutrophiles âgés en culture subissent des modifications d'ordre phénotypiques et fonctionnelles; notamment, l'acquisition de marqueurs associés aux cellules dendritiques ainsi que certaines fonctions attribuables aux cellules présentatrices d'antigènes[4-10]. Ces observations laissent entrevoir l'hypothèse que le retrait des neutrophiles de la circulation sanguine pourrait avoir l'effet d'un signal initiant le programme de mort cellulaire et qu'à mesure que les neutrophiles se dirigent vers cette finalité apoptotique, ils subiraient des modifications phénotypiques et fonctionnelles.

Toutefois, en raison de la courte demi-vie des neutrophiles, toutes les études portant sur les neutrophiles âgés en culture ont été effectuées en cultivant les cellules en présence de cocktails de cytokines anti-apoptotiques afin de prolonger la viabilité des neutrophiles et de pouvoir récupérer, au terme de la culture prolongée, une plus grande proportion de cellules vivantes pour procéder aux expérimentations. Ce qui en ressort est qu'on ne peut déterminer si les modulations observées sont dues au vieillissement en culture ou aux effets d'activation par les cytokines. De plus, la majorité de ces études se penchaient sur l'acquisition de nouveaux phénotypes et de nouvelles fonctionnalités, tandis que peu d'études se sont consacrées à évaluer si les neutrophiles âgés en culture préservent les propriétés inflammatoires des neutrophiles fraîchement isolés.

Nous avons donc tentés dans cette étude d'évaluer le comportement inflammatoire des neutrophiles isolés du sang humain et cultivés *in vitro* pour des périodes de 24 à 72 heures en absence de tous signaux exogènes afin de vérifier si les neutrophiles maintiennent leurs fonctions inflammatoires à mesure qu'il se dirigent vers l'apoptose spontanée. Un autre aspect

de notre étude était d'évaluer les fonctions inflammatoires des neutrophiles cultivés en réponse à des signaux bien connus, en l'occurrence les interleukines (IL)-4 et IL-15, deux agonistes puissants des neutrophiles retrouvés en condition inflammatoire et reconnus pour avoir des implications dans des maladies inflammatoires chroniques telle que l'arthrite rhumatoïde.

L'objectif de cette étude était donc d'évaluer les principales fonctions inflammatoires des neutrophiles humains maintenus en culture *in vitro* prolongée avec comme hypothèse que les cellules maintiennent leurs propriétés inflammatoires à mesure qu'elles progressent dans leur cheminement vers la mort programmée. Les fonctions inflammatoires qui incluaient l'adhésion sur un substrat cellulaire, la chimiotaxie et la transmigration, la phagocytose, la production de réactifs oxygénés, la dégranulation, ainsi que la susceptibilité aux signaux anti-apoptotiques; ont toutes été évaluées en réponse aux IL-4 et IL-15. Notre hypothèse à cet égard était que le vieillissement des neutrophiles en culture *in vitro* consisterait en soit à une forme de pré-activation modifiant à la hausse ou à la baisse la réponse des cellules aux IL-4 et IL-15 en regard aux fonctions évaluées.

REVUE DE LITTÉRATURE

Les neutrophiles, gardiens de l'immunité innée

Les neutrophiles sont également appelés granulocytes polymorphonucléaires (PMNs) en raison de la forme typique de leur noyau polylobé et de la composition de leur cytoplasme qui renferme de nombreuses vésicules nommées granules. Issues de la lignée myéloïde, les granulocytes matures et leurs précurseurs forment environ 60% de la totalité des cellules nucléées dans la moelle osseuse et la circulation sanguine. Étant donné que les autres granulocytes, à savoir les éosinophiles et les basophiles, ne représentent qu'approximativement 1% à 5% de la population granulocytaire, les neutrophiles sont donc les cellules immunes les plus abondantes dans la circulation sanguine chez l'humain.

La production et la maturation des cellules sanguines, un processus nommé hématopoïèse, se déroule au niveau de la moelle osseuse (figure 1); les neutrophiles en devenir y sont répartis en trois populations : le bassin de cellules souches, constitué de cellules souches hématopoïétiques non différenciées, le bassin mitotique constitué de progéniteurs granulocytaires en phase de prolifération et de différenciation, et finalement, le bassin post-mitotique qui est constitué de neutrophiles pleinement mature en phase terminale de différenciation et prêts à être relâchés dans la circulation.

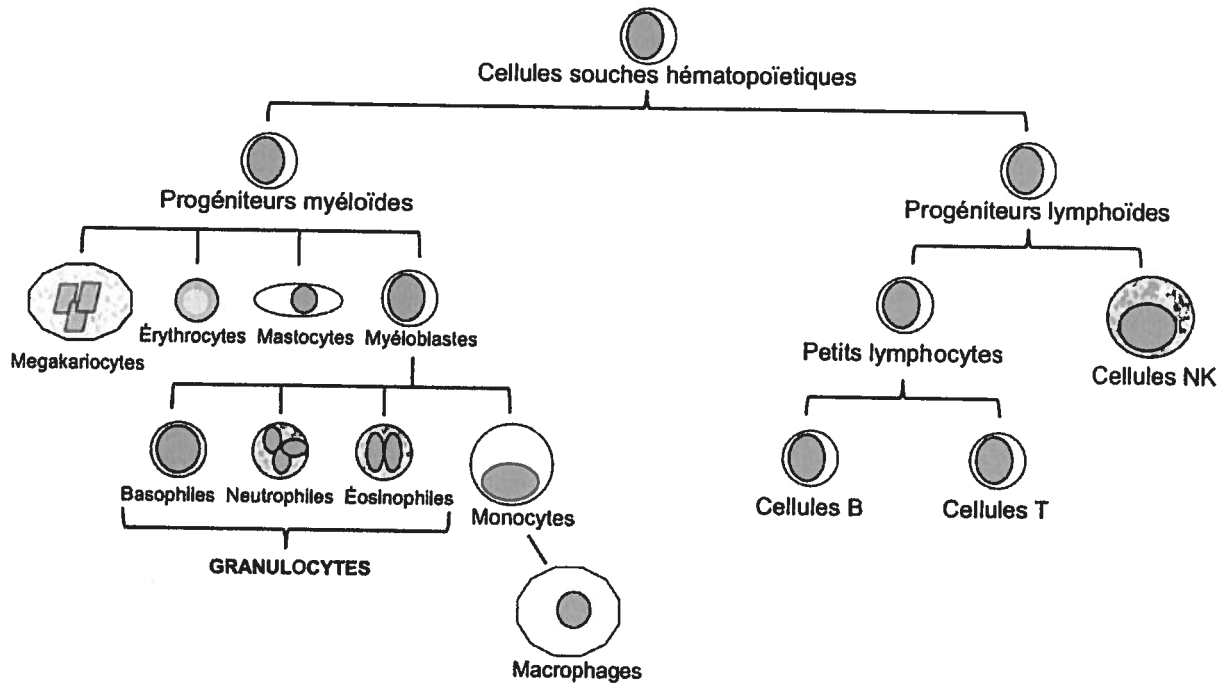


FIGURE 1 : Représentation simplifiée de l'hématopoïèse, processus qui génère la totalité des cellules du sang. Les granulocytes, dont font partie les neutrophiles, sont dérivés des précurseurs myéloïdes.

Il est estimé que les neutrophiles sont produits à un taux de 50 à 100 milliards de cellules par jour avec un délai de transition dans le bassin post-mitotique d'approximativement 4 à 6 jours[11, 12]. À la suite de quoi, les neutrophiles migrent vers les vaisseaux sanguins où il est convenu que leur demi vie ne dépasse pas les 6 à 8 heures. Cette courte durée de vie est principalement dédiée à la défense envers les microorganismes. En l'occurrence, le large éventail de fonctions inflammatoires et d'activités anti-microbiennes dont les neutrophiles disposent pour lutter contre les pathogènes leur confère un fort potentiel histotoxique qui explique la régulation étroite de leur production, de l'activation de leur fonction effectrices et de leur durée de vie.

Dans la circulation sanguine et en condition homéostatique, les neutrophiles se retrouvent dans un état quiescent dit « naïf ». Suivant une atteinte à l'intégrité de l'organisme, qu'elle soit d'origine physique ou pathogénique, émaneront du site d'agression des signaux de type DAMP (*Damage Associated Molecular Patern*) ou PAMP (*Pathogen Associated Molecular Patern*). De tels signaux auront pour effet d'activer les neutrophiles, leur permettant d'exprimer les molécules d'adhésion cellulaire nécessaires pour interagir avec l'endothélium vasculaire afin d'y adhérer et de traverser la barrière endothéliale pour migrer vers le site inflammatoire suivant un gradient chimiotactique. Bien que l'arme principale des neutrophiles pour lutter contre les pathogènes soit la phagocytose, l'exocytose de leurs granules intracellulaires est également un

processus primordial pour la clairance des microorganismes en libérant des composés microbicides tels que des radicaux oxygénés et des protéases. Subséquemment à l'élimination des pathogènes, les neutrophiles activés se dirigent vers la mort cellulaire programmée et sont éliminés par phagocytose par d'autres phagocytes, notamment les macrophages[13].

Les principales fonctions inflammatoires des neutrophiles humains évaluées dans cette étude sont résumées dans le tableau I.

Tableau I : Description des principales fonctions inflammatoires chez les neutrophiles humains.

Fonctions	description
Adhésion sur un substrat cellulaire	Permet aux neutrophiles d'adhérer à l'endothélium vasculaire afin de quitter la circulation sanguine et de migrer vers les tissus
Chimiotaxie et transmigration	Capacité à suivre un gradient moléculaire et à traverser une matrice (extravasation) pour atteindre le site inflammé
Phagocytose	Capture et ingestion des microorganismes
Production de réactifs oxygénés	Permet la digestion et l'élimination des microorganismes ingérés
Exocytose des granules	Participe à la destruction des microorganismes et permet la dégradation de la matrice extracellulaire lors de l'extravasation
Susceptibilité aux signaux anti-apoptotiques	Capacité à répondre aux signaux extracellulaires qui retarde la progression vers la mort cellulaire programmée

Toutes ces fonctions peuvent être potentialisées par des molécules signalétiques. L'activation de ces fonctions ainsi que la décision des cellules de se diriger ou non vers la mort cellulaire programmée dépend donc de l'ensemble des signaux que les neutrophiles perçoivent.

Les cytokines « *gamma c users* »

Le système immunitaire est régulé par une multitude de signaux émanant de l'environnement. En effet, ayant pour rôle de protéger l'organisme des agressions externes, les cellules immunitaires ont la capacité de reconnaître et de répondre à de nombreux signaux exogènes, incluant les composés d'origines microbiens et les xénobiotiques. Afin de maintenir l'homéostasie immunitaire et de coordonner tous les acteurs de l'immunité, le système immunitaire comporte également son propre arsenal de molécules signalétiques endogènes que l'on regroupe sous l'appellation de cytokines. Ces peptides signalétiques de faible poids moléculaire peuvent réguler de nombreuses fonctions biologiques et cibler des types cellulaires variés. Ces cytokines sont classées dans quatre grandes familles : les hématopoïétines, les interférons, les chimiokines et la famille des facteurs de nécrose tumorale (TNF).

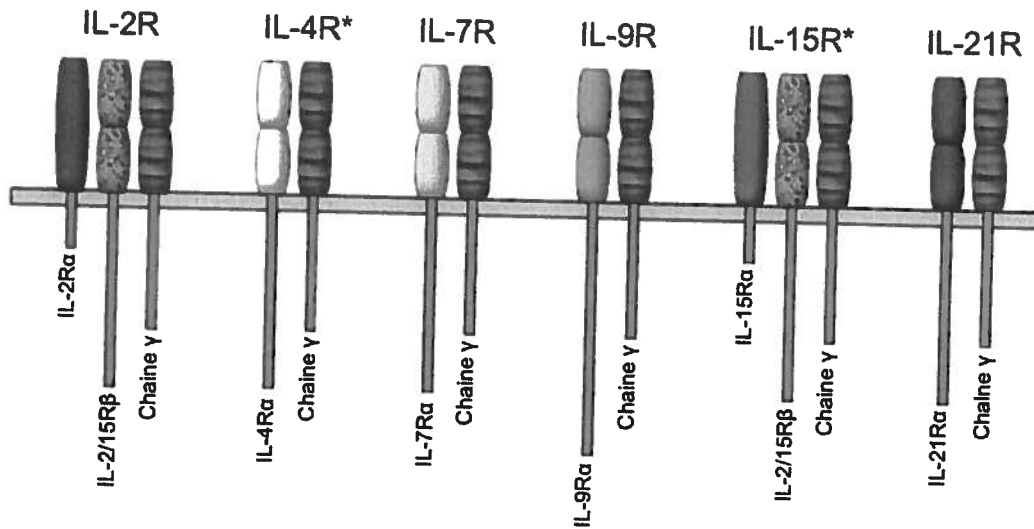
Parmi les hématopoïétines, l'on retrouve une sous-famille de cytokines bien connue que l'on nomme « cytokines dépendantes de la chaîne commune gamma (γ) »[14]. Ces cytokines, appelées également « *γc users* », sont des interleukines partageant une sous-unité commune de leurs récepteurs, la chaîne gamma (CD132). Cette chaîne est impliquée dans la transduction du signal (figure 2). Toutes ces cytokines sont principalement pro-inflammatoires et participent à la majorité des processus immunitaires tel que présenté dans le tableau suivant.

Tableau II : Les Interleukines (IL) « *gamma c users* » présentés selon leurs principales sources de production, les cellules ciblées et une description sommaire de leur effets.

Cytokine	source	cibles et effets
IL-2[15, 16]	Lymphocytes T activés	Prolifération des lymphocytes T et B, activation et prolifération des cellules NK
IL-4[17, 18]	Lymphocytes T activés Mastocytes	Favorise la différenciation des lymphocytes Th2
IL-7[19]	Cellules épithéliales	Activation des monocytes/macrophages, régule la maturation et l'homéostasie des lymphocytes T
IL-9[20]	Lymphocytes Th2 activés	Facteur de croissance des mastocytes et des lymphocytes
IL-15[21, 22]	Monocytes/macrophages Cellules dendritiques Types cellulaires variés	Maturation et activation des cellules NK, retarde l'apoptose
IL-21[23]	Lymphocytes T activés	Activation des lymphocytes T, régule la production d'immunoglobulines

Le fait qu'une simple mutation au niveau de la chaîne gamma (CD132) entraîne conséquemment une immunodéficiences majeure affectant tous les processus immunitaires que l'on désigne « SCID » (*Severe Combined Immuno Deficiency*)[24], témoigne de l'importance cruciale du CD132 et de la signalisation par les cytokines « *gamma c users* » pour le fonctionnement adéquat du système immunitaire.

En ce qui a trait aux neutrophiles, il a été démontré que ces derniers, à l'état naïf, n'expriment pas le récepteur de haute affinité pour l'IL-2 composé des sous-unités IL-2R α (CD25), IL-2/15R β (CD122) et de la chaîne gamma (CD132), mais plutôt un récepteur d'affinité intermédiaire composé du CD122 et du CD132[25]. Les neutrophiles non activés n'expriment également pas les sous-unités α des récepteurs aux interleukines 7, 9 et 21[26-28].



* Exprimé chez les neutrophiles humains

FIGURE 2 : Famille des récepteurs aux cytokines dépendantes de la sous-unité commune CD132 (chaîne γ). Les neutrophiles humains non activés expriment uniquement les récepteurs de haute affinité pour les interleukines 4 et 15.

Ainsi, seuls les interleukines 4 et 15 sont reconnues comme étant de puissants agonistes chez les neutrophiles humains[27, 29, 30]. Ces deux cytokines sont retrouvées en condition inflammatoire et ont la propension de potentialiser de nombreuses fonctions effectrices chez les neutrophiles.

interleukine-4

Cette cytokine a été identifiée comme un agoniste des neutrophiles pour la première fois en 1989[29], mais ce n'est que plus tard qu'il fut démontré que les neutrophiles exprimaient bel et bien la sous-unité alpha du récepteur à l'IL-4 qui, combiné au CD132, forme le récepteur de haute affinité pour cette cytokine[31]. Ces effets sur les neutrophiles humains sont présentés dans le tableau III.

TABEAU III : Effets de l'Interleukine-4 sur les principales fonctions des neutrophiles humains

Fonctions	effets
Adhésion sur un substrat cellulaire	augmente l'adhésion sur les cellules épithéliales A-549[32]
Phagocytose	augmente la réponse phagocytaire envers les globules rouges de mouton et les bactéries opsonisé(e)s[32]
Production de réactifs oxygénés	sans effets à elle seule, mais augmente la réponse au fMLP (effet de pré-activation)[29]
Exocytose des granules	sans effets à elle seule, mais augmente la réponse au fMLP (effet de pré-activation)[29]
apoptose	retarde l'apoptose[31], effet synergique en combinaison avec d'autres médiateurs anti-apoptotiques

L'interleukine 4 est aussi connue pour induire en autres chez les neutrophiles un réarrangement du cytosquelette, un synthèse *de novo* de protéines[31], ainsi que la phosphorylation des intermédiaires signalétiques au niveau de leurs résidus tyrosine; notamment les protéines Syk, mapK p38 et ERK-1/2[33].

interleukine-15

Les neutrophiles expriment le récepteur à l'IL-15 composé de trois sous-unités : l'IL-15R α , le CD122 (partagé avec le récepteur à l'IL-2) et le CD132 (γ c). À l'instar de l'IL-4, cette cytokine induit chez les neutrophiles des changements morphologiques, une synthèse *de novo* d'ARN et de protéines, ainsi que la phosphorylation des kinases Syk, p38 et ERK[34]. D'autres effets agissant sur les fonctions inflammatoires des neutrophiles, pour la plupart redondants avec l'IL-4, sont présentés dans le tableau IV.

TABEAU IV : Effets de l'interleukine-15 sur les principales fonctions des neutrophiles humains

Fonctions	effets
Adhésion sur un substrat cellulaire	augmente l'adhésion sur les cellules épithéliales A-549[35]
Phagocytose	augmente la réponse phagocytaire envers les globules rouges de mouton[32, 36]
Production de réactifs oxygénés	sans effets à elle seule[27], mais augmente la réponse au fMLP (effet de pré-activation)[30]
apoptose	retarde l'apoptose[36], effet synergique en combinaison avec d'autres médiateurs anti-apoptotiques

La mort cellulaire programmée

Tel que discuté précédemment, les neutrophiles sont les cellules leucocytaires les plus abondantes dans la circulation sanguine et sont collectivement reconnues comme étant d'importants médiateurs de l'inflammation. Le rôle central tenu par les neutrophiles au sein d'un foyer inflammatoire implique donc que ces cellules soient soumises à une régulation étroite afin de limiter les effets délétères associés à une activation exacerbée et soutenue de leurs fonctions pro-inflammatoires. En ce sens, l'une des principales voies de régulation de l'homéostasie immunitaire repose sur *la mort cellulaire programmée* ou apoptose, et de nombreux signaux pro et anti-inflammatoires sont connus pour moduler la susceptibilité des cellules à ce mécanisme[1].

Apoptose et nécrose primaire

Traditionnellement, l'apoptose fait référence au suicide cellulaire programmé; à une mort cellulaire « propre et silencieuse», régulée par des signaux intrinsèques ou extrinsèques, et faisant opposition à la nécrose, qui est une mort subite provoquée par des traitements

drastiques de nature physique ou mécanique. En somme, l'apoptose est un mécanisme façonné par l'évolution qui permet l'élimination rapide et non-phlogistique des cellules indésirables chez les métazoaires; alors que la nécrose est plutôt la conséquence d'une rupture de l'équilibre fonctionnel chez une cellule vivante, entraînant la relâche incontrôlée de son contenu intracellulaire, un processus qui est donc néfaste pour les cellules avoisinantes. Le tableau V résume les principaux caractères morphologiques associés à l'apoptose et la nécrose chez les neutrophiles humains[37].

TABLEAU V : Morphotypes des neutrophiles humains apoptotiques et nécrotiques

Apoptose	Intégrité membranaire conservée Cellules deviennent plus rondes et petites Bourgeoisements membranaires Fragmentation nucléaire Condensation intensive de la chromatine
Nécrose	Membrane endommagée Gonflement cytoplasmique et mitochondrial Pas de fragmentation nucléaire Condensation modérée de la chromatine

Chez les organismes multicellulaires, l'apoptose est donc un processus physiologique majeur d'élimination des cellules du soie, impliqué durant le développement embryonnaire; et nécessaire au cours de la vie adulte, pour le maintien de l'homéostasie tissulaire et immunitaire. Lorsqu'une cellule est isolée et stimulée par un signal pro-apoptotique en culture *in vitro*, s'en suit l'activation de voies signalétiques intracellulaires qui vise ultimement à perturber de façon irréversible toutes les fonctions cellulaires, rendant la cellule moins fonctionnelle. Outre les caractéristiques morphologiques associées à l'apoptose énumérés dans le tableau précédent, les modulations moléculaires accompagnant l'exécution du programme apoptotique comprennent en outre l'activation des protéases *cystéines/aspartates*, nommés caspases, qui clivent l'ADN et de nombreux intermédiaires intracellulaires; ainsi que l'expression à la membrane plasmique de signaux d'internalisation dits: « eat me », qui permettent la reconnaissance et la capture des cellules apoptotiques par les phagocytes « scavengers ». L'apoptose est donc décrite comme une mort cellulaire « active ». Elle dépend d'événements

signalétiques dédiés à cette fin, nécessite généralement un signal initiateur et rend les cellules susceptibles à être éliminée par phagocytose.

En contre partie, la nécrose est traditionnellement considérée comme une mort « passive » qui n'est pas attribuable à une signalétique précise. Toutefois, de plus en plus de données expérimentales tendent à démontrer que certains types de nécrose pourraient effectivement dépendre d'événements intracellulaires pré-programmés. Ce qui fait de la nécrose une autre forme de mort cellulaire « active »; on parle alors de *mort nécrotique programmée*[38, 39] avec de possibles implications physiopathologiques, notamment en condition inflammatoire.

La dichotomie entre « mort programmée » (apoptose) et « mort accidentelle » (nécrose) n'est donc plus aussi claire qu'auparavant alors que davantage d'études ont identifiées des types de mort cellulaire alternative. On peut désormais classifier les formes de mort cellulaire sous quatre catégories[39] : 1) l'apoptose classique telle que décrite précédemment, 2) la mort de type *apoptosis-like*, partageant certains critères de l'apoptose classique, mais souvent indépendante de l'activation des caspases, 3) la mort *necrosis-like* qui est une nécrose programmée régie par des voies de signalisation dépendantes ou non des caspases; et finalement 4) la nécrose accidentelle ou lyse cellulaire, qui est le résultat d'une perte de l'intégrité membranaire suite à une exposition à de hautes concentrations de détergents, d'oxydants ou d'autre agents cytotoxiques.

La nécrose secondaire ou « après l'apoptose »

La principale différence entre les cellules en apoptose et les cellules en nécrose est le maintien de l'intégrité membranaire lors de l'apoptose, ce qui permet une élimination rapide et sans dommage des cellules apoptotiques via la phagocytose. À l'opposé, les cellules nécrotiques ont la membrane endommagée et relâchent leur contenu cytoplasmique, potentiellement cytotoxique pour les cellules environnantes. Lorsque une cellule subit un traitement choc induisant une mort nécrotique, programmée ou non, on parle alors de nécrose primaire. Toutefois, les cellules en apoptose avancée qui ne sont pas éliminées par phagocytose, progressent alors vers un stade subséquent durant lequel il y a finalement rupture de la membrane : c'est la nécrose secondaire[37].

La clairance rapide des cellules apoptotiques, avant qu'elles n'atteignent le stade de nécrose secondaire, est donc un processus physiologique primordial pour le maintien de

l'homéostasie chez les organismes multicellulaires. Il ne s'agit toutefois pas d'un mécanisme infallible puisqu'il n'est pas autosuffisant. Il repose en effet sur la présence d'autres cellules, les phagocytes « scavengers », qui doivent être sur les lieux en quantité suffisante et fonctionnellement aptes à reconnaître et internaliser les cellules apoptotiques. Un manque d'expression des signaux « eat me » par les cellules apoptotiques pourrait empêcher leur capture par les « scavengers » et permettre ainsi la progression vers la nécrose secondaire. On sait que l'exposition à la membrane des cellules apoptotiques de nombreux signaux d'internalisation découle de l'activation des caspases[37, 40]. Ainsi, lors d'une apoptose indépendante des caspases ou lorsqu'au cours de l'exécution du programme apoptotique, l'activation des caspases effectrices se voit interrompue avant que ne survienne l'exposition des molécules « eat me », il ne pourra pas y avoir capture et élimination des cellules apoptotiques par les phagocytes « scavengers » même si ceux-ci sont présents en nombre adéquats[37]. En contre partie, les « scavengers » doivent également être habilités à reconnaître ces signaux d'internalisation. Une incapacité de ces cellules à percevoir et reconnaître les signaux « eat me » pourrait aussi expliquer la présence de cellules en nécrose secondaire *in vivo* en raison d'une défaillance du système de reconnaissance des cellules apoptotiques. La nécrose secondaire peut également survenir *in vivo* quand la quantité de cellules apoptotiques dépasse les capacités d'élimination des « scavengers ». C'est le cas lorsqu'il y a induction excessive d'apoptose durant une hyper-inflammation, ou au niveau de certains tissus comme le cartilage, faiblement vascularisés, où la disponibilité des phagocytes est limitée[41].

En dépit du caractère histotoxique et pro-inflammatoire des cellules nécrotiques, la présence de nécrose secondaire *in vivo* n'entraîne pas toujours des conséquences physiopathologiques. En effet, la clairance des cellules apoptotiques par les phagocytes est un processus d'élimination des cellules indésirables, silencieux et rentable pour l'organisme puisque cela permet le recyclage de diverses composantes cellulaires. Toutefois, comme il s'agit d'un mécanisme nécessitant de l'énergie, advenant que les cellules à éliminer ne présentent pas un danger pour l'organisme, l'exécution de ce processus entraînerait des dépenses énergétiques inutiles. Cette situation survient dans certaines régions physiologiques considérées comme le milieu externe tels que la lumière des tubes digestifs et respiratoires, des milieux où la présence des « scavengers » est limitée, mais où la libération du contenu cellulaire par les cellules nécrotiques est bien moins dommageable que dans les tissus et organes. Ainsi, la nécrose secondaire pourrait également être vue comme une forme d'auto-élimination passive des cellules mortes lorsque les mécanismes de reconnaissance et de clairance sont insuffisants, indisponibles ou superflus.

Quoi qu'il en soit, la transition du stade apoptotique au stade nécrotique n'est généralement pas une condition souhaitable pour l'organisme. Les principales conséquences pathologiques qui découlent de la relâche du contenu cellulaire par les cellules nécrotiques sont : 1) les dommages tissulaires engendrés par le potentiel cytotoxique des composantes intracellulaires, et 2) la capture par les cellules présentatrices d'antigènes des autoantigènes intracellulaires normalement inaccessibles, entraînant des réponses autoinflammatoires et autoimmunitaires[42-44].

L'occurrence de nécrose secondaire en raison d'un taux d'apoptose excessif a été observée *in vivo* au niveau d'organes solides tels que le foie[45] et le cœur[46] à la suite d'une ischémie. L'interruption du programme apoptotique menant à une transition vers la nécrose, avant l'exposition des signaux d'internalisation, a également été observée lors d'ischémie ou dans les régions où le faible afflux sanguin limite les disponibilités énergétiques. La grande dépendance en adénosine-triphosphate (ATP) pour l'exécution du programme apoptotique et l'externalisation des signaux « eat me » explique la présence de cellules en nécrose secondaire et leur accumulation due à l'absence de reconnaissance par les phagocytes au sein de tissus ou d'organes appauvris en oxygène et en glucose.

L'apoptose « spontanée » et la nécrose des neutrophiles

En ce qui a trait aux neutrophiles, l'apoptose est la principale voie d'élimination des cellules activées en condition inflammatoire et permet également le maintien du décompte granulocytaire dans la circulation sanguine à un niveau homéostatique. À l'instar des autres types cellulaires, l'apoptose des neutrophiles passe par les voies classiques bien décrites, incluant l'activation des caspases et l'exposition de signaux « eat me » tels que les phosphatidyl-sérines. La différence réside dans le fait que chez les neutrophiles, l'exécution du programme apoptotique ne nécessite pas de signal inducteur apparent. Bien entendu, les neutrophiles répondent significativement à de nombreux agents pro-apoptotiques connus, mais lorsque cultivés *in vitro*, malgré qu'on leur fournisse le milieu et les nutriments essentiels, ces cellules se dirigent rapidement vers la mort programmée en absence de tout inducteurs apoptotiques. En résulte une déplétion de plus de la moitié de la population cellulaire suivant les premières 24 heures de culture; un phénomène nommé : « apoptose spontanée ».

En raison du nombre important de neutrophiles présents au niveau d'un site inflammatoire et du caractère hautement cytotoxique de leur contenu intracellulaire, l'apoptose

de ces cellules suivi de leur élimination par phagocytose est donc une étape cruciale pour mener à terme la résolution de l'inflammation, en évitant les conséquences néfastes associées à la relâche incontrôlée de leur contenu cytoplasmique. En culture *in vitro*, les neutrophiles en apoptose conservent leur intégrité membranaire et comportent toutes les autres caractéristiques des cellules apoptotiques décrites dans le tableau V. Toutefois, dans une culture purifiée, comme il n'y a pas présence d'autres phagocytes, les neutrophiles apoptotiques ne sont pas éliminés et progressent donc avec le temps vers la nécrose secondaire. Un phénomène qui se traduit par un gain de perméabilité membranaire permettant la relâche de marqueurs de cytotoxicité cellulaire comme la lactate déshydrogénase (LDH), une enzyme normalement séquestrée au niveau des mitochondries.

On peut donc observer, en culture *in vitro*, trois morphotypes des neutrophiles correspondants aux cellules vivantes, aux cellules apoptotiques et aux cellules nécrotiques, tels qu'illustrés dans la figure 3.

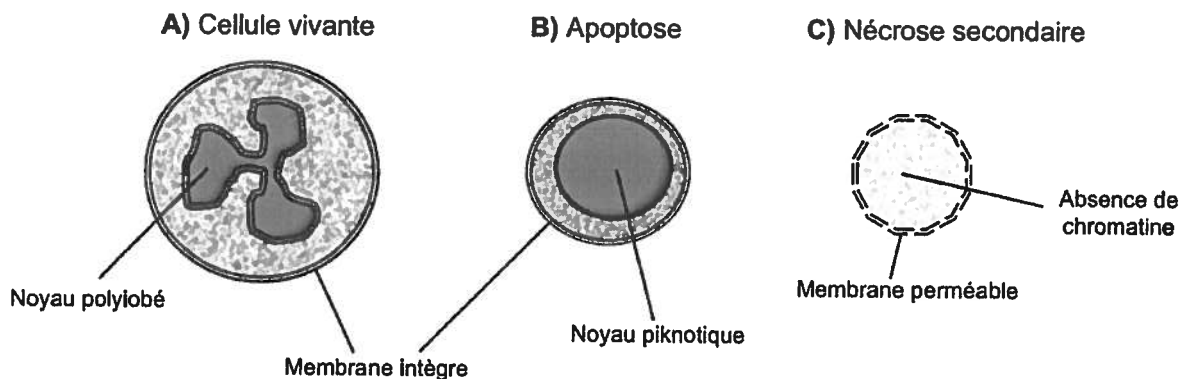


FIGURE 3 : Schéma représentant l'apparence cytotogique des neutrophiles humains en culture *in vitro*. A) neutrophile vivant avec noyau polylobé. B) neutrophile apoptotique, la cellule devient plus petite et le noyau devient diffus avec condensation de la chromatine, mais maintient de l'intégrité membranaire. C) neutrophile post-apoptotique en nécrose secondaire, la cellule devient amorphe, la chromatine est dégradée et le contenu cytoplasmique diffuse vers le milieu extracellulaire.

Les neutrophiles maintenus en culture *in vitro* se dirigent donc rapidement vers l'apoptose spontanée, suivant un mécanisme d'induction qui n'est pas élucidé; et progressent par la suite vers le stade suivant : la nécrose secondaire. La courte demi-vie des neutrophiles, qui s'explique par la nécessité de l'organisme de réguler étroitement la survie et l'activité de ces cellules afin de préserver l'homéostasie immunitaire, entraîne des taux d'apoptose de plus de 50% dès les premières 24 heures de culture. Dans les heures qui suivent, le nombre de cellules vivantes continue de diminuer au profit des cellules apoptotiques, puis nécrotiques; de sorte qu'au terme de 72 heures de culture, la presque totalité des neutrophiles auront atteints le stade

de nécrose secondaire. Cette cinétique de progression vers l'apoptose puis la nécrose en culture *in vitro* peut être, jusqu'à un certain point, accélérée ou retardée par des agents pro et anti-apoptotiques, mais ultimement, apparaît à tout point de vu irréversible. Par ailleurs, lorsque les neutrophiles sont précipités vers l'apoptose par des agonistes pro-apoptotiques, on parle alors plutôt d'apoptose induite. C'est un phénomène qui ne passe peut être pas par les mêmes mécanismes que l'apoptose spontanée.

Les mécanismes sous-jacents à l'induction de l'apoptose spontanée chez les neutrophiles demeurent à ce jour méconnus. Nous croyons qu'il est possible que ce ne soit pas la perception d'un signal quelconque qui induirait la mort cellulaire spontanée chez les neutrophiles, mais plutôt l'absence de perception d'un signal qui engagerait les cellules dans l'exécution du programme apoptotique. En effet, selon notre hypothèse, les cellules pourraient bien percevoir leur retrait de la circulation sanguine, que ce soit lors de leur isolation *in vitro* à partir d'une suspension de sang totale en laboratoire ou lorsqu'elles pénètrent dans les tissus pour atteindre le foyer inflammatoire *in vivo*; et ceci pourrait consister un signal en soi qui engagerait les neutrophiles à exécuter leur programme apoptotique dans les heures ou jours qui suivent. Ainsi, les cellules seraient en quelque sorte pré-activées pour mourir lorsqu'elles quittent la circulation sanguine, et peut être même dès l'instant où elles quittent la moelle osseuse. La pré-activation est un concept novateur, différent de la perception classique de l'activation des fonctions cellulaires chez les neutrophiles « naïfs », et dont les mécanismes sont décrits dans la section suivante.

La pré-activation ou « priming »

Les neutrophiles sont décrits depuis longtemps comme des cellules de courte durée de vie ayant atteint leur phase terminale de différenciation. Ils ne présentent que peu d'activités transcriptionnelles, sont incapable de se diviser et sont récalcitrants aux changements phénotypiques. Dans la circulation sanguine, ces cellules se trouvent dans leur état naïf; leurs fonctions effectrices sont alors très limitées et leur habileté à répondre à certains signaux est restreinte. La perception d'un premier signal par les neutrophiles naïfs potentialise leurs fonctions inflammatoires et module leur réponse aux signaux subséquents; on parle alors de cellules « activées ». Ultimement, la résolution de l'inflammation et le retour à l'homéostasie passe par l'apoptose des neutrophiles inflammatoires activés suivi de leur phagocytose par les autres phagocytes professionnels. Ainsi, le passage des neutrophiles de l'état naïfs à l'état

activés est traditionnellement reconnu comme un processus irréversible engageant irrémédiablement les neutrophiles dans une destinée apoptotique.

De nombreux agonistes des neutrophiles et leurs récepteurs respectifs ont été caractérisés au cours des dernières décennies. Ces études se sont penchées sur l'activation des fonctions inflammatoires des neutrophiles en réponse à une dose simple d'un seul signal. Or, tout en contribuant à l'approfondissement des connaissances sur les effets directs des agonistes du neutrophile sur ses fonctions et voies signalétiques, cette approche ne représente certes pas la réalité *in vivo* puisque les cellules, dans un contexte inflammatoire, seront soumises à des concentrations variées de plusieurs signaux, tant séquentiellement que simultanément. Ainsi, la perception d'un premier signal peut parfois moduler la susceptibilité ou la réponse des neutrophiles aux signaux subséquents sans nécessairement avoir un effet direct sur leurs fonctions; on parle alors d'une *pré-activation* ou « priming ».

L'on reconnaît donc désormais 3 états possibles aux neutrophiles : l'état *naïf*, l'état *pré-activé* et l'état *activé*. Dans son état pré-activé, la cellule peut être considérée comme « prête à partir », mais en attente d'un second stimulus afin d'éliciter une réponse. Si la transition entre l'état naïf et l'état activé a été largement étudié, le passage des cellules naïves à l'état pré-activées, puis activées est moins bien connu.

Certains agonistes du neutrophile sont connus pour être de bons agents de pré-activation alors que d'autres auront plutôt un effet *activateur*. En réalité, cette dichotomie n'est pas tout aussi clair puisqu'à basse concentration, un agent pourrait n'éliciter qu'une réponse trop faible pour activer les cellules, mais suffisante pour les pré-activer; tandis qu'à des concentrations plus élevées, le même agent peut devenir un puissant activateur. À noter également que les cytokines pléiotropiques, de par leur propension à moduler de multiples fonctions, auront tendance à avoir des effets activateurs sur certaines fonctions et pré-activateurs sur d'autres; et ce pour une même concentration.

Essentiellement, trois événements peuvent mener à la pré-activation d'une cellule : 1) l'expression des récepteurs membranaires, 2) la phosphorylation des protéines, et 3) l'assemblage de sous-unités pour former des enzymes actives[2, 47].

Dans le premier cas, il s'agit de la voie classique pour laquelle une cellule perçoit un signal qui module son activité transcriptomique, modifiant à la hausse ou à la baisse l'expression de marqueurs de surface. On peut penser par exemple à la réponse des neutrophiles à l'interleukine-10 (IL-10), un important agoniste anti-inflammatoire. Le récepteur à l'IL-10 (IL-10R) est un dimère constitué d'une chaîne de liaison au ligand, l'IL-10R1, et d'une sous-unité

accessoire, l'IL-10R2[48]. Dans leur état naïf, les neutrophiles n'expriment pas l'IL-10R1 et de ce fait, sont dans l'incapacité de répondre à cette cytokine. La perception de signaux pro-inflammatoires tels que les *lipopolysaccharides* (LPS) ou l'interleukine-4 (IL-4) aura pour effet d'une part, d'activer les fonctions effectrices inflammatoires des neutrophiles, et d'autre part, de permettre l'expression de l'IL-10R1 rendant ainsi les cellules susceptibles à l'IL-10. Les neutrophiles stimulés de la sorte sont donc *activés* en terme de fonctions pro-inflammatoires, mais peuvent également être considérés pré-activés pour répondre rapidement aux signaux anti-inflammatoires comme l'IL-10, qui seront présents lors de la phase de résolution de l'inflammation[48].

De nombreux signaux inflammatoires ont des effets redondants du fait qu'ils ont des voies signalétiques couplées via l'activation d'intermédiaires intracellulaires communs. Chez les animaux, deux types de kinases gèrent les événements de phosphorylation des facteurs de signalisation cellulaire : les tyrosine-kinase[49] comme *syk* (*Spleen Tyrosine Kinase*) et les sérine/thréonine-kinase-dépendantes du calcium telle que la PKC (Protéine Kinase C). Il est stipulé que l'activation de ces deux systèmes de phosphorylation est requise pour générer une réponse maximale et que certains intermédiaires signalétiques pourraient faire la jonction entre ces deux voies[47].

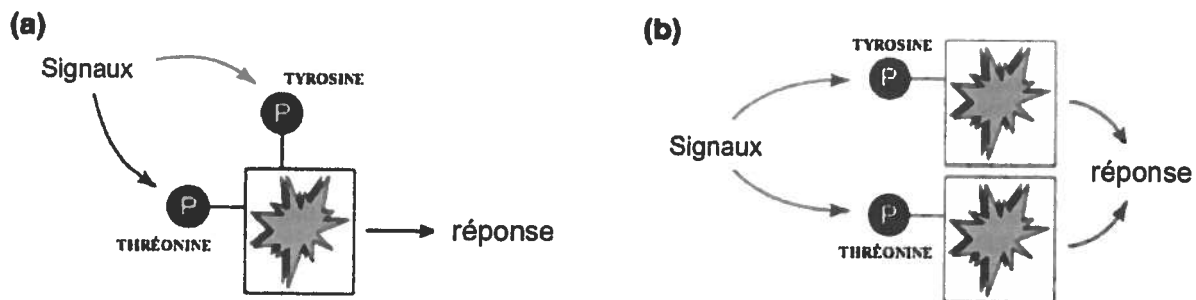


FIGURE 4 : Modèle de couplage entre l'activité des sérine/thréonine-kinases Ca^{2+} -dépendantes et la signalisation par les tyrosine-kinases lors de la stimulation des cellules. Les boîtes représentent des kinases dépendantes de la phosphorylation et les P représentent la phosphorylation au niveau des résidus tyrosine ou sérine/thréonine. (a) Une même sérine-kinase est régulée à la fois par l'activité des tyrosine-kinases et des sérines/thréonine-kinases pour éliciter une réponse. (b) Deux sérine-kinases sont régulés séparément, l'une par des tyrosines-kinases, l'autre par des sérine/thréonine-kinases et agissent en synergie sur la réponse en aval. Modifié de Hallet et al. 1995.

Les sérine-kinases pourraient bien être à l'origine du couplage entre les événements de phosphorylation puisque la régulation de leur activité est reconnue pour être dépendante à la fois des sérine/thréonine-kinases et des tyrosine-kinases (Voir figure 4). Ainsi, le modèle d'activation suggère que la phosphorylation des résidus sérine/thréonine au niveau des sérine-

kinases se produit sans que la phosphorylation maximale de leurs résidus tyrosines ne soit atteinte; et c'est ce qui pourrait être observé lorsque les cellules sont stimulées par de puissants activateurs ou par des agonistes à haute concentration. Toutefois, des signaux à basse concentration ou des agonistes reconnus comme n'ayant qu'un effet pré-activateur, les « pré-activateurs dédiés » (*dedicated primer*); ne pourraient que stimuler l'activité des tyrosine-kinases et seraient donc incapable de générer une réponse en soi en l'absence de la signalisation par le calcium. Enfin, lorsqu'une cellule pré-activée de cette façon reçoit un stimulus activateur, la phosphorylation des résidus tyrosines et sérines/thréonine atteint son niveau maximal et élicite une réponse subséquente plus importante[2].

L'un des mécanismes de pré-activation les mieux décrits est celui de la NADPH oxydase, l'enzyme responsable de la production des *espèces réactives oxygénées* (ROS). Ce système implique les trois événements requis pour la pré-activation d'une cellule. Par exemple, certains agents pré-activateurs peuvent faire augmenter les niveaux d'expression des récepteurs spécifiques à l'agoniste activateur comme c'est le cas pour le GM-CSF, le TNF- α et l'interleukine-15 qui sont décrits comme des agents pré-activateurs pour la production de ROS en réponse au fMLP via notamment une augmentation de l'expression à la membrane plasmique du récepteur au fMLP[47].

Les événements de phosphorylation y tiennent aussi un rôle important puisque certains agents pré-activateurs n'entraînent qu'une phosphorylation partielle de p47phox, une sous-unité du complexe NADPH oxydase dont le recrutement et la phosphorylation est cruciale pour l'activation de l'enzyme. Des expériences de mutagenèse ont en effet démontrés que p47phox était phosphorylée au niveau des résidus sérine 345 (Ser345) via la mapK ERK1/2 suivant un traitement au GM-CSF, alors que la même Ser345 est phosphorylée par la mapK p38 en réponse au TNF- α [47]. Ainsi, la sérine 345 de p47phox peut être considérée comme un site de pré-activation étant donné que différentes voies MAP kinases peuvent converger pour la phosphorylation de ce résidu et que la phosphorylation partielle de p47phox pourrait accélérer la phosphorylation d'autres sites induite par les agents activateurs, potentialisant ainsi davantage la génération de ROS par la NADPH[47].

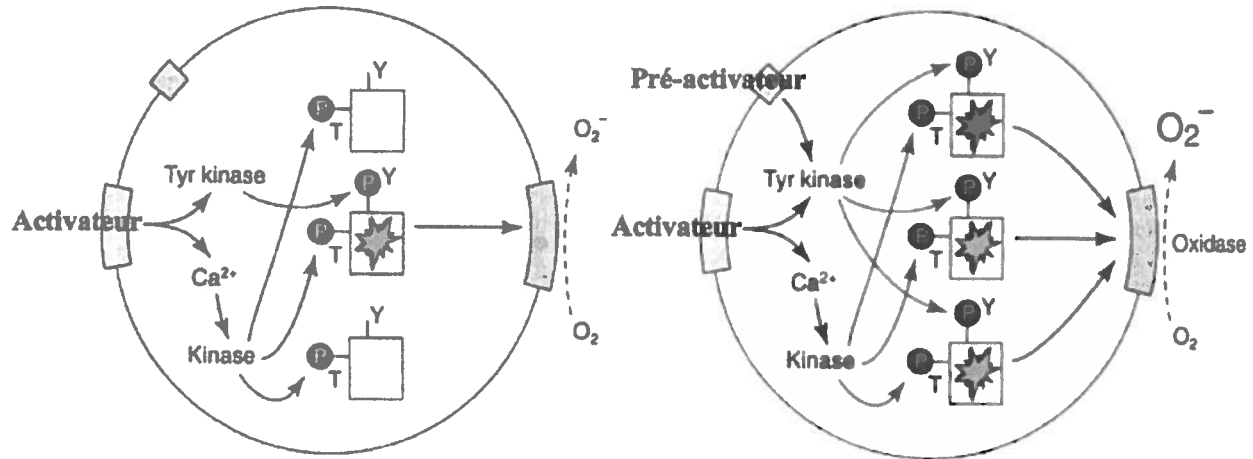


FIGURE 5 : Modèle de cellules « activée » pour la *flambée respiratoire* de façon classique (à gauche), et « activée » à la suite d'une « pré-activation » (à droite). La cellule de gauche reçoit un stimulus *activateur* qui entraîne la phosphorylation des résidus sérine/thréonine (T) sans que la phosphorylation maximale des tyrosines (Y) ne soient atteinte. La cellule de droite a été, préalablement à son activation, *pré-activée* par un « primer » qui a entraîné la phosphorylation des tyrosines sans activation des sérine/thréonine-kinases. Lors du stimulus subséquent, les kinases responsables de la régulation de la NADPH oxydase auront davantage de sites phosphorylés et engendreront une production plus importante d'anions superoxydes. Modifié de Hallet et al. 1995.

La phosphorylation des sous-unités de la NADPH comme p47phox ou p67phox entraîne les modifications de conformation nécessaires pour leur recrutement et leur assemblage à la membrane plasmique en association avec le flavocytochrome b₅₅₈[47]. Chez les cellules naïves, les composantes du système NADPH oxydase se retrouvent répartie entre le cytosol, la membrane des granules et la membrane plasmique. Suivant l'activation des cellules, les granules fusionnent avec la membrane plasmique et les sous-unités cytoplasmiques sont phosphorylées et assemblées pour former le complexe enzymatique actif. Si certaines composantes telles que p47 et p67phox sont importantes pour l'activation de l'enzyme, d'autres comme p40phox ne sont que légèrement phosphorylées et, sans être requises pour l'activation de la NADPH, peuvent stimuler son activité[47]. Ainsi, selon les signaux perçus, le profil de phosphorylation et la disponibilité des sous-unités de l'oxydase pourraient être différent, entraînant la formation d'un plus large arsenal d'enzymes actives à la suite d'un second stimulus.

La pré-activation des neutrophiles par des agents chimiques exogènes ou endogènes en culture *in vitro* est donc un phénomène de plus en plus reconnu qui demandera davantage d'attention à l'avenir puisque cela se rapproche certainement de la réalité *in vivo*; à savoir que les neutrophiles en condition inflammatoire sont exposés à des concentrations croissantes d'une panoplie d'agonistes anti et pro-inflammatoires. Ainsi, les neutrophiles peuvent percevoir à la

fois des signaux qui disent « vas-y! » et des signaux qui disent « stop! », et c'est la séquence, la force et la concentration de ces signaux qui vont dicter la réponse des cellules. Nous avons par ailleurs démontrés à cet effet que le patron de phosphorylation des résidus tyrosines en réponse à l'interleukine-15 diffère selon que les cellules auront été préalablement pré-activées ou non par le GM-CSF (résultats non présenté). En somme, la pré-activation n'est pas un artefact de la culture *in vitro* et, malgré qu'elle soit difficile à évaluer, doit être prise en considération lorsque l'on s'intéresse au comportement des neutrophiles en réponse à ses agonistes de sorte qu'il ne sera pas étonnant que l'on identifie de nombreux autres agents de pré-activation dans le futur et que l'on décrive les effets du « priming » sur la majorité des fonctions du neutrophile.

Les neutrophiles en culture *in vitro* prolongée

Certaines données expérimentales *in vivo* suggèrent une durée de vie d'environ 5 à 7 jours pour les neutrophiles en circulation[3, 50]. Or, il est bien connu que les neutrophiles cultivés *in vitro* meurent en moins de 72 heures; c'est l'apoptose « spontanée ». On peut penser que ces différences entre les observation *in vivo* et *in vitro* découlent du fait que lors de l'isolation des cellules pour la culture *in vitro*, les neutrophiles « perçoivent » leur retrait de la circulation, et qu'un tel signal les préparent à enclencher leur programme apoptotique. Malgré que les mécanismes en cause dans ce processus ne soient pas encore élucidés et que les techniques d'isolation des cellules sont bien développées et reconnues collectivement comme n'activant pas les neutrophiles, on peut raisonnablement considérer que les neutrophiles isolés du sang périphérique sont en quelque sorte pré-activés pour mourir dès l'instant où ils se retrouvent dans un tube à essai.

De nombreux agonistes du neutrophile peuvent moduler sa susceptibilité à l'apoptose *in vitro*. Dans le cas où l'apoptose est accéléré par des agents pro-apoptotique, on ne parle plus d'apoptose spontanée, mais plutôt d'apoptose induite car l'inducteur pourrait très bien activer des voies apoptotiques différentes de celles en cause lors de l'apoptose spontanée et ne fait donc qu'exacerber un processus déjà entamé. Les stimuli anti-apoptotiques ont pour leur part la capacité d'augmenter jusqu'à un certain point la survie des cellules en culture, mais en somme ne font que retarder la progression vers l'apogée apoptotique qui semble inévitable. Ainsi, le cheminement des cellules vers leur destin apoptotique en culture *in vitro* est apparemment un phénomène irréversible.

Cependant, les neutrophiles en culture meurent progressivement en fonction du temps, et non simultanément; ce qui suggère une certaine hétérogénéité de la population des neutrophiles isolés en ce qui a trait à leur propension à entrer en apoptose spontanée. Maintenant, qu'est-ce qui distingue le neutrophile qui meure après 24 h de culture de celui qui n'entre en apoptose qu'au terme de 72 h de culture, considérant que les deux ont été isolés en même temps à partir d'un même donneur? Personne à ce jour n'est en mesure de répondre à cette question, mais si l'on considère que la mise en culture des cellules est en soi une sorte de signal engageant les neutrophiles dans un programme apoptotique; et que toutes les cellules de la culture auront vraisemblablement reçu ce signal en même temps, la cellule qui survie après 72 h est-elle encore fonctionnelle, a-t-elle acquise des changements phénotypiques, s'agit-il encore d'un neutrophile à proprement parler? Voilà encore autant de questions sans réponse, mais certaines données dans la littérature ont proposés quelques éléments de réponse au cours de la dernière décennie.

vieillesse cellulaire ou pré-activation à long terme?

Les observations expérimentales rapportent une altération des fonctions immunologiques chez les individus âgés[51], incluant une diminution de l'efficacité des neutrophiles dans leur lutte contre les infections en raison, entre autre, d'une modulation de leur susceptibilité à l'apoptose dû aux dysfonctions mitochondriales qui apparaissent avec le vieillissement[52]. Peu de données existent toutefois sur la fonctionnalité des neutrophiles âgés; on parle ici bien sûr de l'âge des cellules, à savoir le stade où ils se trouvent entre la fin de leur maturation et leur mort par apoptose.

On peut voir ce concept de deux façons : l'âge *in vivo*, c'est à dire le temps entre la sortie des neutrophiles de l'hématopoïèse et leur élimination par apoptose constitutive en circulation après 5 à 7 jours[3, 50]; et l'âge *in vitro* qui réfère au moment entre leur mise en culture et leur déplétion par apoptose spontanée qui survient dans les 72 heures. La relation entre les deux n'est pas claire et difficile à évaluer, mais pourrait bien exister. On peut stipuler que l'âge *in vivo* influe sur l'âge *in vitro* de façon telle que les neutrophiles plus avancés dans leur âge *in vivo* seraient plus susceptibles à l'apoptose en culture *in vitro* que les neutrophiles qui étaient plus « jeunes » au moment de leur isolation. Cependant, considérant que les neutrophiles auraient une durée de vie de plus ou moins six jours en circulation et que de nouvelles cellules sont générées quotidiennement, un individu sain devrait donc avoir une population hétérogène de

neutrophiles en terme d'âge *in vivo* dans son sang. De ce fait, ses neutrophiles les plus âgés pourraient mourir dans les 24 h suivant la mise en culture, ce qui est concordant avec les observations *in vitro*. Toutefois, la suspension de neutrophiles obtenue d'un tel individu devrait également contenir des cellules plus « jeunes » qui auraient la capacité de survivre au-delà de 4 jours en culture. Or, la totalité des neutrophiles meurent dans les 2 jours suivant l'isolation; ce qui indique que la relation entre l'âge *in vivo* et *in vitro* n'est pas aussi directe que l'on aurait pu penser. Il est possible que le signal engageant les neutrophiles dans leur programme apoptotique suivant leur retrait de la circulation sanguine soit inévitable, mais que les cellules plus « jeunes » y seraient plus récalcitrantes jusqu'à un certain point; repoussant de quelques heures leur irrémédiable destin. Quoiqu'il en soit, en l'absence de données concomitantes, l'on devra considérer l'âge *in vivo* et l'âge *in vitro* comme deux phénomènes distincts.

L'apoptose des neutrophiles est associée à la perte de pratiquement toutes les fonctions biologiques de ces cellules. En effet, les neutrophiles décrits comme étant apoptotique sur la base d'observations cytologiques de leur morphologie cellulaire et de leur affinité pour l'Annexin-V évaluée par cytométrie, démontrent une incapacité dans leur fonctions inflammatoire telles que la phagocytose, la dégranulation et la chimiotaxie[53]. Rien d'étonnant quand on sait que la plupart des fonctions des neutrophiles nécessitent une synthèse *de novo* d'ARNm et de protéines ainsi qu'un réarrangement du cytosquelette; et que les symptômes de l'apoptose incluent une fragmentation du matériel génétique accompagné d'un démantèlement du cytosquelette. Quand est-il toutefois en terme de fonctionnalités biologiques des neutrophiles en culture *in vitro* au cours de stades précédents l'apoptose ou lors des stades précoces suivant l'initiation du programme apoptotique?

modulations phénotypiques et fonctionnalités

Quelques études se sont penchées au cours des douze dernières années sur le devenir phénotypique des neutrophiles cultivés pour des délais prolongés. L'une des constantes observées couramment est l'apparition de marqueurs de cellules dendritiques (DC) accompagnés des modifications morphologiques associées à ce type cellulaire[4-8].

Oehler et al. ont démontrés que les précurseurs immédiats du stade final de différenciation des neutrophiles, les PMNp (polymorphonuclear precursors) qui sont des cellules auparavant considérées comme engagées de façon irréversible dans la lignée granulocytaire, pouvaient être redirigés vers une différenciation en cellules de type dendritiques suivant une

incubation de 9 jours en présence d'un cocktail de cytokine incluant le GM-CSF, l'interleukin-4 et le TNF- α [4]. Les cellules au terme de cette culture, exprimaient des marqueurs typiques de DCs tels que le CD1, le CMH de classe 2 et ses molécules de co-stimulation CD80 et CD86, ainsi que le CD40 et le CD83[4]. Ces « DC-dérivées de neutrophiles » avaient la capacité de présenter des antigènes solubles et stimuler les lymphocytes Th (une fonction qui est inexistante chez les PMN fraîchement isolés non activés) avec une efficacité de plus de 10 000 fois celle de monocytes fraîchement isolés. Ces cellules avaient également l'apparence de DCs avec des noyaux ronds et de nombreuses projections cytoplasmiques de sorte que les auteurs en ont conclu que ces « DC-dérivées de neutrophiles » ressemblaient de très près, en terme de fonctionnalités, d'expression de molécules de surface et de morphologie, à une population de « DC classique » [4].

Un autre groupe s'est intéressé à la propension des neutrophiles activés par des cytokines à stimuler la réponse immunitaire acquise. Ils ont eux aussi démontrés que les neutrophiles cultivés 24 heures en présence de GM-CSF, de TNF- α et d'INF- γ en dose simple ou en mixture exprimaient des marqueurs DCs[5]. Les effets seuls de chacune de ces cytokines entraînaient l'expression de différents marqueurs suggérant une hétérogénéité des neutrophiles activés selon les signaux qu'ils perçoivent. Par exemple, le GM-CSF induisait l'expression du CMH II et permettait aux neutrophiles de présenter des superantigènes, mais n'induisait pas l'expression de CD40 ou CD83. Lorsque stimulés par le TNF- α ou l'INF- γ , les neutrophiles exprimaient plutôt le CD83, mais pas le CD40 ni le CMH II. En combinaison, ces 3 cytokines entraînaient l'expression à la fois du CMH II, du CD40 et du CD83, tous d'importants marqueurs de cellules dendritiques[5]. Toutefois, aucuns des stimulants à eux seuls ou en mixture n'induisait l'expression de CD80 ou CD86, les molécules de co-stimulation b7.1 et b7.2, nécessaires pour la présentation antigénique. Il est tout de même reconnu que l'interaction du CD40 avec son ligand induit l'expression du CD86 chez les DCs[9] et on peut donc penser que ce mécanisme existe également chez les neutrophiles reprogrammés en « dendritic-like cells » par des cytokines pro-inflammatoires, générant ainsi des « DC-dérivés de neutrophiles » possédants la majorité des caractéristiques fonctionnelles des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles.

L'expression du CD83 et du CMH II ainsi que de d'autres marqueurs de DCs tels que CD64 et CD14 a également été observée chez les neutrophiles cultivés 48 heures en présence d'interleukine-15[6] et ces marqueurs avaient des niveaux d'expression plus bas chez les neutrophiles témoins, cultivés 48 heures en l'absence d'IL-15. Les taux d'apoptose n'ont pas été

évalués et, bien que l'IL-15 est connue pour retarder l'apoptose *in vitro*, la concentration utilisées (20ng/ml) n'a qu'un effet faible sur la susceptibilité des cellules à l'apoptose spontanée (rappelons que plus de 75 % des neutrophiles sont éliminés par apoptose en culture *in vitro* après 48 h en l'absence de signaux anti-apoptotiques forts) et l'on ne peut par conséquent savoir si c'est réellement l'IL-15 qui induit ces marqueurs ou si cela fait partie du programme apoptotique des neutrophiles pré-activés par la culture *in vitro*.

En ce sens, l'équipe de Park et al. a évalué l'expression des marqueurs de DCs chez les neutrophiles cultivés 24 heures en absence d'agonistes comparativement aux cellules cultivés avec des agents pro et anti-apoptotiques[8]. En analysant par cytométrie l'expression des marqueurs DCs CMH II, CD80, CD86, CD83 et CD40 en double marquage avec l'annexin-V, ils ont démontrés que ces molécules étaient exprimées fortement dans la population annexin-V positive (donc apoptotique), mais également dans la population annexin-V négative (cellules non-apototiques) dans une moindre mesure[8]. L'apoptose des neutrophiles est généralement accompagnée d'une perte du CD16 et les marqueurs DCs semblaient exprimés plus fortement chez la population CD16 négative, un phénomène exacerbé par les agents pro-apoptotiques suggérant que l'apparition des marqueurs DCs est une propriété du programme apoptotique des neutrophiles. Cependant, la stimulation des neutrophiles par des signaux anti-apoptotiques forts comme le GM-CSF entraînait également, au terme de 24 heures de culture, l'expression des certains marqueurs DCs et la répartition des cellules « DC-positives » était d'environ 50-50 entre les populations annexin-V positive et négative[8]. Ainsi il demeure incertain à savoir si l'expression de ces marqueurs DCs survient avant, pendant ou après que les cellules aient initié leur programme apoptotique.

S'il est collectivement reconnu qu'entre 1 et 5 % des neutrophiles cultivés *in vitro* en absence d'agonistes peuvent survivre au-delà des 48 heures; en présence d'agents anti-apoptotiques, le taux de survie se situe de 10 à 20 % après 72 heures, et peut atteindre les 30 % lorsque les agents anti-apoptotiques sont combinés. L'équipe de Chakravarti et al. s'est donc intéressés aux neutrophiles cultivés 72 heures en présence d'un mélange de GM-CSF, d'IL-4 et de TNF- α . Ils ont obtenus de cette façon de 8 à 17 % de neutrophiles survivants; une sous-population qu'ils ont dénommée : « neutrophiles de longue durée de vie » (*long-lived neutrophils*)[7]. Ils ont enrichie et isolé cette sous-population par centrifugation différentielle sur gradient de Percoll afin d'évaluer l'expression des marqueurs de surface et la fonctionnalité biologique de ces « *long-lived neutrophils* ». Ils ont dénoté une expression *de novo* du CMH de classe 2 et du CD80, et ont rapporté une augmentation de la production d'anions superoxyde en

réponse au *formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine* (fMLP), de l'index phagocytaire des particules de zymosan opsonisées et de l'adhésion aux fibroblastes[7]. Toutefois, la chimiotaxie et l'exocytose des granules primaires et secondaires présentaient une diminution par rapport aux cellules fraîches. Ces « *long-lived neutrophils* » représentaient donc un nouveau phénotype par rapport aux neutrophiles fraîchement isolés et démontraient que même les neutrophiles matures, autrefois considérés comme des cellules inchangeantes, étaient susceptibles d'acquies des modifications phénotypiques.

L'apparition des caractères morphologiques et fonctionnels associés aux DC chez les neutrophiles activés par des cytokines en culture *in vitro* semble être une constance et ne serait certes pas dépourvu de relevance physiologique advenant qu'un tel phénomène se produise également *in vivo*. Les neutrophiles, à titre de phagocytes professionnels et de premiers arrivants aux sites inflammatoires, peuvent ingérer de nombreux antigènes, il serait donc biologiquement pertinent que ces cellules puissent participer à l'élaboration d'une réponse acquise; la présentation antigénique par les neutrophiles activés *in vitro* est par ailleurs une fonction de plus en plus reconnue[10]. Maintenant, à savoir si des neutrophiles pourraient retourner dans la circulation sanguine après avoir infiltré les tissus et phagocytés des pathogènes pour ensuite migrer aux organes lymphatiques et effectuer la présentation antigénique à l'instar des DCs et M ϕ , cela demeure hypothétique. Selon les données disponibles à ce jour, il est sans doute plus probable que les neutrophiles ne peuvent quitter le site inflammatoire, que leur activation par des agonistes pro-inflammatoires les engage dans un destin apoptotique (même si à court terme un signal pro-inflammatoire est anti-apoptotique), et que si les neutrophiles ont bel et bien un rôle à jouer dans les processus de présentation antigénique, ils ne le feraient qu'accessoirement et directement sur place dans le foyer inflammatoire[54].

Quoiqu'il en soit, il appert que les précurseurs des neutrophiles peuvent être reprogrammés en cellules dendritiques et que les neutrophiles matures activés peuvent en acquies les caractéristiques. La nature hématopoïétique bivalente des DCs, à savoir si ce sont des cellules d'origines myéloïdes ou lymphoïdes (des observations appuient l'une et l'autre de ces hypothèses)[55] pourrait être un autre argument en faveur du caractère reprogrammable des neutrophiles en DCs.

En somme, il demeure difficile à déterminer si les modulations phénotypiques que subissent les neutrophiles au cours d'une culture *in vitro* prolongée sont associées au vieillissement cellulaire, font partie intégrante du programme apoptotique, ou ne sont que le

résultat de l'effet de reprogrammation par les cytokines anti-apoptotiques. De plus, il n'existe pas de données à savoir si les neutrophiles conservent leur fonctionnalité et leurs propriétés inflammatoires durant une culture prolongée avant que les cellules n'acquièrent les caractéristiques morphologiques propre aux cellules apoptotiques; ni si ces dernières préservent leur capacité à répondre aux agonistes pouvant potentialiser ces fonctions. En d'autres termes, reste à savoir si les neutrophiles âgés en culture *in vitro* demeurent des neutrophiles à proprement parler, et ce en regard à leur fonctions inflammatoires, leur réponse aux cytokines et leur marqueurs moléculaires

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Produits et anticorps

Les interleukines (IL)-4 et IL-15 recombinantes humaines purifiées, ainsi que le *granulocytes-macrophages colony-stimulating factor* (GM-CSF) humain recombinant, ont été obtenus de Prepo Tech Inc, tandis que l'IL-8 humaine recombinante a été fourni par R&D Systems.

Le *Phorbol-myristate-acetate* (PMA) et le *Formyl-methionine-leucine-phenylalanine* (fMLP) ont été achetés chez Sigma Aldrich. La Calcéine-AM et la sonde 5-(et-6)-Carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H2DCFDA) nous ont été fourni par la compagnie Molecular Probe.

Les immunoglobulines gamma (IgG) de souris dirigées contre les marqueurs humains CD35, CD63 et CD66b ont été obtenus chez BD pharmigen^{TD} tandis que les anticorps de chèvre anti souris conjugués au FITC provenaient de Cedarlane. Les IgG de lapins spécifiques aux érythrocytes de moutons (anti SRBC) étaient fourni par Sigma Aldrich.

Le milieu de culture cellulaire RPMI 1640, le sérum de veau fétal (SVF) ainsi que la trousse de marquage à l'annexin-V ont été achetés chez Invitrogen Life Technologies.

Isolement et incubation des neutrophiles

Les neutrophiles ont été isolés à partir du sang de donneurs sains et volontaires par une sédimentation sur dextran suivi d'une centrifugation sur Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences) tel que décrit précédemment[36, 56]. Les dons de sang ont été obtenus d'individus informés et consentants selon la procédure approuvée par l'institution. La viabilité cellulaire ($\geq 98\%$) a été évaluée par la méthode d'exclusion au bleu de Trypan et la pureté des cellules isolées ($\geq 98\%$) a été évaluée à partir de préparations cytologiques colorées avec la trousse de coloration cellulaire Hema 3 (Fisher Scientific).

Après l'isolement, les neutrophiles ont été resuspendus à une concentration de 1×10^6 cellules/ml dans du milieu de culture RPMI 1640 hepes et Pen/Strep supplémenté de 10% de

SVF, et ont été conservés dans des flacons de culture anti adhésifs à 37°C avec 5% de CO₂. À quatre moments suivant le début de l'incubation (30 minutes pour les cellules fraîches ou 24, 48 et 72 heures pour les cellules âgées), les neutrophiles ont été récoltés et suspendus à une concentration de 10 x 10⁶ cellules/ml dans du milieu frais afin d'évaluer leurs fonctions cellulaires.

Lignée cellulaire

Les cellules épithéliales carcinomiques humaines de la lignée A-549 ont été obtenues de American Type Culture Collection (ATCC) et maintenues dans du milieu RPMI 1640 avec hepes, antibiotiques et 10% SVF.

Évaluation de l'apoptose par cytologie et cytométrie en flux

Des échantillons cytocentrifugés de neutrophiles fraîchement isolés et âgés ont préparés à l'aide d'une centrifugeuse Cyto-tek (Miles Scientific) et colorés avec la trousse Hema 3. Les cellules ont été examinées au microscope à 40X et les neutrophiles apoptotiques étaient définis comme les cellules présentant des noyaux piknotiques typique.

Les taux d'apoptose ont également été évalués par cytométrie en flux à la suite du marquage des cellules avec l'annexin-V couplée au FITC. Brièvement, les cellules étaient lavées avec du PBS puis suspendu dans 100 µl de tampon de liaison à l'annexin-V auquel a été ajouté 1 µl d'annexin-V conjugué au FITC. Après une incubation de 15 minutes en absence de lumière, un volume de 400 µl de PBS froid a été ajouté à la suspension avant de procéder à l'analyse utilisant un cytomètre FACScan (BD Biosciences).

Chimiotaxie et transmigration

L'évaluation de ces fonctions s'est faite à l'aide d'une chambre de Boyden à quarante-huit puits (Neuro Probe Inc.) munie d'une membrane de polycarbonate présentant des pores de 3 µm de diamètre. Les puits du compartiment inférieur de la chambre ont été chargés de 26 µl de tampon de dilution ou d'IL-8 à 200 ng/ml puis recouverts de la membrane avant de refermer la chambre avec le compartiment supérieur. À la suite d'un marquage de 30 minutes à la Calcéine-AM (5 µM), les neutrophiles (45 µl d'une suspension à 1 x 10⁶ cellules/ml dans du RPMI 1640) ont été chargés dans les puits du compartiment supérieur. La chambre de Boyden

a été incubée 60 minutes à 37°C avec 5% CO₂. Par la suite, le compartiment supérieur a été retiré et le côté supérieur de la membrane a été soigneusement gratté à l'aide de l'instrument fourni par le fabricant. Le contenu des puits du compartiment inférieur a été récolté pour un décompte cellulaire à l'aide d'un hémacytomètre. Les membranes ont été placées sur des lames de microscope puis observées au photomicroscope à fluorescence.

Adhésion aux cellules A-549

L'adhésion des neutrophiles fraîchement isolés et âgés a été évaluée selon une méthode avec laquelle nous avons déjà publié[32], moyennant de légères modifications. Les cellules de la lignée A-549 ont été cultivées sur des lamelles de verre jusqu'à confluence puis ont été lavées deux fois avec du PBS. Les neutrophiles (200 µl à 10 x 10⁶ cellules/ml) ont été traités avec soit le tampon de dilution, soit de l'IL-4 (200 ng/ml), ou de l'IL-15 (200 ng/ml) ou le témoin positif IL-8 (200 ng/ml) durant 2 heures, puis marqués avec la Calcéine-AM à 5 µM pendant 30 minutes. Ensuite de quoi, les neutrophiles marqués ont été ajoutés à 500 µl de PBS dans des puits de plaques de culture à douze puits contenant les lamelles de verre avec les cellules A-549 à confluence, puis incubés 30 minutes. Après l'incubation, les lamelles ont été intensivement lavées puis transférées dans une nouvelle plaque à douze puits contenant du PBS. La quantité de neutrophiles adhérents a été évaluée en comptant le nombre de cellules fluorescentes dans cinq champs microscopiques à 40X sélectionnés au hasard en observant la plaque à douze puits avec un microscope photonique Leica équipé d'un condensateur épifluorescent *ebq 100 dc*.

Phagocytose

Les globules rouges de moutons ont été opsonisés avec une dilution finale 1:200 d'anticorps anti SRBC durant 45 minutes avec agitation à 37°C comme décrit précédemment[32, 57]. Les neutrophiles (10 x 10⁶ cellules/ml dans RPMI 1640) ont été prétraités durant 30 minutes avec soit le tampon de dilution, soit avec 200 ng/ml d'IL-4, ou 200 ng/ml d'IL-15 ou 65 ng/ml de GM-CSF, puis incubés 38 minutes (temps optimal selon de nombreux essais préliminaires pour les cellules cultivées 24 heures et plus) à 37°C avec les SRBC opsonisés selon un rapport de 5 globules rouges pour 1 neutrophile. Après quoi, les échantillons ont été centrifugés 10 minutes à 1200 rpm à 4°C. Les surnageants ont été retirés et les globules rouges extracellulaires restants ont été éliminés en procédant à une lyse

hypotonique sur les culots en les traitants avec 400 µl d'eau durant 20 secondes avant de rétablir l'osmolarité en ajoutant 4,5 ml de PBS. Les échantillons ont par la suite été lavés deux fois avec du PBS froid et les culots ont été suspendus à une concentration finale de 4×10^6 cellules/ml. Des duplicats de préparation cytocentrifugées ont ensuite été préparés et colorés au Hema 3 puis observés au microscope comme précédemment décrit. Les taux de phagocytose étaient établis comme le pourcentage de neutrophiles non apoptotiques ayant ingérés au moins un globules rouge.

Déplétion des éosinophiles et des cellules nécrotiques

Afin d'évaluer les taux de phagocytose chez les neutrophiles cultivés 48 heures, nous avons dus enrichir les cellules vivantes au sein de suspensions cellulaires comportant des proportions très élevées de cellules apoptotiques et nécrotiques. De plus : malgré que nos échantillons contenaient moins de 4% d'éosinophiles suivant la technique d'isolement, la demi-vie de ces cellules étant nettement plus grande que celle des neutrophiles, au terme de 48 heures de culture, on retrouvait jusqu'à dix fois plus d'éosinophiles que de neutrophiles vivants. Bien que les tests de phagocytose se faisaient par observations cytologiques, que les neutrophiles et les éosinophiles y sont facilement distinguables, et que nous avons jamais observés au cours de ces expériences d'éosinophiles ayant phagocytés des globules rouges de moutons opsonisés (les éosinophiles n'expriment pas le CD16, le récepteur pour la portion Fc des anticorps), la faible proportion de neutrophiles vivants par rapport aux éosinophiles après 48 heures de culture rendait les observations difficiles. Ainsi, nous avons développé une méthode expérimentale pour retirer à la fois les cellules apoptotiques/nécrotiques et les éosinophiles de nos suspensions de cellules âgées de 48 heures. Brièvement, les cellules sont marquées à l'annexin-V conjuguée au PE (pour les cellules apoptotiques et nécrotiques) tel que décrit précédemment, puis sont incubées 15 minutes en présence d'un mélange d'anticorps anti CD9 (pour les éosinophiles) et anti PE. Ces deux anticorps sont des tétramères qui reconnaissent également le dextran (Trousse EasySep™ de Stemcell Technologies, inc). Les cellules sont ensuite incubées 10 minutes avec des nanoparticules magnétiques recouvertes de dextran, puis incubées 5 minutes dans un aimant spécialement conçu par le manufacturier (Stemcell technologies, inc) avant d'être transvidées dans un nouveau tube. La majorité des cellules apoptotiques et nécrotiques, ainsi que les éosinophiles sont retenues par l'aimant (fraction de sélection positive), laissant une suspension enrichie de neutrophiles vivants intacts dans la fraction de sélection négative qui nous sert par la suite à évaluer la phagocytose à 48 heures.

Production de réactifs oxygénés

La synthèse des réactifs oxygénés (ROS) a été évaluée en marquant les neutrophiles avec la sonde de détection des ROS intracellulaire H2-DCFDA (10 μ M) durant 10 minutes en absence de lumière avant de soumettre les cellules à une stimulation de 30 minutes avec le tampon, 200 ng/ml d'IL-4, 200 ng/ml d'IL-15, 10 nM de fMLP ou 50 nM de PMA comme nous l'avons récemment publié[58]. À la suite d'une série de lavage avec du PBS froid, les échantillons ont été analysés en cytométrie à l'aide du FACScan (BD Biosciences).

Dégranulation

Tel que publié auparavant[59], l'expression à la membrane plasmique des marqueurs CD35, CD63 et CD66b a été analysée par cytométrie en flux afin d'évaluer l'exocytose des granules sécrétoires, azurophiles et spécifiques, respectivement. En résumé, les neutrophiles (10 x 10⁶ cellules/ml) ont été prétraités avec le tampon, l'IL-4 (200 ng/ml), l'IL-15 (200 ng/ml) ou le fMLP (1 μ M) pour 30 minutes. Par la suite, afin de limiter les liaisons non spécifiques des anticorps, les cellules ont été incubées 30 minutes sur glace dans du PBS avec 20% de SVF décomplémenté. Après une série de lavages dans du PBS, les anticorps primaires ou un témoin isotypique IgG₁ non spécifique ont été ajoutés aux cellules à une concentration de 1 μ g/ml suivi d'une incubation de 30 minutes dans du PBS sur glace. Les neutrophiles ont ensuite été lavés deux fois dans du PBS puis incubés 30 minutes en présence de l'anticorps secondaire (1 μ g/ml IgG anti souris couplé au FITC) dans du PBS sur glace. Après trois lavages, les cellules ont été suspendues dans du PBS puis analysées à l'aide du FACScan (BD Biosciences).

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Prism 4 pour Macintosh (GraphPad Software, Inc, version 4.0c). Les significances statistiques pour les tests de *student* et les tests *anova* ont été établies selon un intervalle de confiance fixé à 95% (P > 0,05).

RÉSULTATS

Étant donné que nous avons travaillé dans cette étude avec des échantillons de neutrophiles humains isolés et cultivés pour des périodes prolongées, il est de mise de définir adéquatement la répartition des trois stades cellulaires des neutrophiles décrits précédemment qu'on retrouve au sein des suspensions cultivées de 24 à 72 heures.

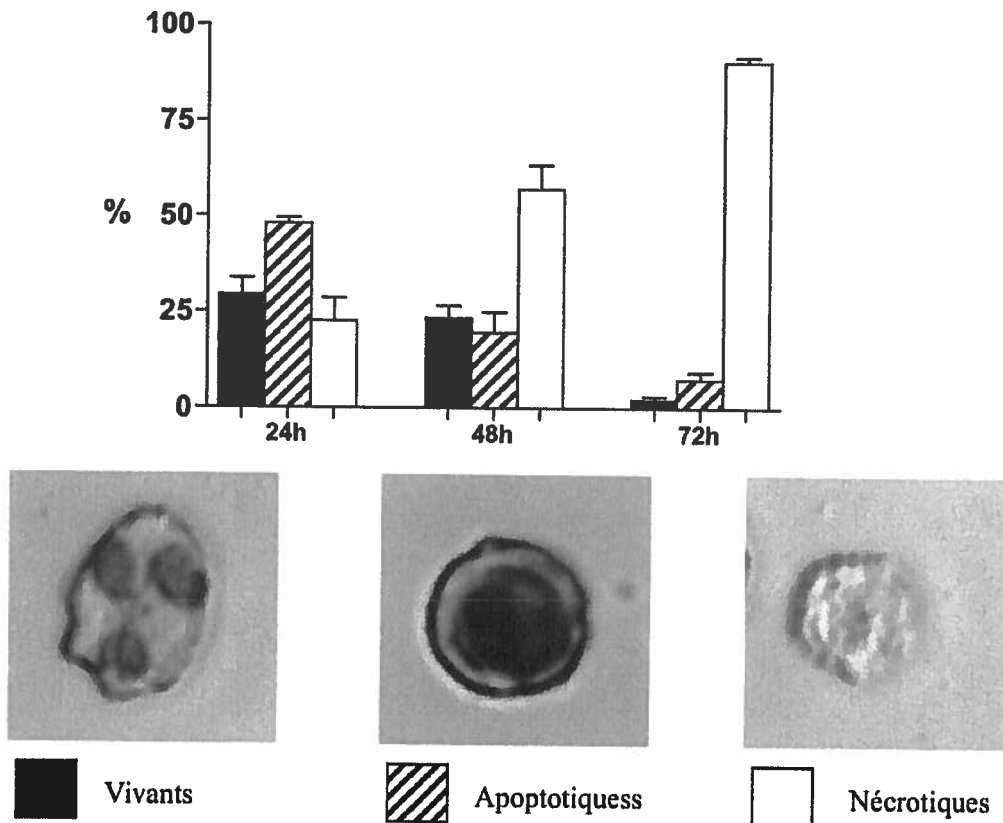


FIGURE 6 : Répartition sur la base de la morphologie cellulaire en cytologie des trois états des neutrophiles humains selon les pourcentages retrouvés dans les culture *in vitro* de 24, 48 et 72 heures. En dessous : photos des apparences cytologiques des neutrophiles vivants, apoptotiques et nécrotiques tels qu'observés au microscope à 40X. À titre indicatif, les suspensions de neutrophiles fraîchement isolés de donneurs sains ne contiennent pas de cellules nécrotiques et $\leq 1\%$ de cellules apoptotiques.

La figure 6 fait donc office de référence afin de démontrer quelle proportion de neutrophiles vivants et fonctionnels est présente dans les différentes suspensions cellulaires sur lesquelles nous avons effectué les expérimentations qui suivent.

Adhésion sur un substrat cellulaire

Afin de pouvoir quitter la circulation sanguine et atteindre le site inflammatoire, les neutrophiles doivent avoir la capacité d'adhérer à l'endothélium vasculaire. Ceci se fait via les molécules d'adhésion intercellulaire dont l'expression peut être stimulée par des agents pro-inflammatoires tels que l'IL-4 et l'IL-15. Ainsi nous avons voulu vérifier si les neutrophiles préservaient leur capacité à adhérer à un substrat cellulaire à la suite d'une culture prolongée, comparativement aux cellules fraîchement isolées.

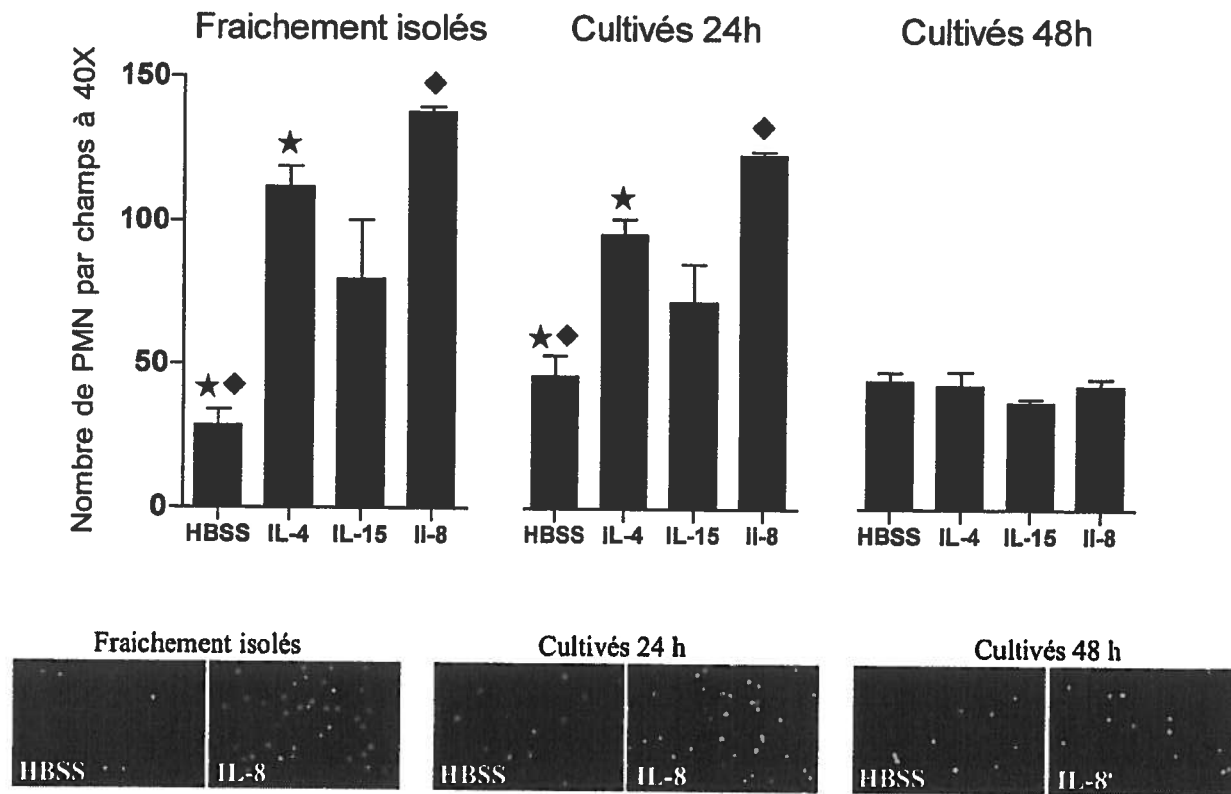


FIGURE 7 : Adhésion des neutrophiles sur un tapis de cellules épithéliales de la lignée A-549. Les neutrophiles fraîchement isolés ou cultivés 24 et 48 heures sont stimulés ou non (HBSS) avec 200 ng/ml d'IL-4, IL-15 ou IL-8, puis marqués à la Calcéine-AM. Le nombre de cellules fluorescente à été compté dans 5 champs microscopiques à 40X chez 3 donneurs différents ($P > 0,05$). En dessous : photos représentatives des champs à 40X des témoins négatifs (HBSS) et positifs (IL-8) de l'adhérence des neutrophiles fraîchement isolés et cultivés 24 et 48 heures.

Tel qu'attendu, on peut voir sur la section gauche de la figure 6, présentant l'adhérence des neutrophiles fraîchement isolés, que les cellules ont répondu significativement lorsqu'elles ont été stimulées avec les agonistes testés, comparativement à celles qui n'ont été traitées qu'avec le tampon de dilution HBSS. Toutefois, dans le cas de l'interleukine-15, la comparaison des valeurs obtenus avec celles du témoin HBSS par un test de *student*, rapportait un *P value*

d'exactement 0,05, soit à la limite de la signifiacnce, et donc cette condition n'a pas été indiquée comme étant statistiquement significative sur la figure.

La section central de la figure 6 présente l'adhérence des neutrophiles lorsque ceux-ci ont été cultivés 24 heures suivant leur isolement du sang périphérique, avant de les stimuler avec les agents et de les soumettre à l'essai. On y voit que les cellules ont conservés leur capacité à adhérer au tapis cellulaire et qu'elles répondent encore significativement aux stimulants, sauf en ce qui a trait à l'IL-15.

Les résultats des tests d'adhérence effectués sur les neutrophiles cultivés 48 heures (section droite de la figure 6) montrent que les cellules auront perdu leur habileté à répondre aux cytokines potentialisant cette fonction que nous avons testés. En effet, on ne note plus de différence significative entre les neutrophiles non stimulés (traités au tampon HBSS) et ceux qui ont été traités avec les interleukines.

Chimiotaxie et transmigration

La capacité des neutrophiles à rejoindre le foyer inflammatoire dépend grandement de leur habileté à suivre un gradient chimiotactique et à migrer à travers une matrice telle que la barrière endothéliale. Comme il a été démontré que les neutrophiles âgés et activés, c'est à dire cultivés de manière prolongée en présence d'un cocktail de cytokines, présentaient une diminution significative de leur capacité chimiotactique[7], nous avons voulu évaluer le comportement chimiotactique des neutrophiles âgés en absence d'agonistes. La réponse des cellules fraîchement isolées a donc été comparée à celle des cellules des mêmes échantillons après 24 et 48 heures de culture. L'utilisation d'une chambre de Boyden avec une membrane de polycarbonate nous a permit d'évaluer par la même occasion les capacités transmigratoires des neutrophiles puisque pour atteindre les puits inférieurs de la chambre où se trouvait le chimioattractant, les cellules devaient, en plus d'être en mesure de suivre un gradient chimiotactique, être capable de traverser la matrice de polycarbonate dont les pores mesuraient 3 μm .

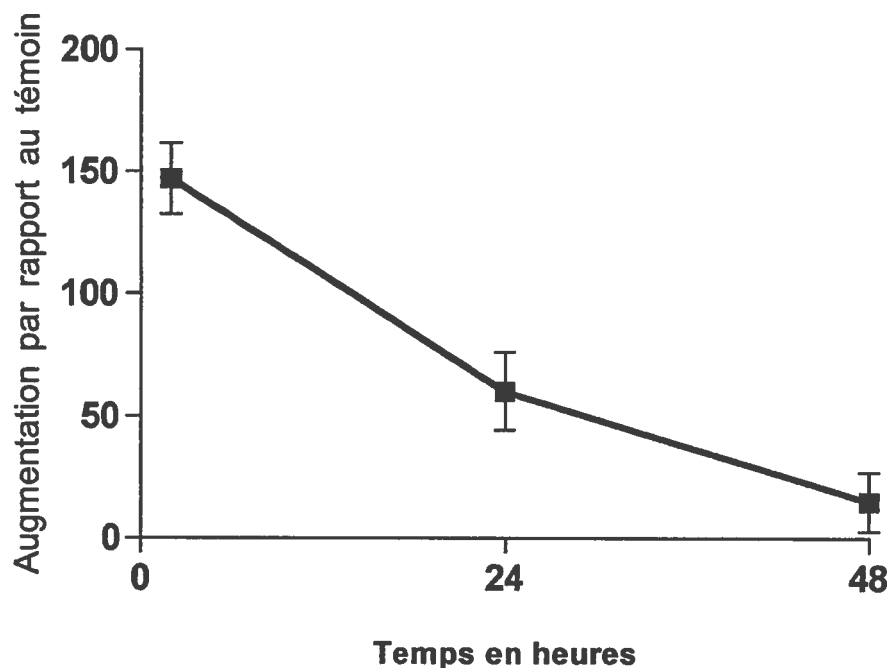


FIGURE 8 : Capacité chimiotactique et migratoire des neutrophiles âgés. Rapport entre le nombre de cellules ayant migrées vers les puits contenant l'agent chimioattractif (200 ng/ml d'IL-8) et celles ayant migrées vers les puits témoins du compartiment inférieur de la chambre de Boyden. Les cellules de 4 donneurs (N = 4) sont soumises au test 30 minutes suivant leur isolement; l'expérience est répétée après 24 heures de culture, puis après 48 heures. (P > 0,05)

En observant la figure 7, on note une diminution progressive des capacités chimiotactiques et transmigratoires des neutrophiles au fil du temps. Ces résultats concordent avec ce qui déjà été rapporté dans la littérature, mais en même temps, étant donné qu'il s'agit de neutrophiles âgés et non stimulés, cela démontre également que les neutrophiles vieillissent en culture en absence de signaux activateurs conservent jusqu'à un certain point leur habileté à répondre à un signal chimiotactique; un phénomène qui n'avait pas été évalué à ce jour. En effet, à la suite des premières 24 heures de culture, on dénombre encore de 50 à 75 fois plus de cellules ayant migrées vers les puits contenant l'IL-8 que de cellules ayant migrées vers les puits témoins. Même au terme de 48 heures de culture, malgré que la diminution soit marquante par rapport aux cellules fraîchement isolées, on observe encore de 10 à 20 fois plus de cellules qui auront suivi le gradient chimiotactique comparativement à leur témoin négatif respectif.

Phagocytose

Les neutrophiles sont des cellules phagocytaires qui ont la propension d'ingérer les pathogènes au site inflammatoire; un phénomène facilité par l'opsonisation des microorganismes avec des anticorps. Comme il s'agit de leur principale arme pour lutter contre les bactéries et fungi, il était donc important, dans l'optique du présent projet, d'évaluer si cette fonction des neutrophiles était préservée chez les cellules non stimulées et âgées. La réponse aux IL-4 et IL-15, ainsi qu'au GM-CSF (témoin positif) des cellules cultivées 24 heures a donc été comparée à celle des cellules fraîchement isolées.

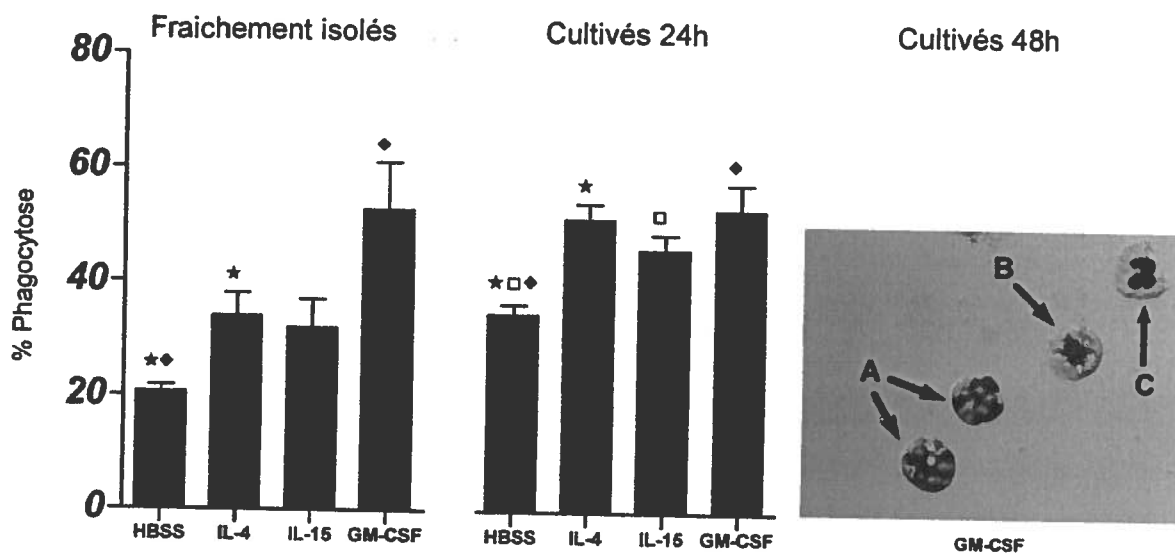


FIGURE 9 : Phagocytose des globules rouges de moutons opsonisés. Les neutrophiles fraîchement isolés ou cultivés 24 heures sont stimulés ou non (HBSS) avec 200 ng/ml d'IL-4 ou IL-15, ou avec 65 ng/ml de GM-CSF. Le taux de phagocytose est exprimé en terme de pourcentage de neutrophiles ayant ingérés au moins un globule rouge sur les préparations cytologiques observées au microscope à 40X de 3 donneurs différents ($P > 0,05$). À droite : photo à 40X de phagocytose de globules rouges de moutons opsonisés par neutrophiles cultivés 48 heures. A) neutrophiles vivants ayant ingérés des globules rouges, B) neutrophile apoptotique, C) neutrophile vivant non phagocyttaire.

Tel que rapporté précédemment, le GM-CSF augmente fortement le taux de phagocytose des globules rouges de mouton opsonisés par les neutrophiles fraîchement isolés, et il en va de même pour les IL-4 et IL-15, dans une moindre mesure (figure 8, section gauche). Ce qui est inédit est la section droite de la figure 8 présentant les résultats de phagocytose des neutrophiles cultivés 24 heures. On y voit que les cellules présentent un patron de réponse similaire à ce qu'on observe chez les cellules fraîchement isolées, mis à part que le taux basal de phagocytose (HBSS : cellules non stimulées) semble plus élevé après 24 heures de culture et par conséquent, la réponse aux agonistes paraît moins marquante.

Pour des raisons qui seront discutées plus loin, le taux de phagocytose au terme de 48 heures de culture avoisine les 100% et la différence entre les cellules stimulées et non stimulées n'est plus (résultats non présentés). Toutefois, comme en témoigne la photographie de la figure 8, les neutrophiles humains cultivés 48 heures en absence de tout signal activateur sont encore en mesure d'ingérer des particules opsonisées; un phénomène qui n'avait jamais été démontré auparavant.

Production de réactifs oxygénés

La production de réactifs oxygénés (ROS) est un autre aspect important de l'activité microbicide des neutrophiles qui devait être évalué chez les cellules âgées. Nous avons choisi pour se faire deux agents reconnus pour induire une forte production de ROS chez les neutrophiles fraîchement isolés : le fMLP et le PMA. Le premier stimulant la flambée respiratoire via un récepteur spécifique et le second agissant selon un mécanisme encore méconnu. Nous avons également testé les IL-4 et IL-15, même s'il est déjà connu que ces cytokines ne peuvent induire à elles seules la synthèse de ROS, afin de vérifier s'il y aurait un gain de réponse chez les cellules cultivées.

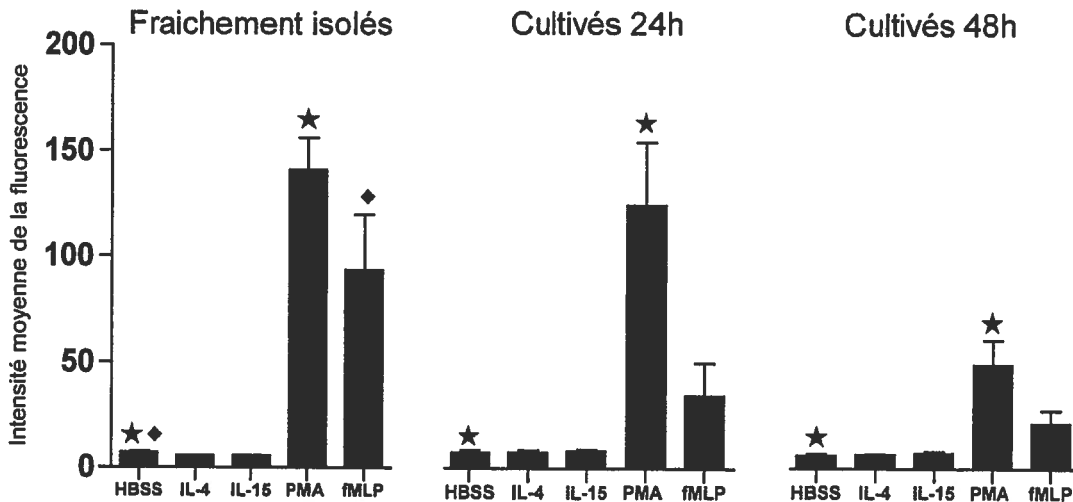


FIGURE 10 : Production d'espèces réactives oxygénées par les neutrophiles âgés. Les cellules fraîchement isolées ou cultivées 24 et 48 heures sont stimulées ou non (HBSS) avec 200 ng/ml d'IL-4 ou IL-15, ou avec 50 nM de PMA ou 10 nM de fMLP. N = 4 (P > 0,05).

Pour chacune des sections de la figure 9 (neutrophiles fraîchement isolés à gauche, après 24 heures de culture au centre et après 48 heures à droite) les neutrophiles étaient analysés en cytométrie en flux après la stimulation avec les agents pour détecter la présence de ROS

intracellulaires. Tel qu'attendu, les cellules fraîchement isolées ont répondu fortement au PMA et au fMLP, tandis que les IL-4 et IL-15 n'ont pas induit de production de ROS avec une réponse comparable à celle des cellules non stimulées (HBSS).

Chez les cellules âgées de 24 et 48 heures, malgré que les valeurs diminuent légèrement, la réponse au PMA demeure significative même au terme de 48 heures de culture. Par contre, pour ce qui est du fMLP, même si les valeurs obtenues demeurent sensiblement plus élevées que le témoin négatif après 24 et 48 heures de culture, l'analyse statistique révèle que la réponse n'est plus significative dès les premières 24 heures et donc, on ne peut considérer que les neutrophiles âgés de 24 ou 48 heures maintiennent leur capacité à répondre au fMLP en ce qui a trait à la production de ROS. On note également qu'il n'y a pas de modulation de la réponse aux IL-4 et IL-15 à mesure que les neutrophiles vieillissent en culture.

Dégranulation

L'exocytose des granules des neutrophiles peut être évaluée en détectant grâce à des anticorps spécifiques la présence à la surface cellulaire de marqueurs associés aux trois principales granules que sont les vésicules sécrétoires (CD35), les granules azurophiles (CD63) et granules spécifiques (CD66b). Comme il a été rapporté que les neutrophiles âgés et activés présentaient une diminution significative de l'exocytose des granules azurophiles et spécifiques en réponse au fMLP[7], nous avons voulu vérifier si un phénomène similaire se produisait chez les neutrophiles cultivés en absence de signaux activateurs. Par la même occasion, sachant que les IL-4 et IL-15 sont connus pour n'avoir aucun effet à elles seules sur cette fonction chez les neutrophiles, nous les avons tout de même testés afin de s'assurer qu'à l'instar de la production de ROS, il n'y aurait pas de gain de réponse chez les cellules cultivées.

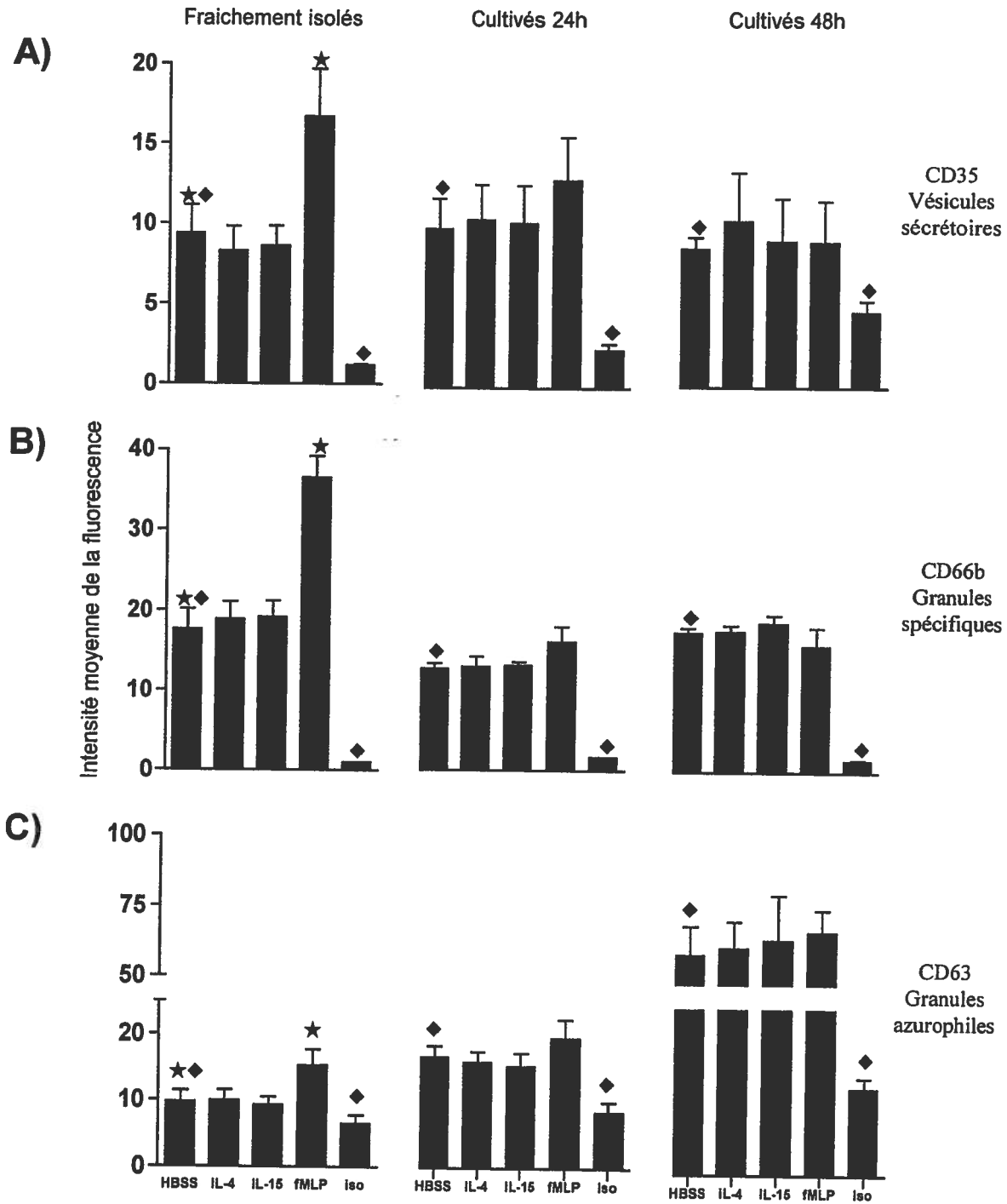


FIGURE 11 : Exocytose des granules sécrétoires, spécifiques et azurophiles chez les neutrophiles âgés. A) vésicules sécrétoires (CD35), B) granules spécifiques (CD66b) et C) granules azurophiles (CD63). Les cellules sont stimulées ou non (HBSS) avec 200 ng/ml d'IL-4, 200 ng/ml d'IL-15 ou 1 μ M de fMLP. Les cellules non stimulées sont également exposées à un anticorps secondaire non spécifique faisant office de témoin isotypique (iso). L'expérience est effectuée sur les cellules de 3 donneurs (N = 3) 30 minutes suivant leur isolement, puis répétée après 24 et 48 heures de culture. ($P > 0,05$).

La section gauche de la figure 10 qui présente l'exocytose des vésicules sécrétoires (A), des granules spécifiques (B) et des granules azurophiles (C) chez les neutrophiles fraîchement isolés fait office de témoin pour comparer la réponse de cellules âgés de 24 heures (section centrale) et 48 heures (section droite). Les résultats de la section gauche sont donc fidèle à nos attentes et à ce qu'on retrouve dans la littérature, à savoir une réponse au fMLP forte et significative pour les trois granules testées et une absence de réponse aux IL-4 et IL-15.

Dès les premières 24 heures de culture, les cellules ont perdu leur réponse au fMLP et n'ont pas changés leur comportement aux IL-4 et IL-15; et ce pour les trois granules testées. Cette situation ne change pas après 48 heures de culture et ces résultats concordent avec ce que nous avons observés au niveau de la production de ROS en réponse au fMLP (figure 9), c'est à dire une perte de la réponse à cet agent à la suite des premières 24 heures de culture.

On peut constater que concernant l'exocytose des granules azurophiles chez les neutrophiles âgés de 48 heures (figure 10, section droite en C), les valeurs sont beaucoup plus hautes que pour les cellules fraîchement isolées et âgées de 24 heures (section gauche et centrale en C). Toutefois, comme les valeurs du témoin isotypique sont proportionnellement plus élevées (section droite en C, condition i), on ne peut considérer ces valeurs comme étant dus à une réponse plus forte de la part des cellules âgés de 48 heures, mais plutôt une fluctuation découlant probablement de la calibration de l'appareil au moment de la lecture des échantillons de 48 heures.

En somme, les neutrophiles cultivés 24 heures et plus ne préservent pas leur capacité à répondre au fMLP et ne changent pas leur réponse aux IL-4 et IL-15 pour ce qui est de l'exocytose des trois granules que nous avons testées.

Réponse aux signaux anti-apoptotiques

En condition inflammatoire, les neutrophiles perçoivent de nombreux signaux dictant leur comportement; notamment des signaux pro-inflammatoires qui visent à activer leurs fonctions inflammatoires ainsi qu'à augmenter leur durée de vie jusqu'à ce que la menace soit écartée. De nombreux signaux anti-apoptotiques sont connus et largement employés lors des expérimentations *in vitro*. Si les effets de ces molécules sont bien connus chez les neutrophiles fraîchement isolés, on ne sait pas si des neutrophiles cultivés demeurent susceptibles à de tels signaux.

Nous avons donc évalué les proportions des trois sous-populations (neutrophiles vivants, cellules apoptotiques et cellules nécrotiques) observées en cytologie dans les suspensions de neutrophiles âgés de 24, 48 et 72 heures. Cette démarche a été réalisée sous trois conditions, à savoir des neutrophiles non stimulés, des neutrophiles cultivés en présence d'un cocktail de signaux anti-apoptotiques, et finalement, des neutrophiles non stimulés au départ, puis ayant été exposés aux signaux anti-apoptotiques à la suite des premières 24 heures de culture. Le but était de comparer cette dernière condition aux deux premières afin de vérifier si les neutrophiles âgés de 24 heures répondaient encore aux signaux de survie.

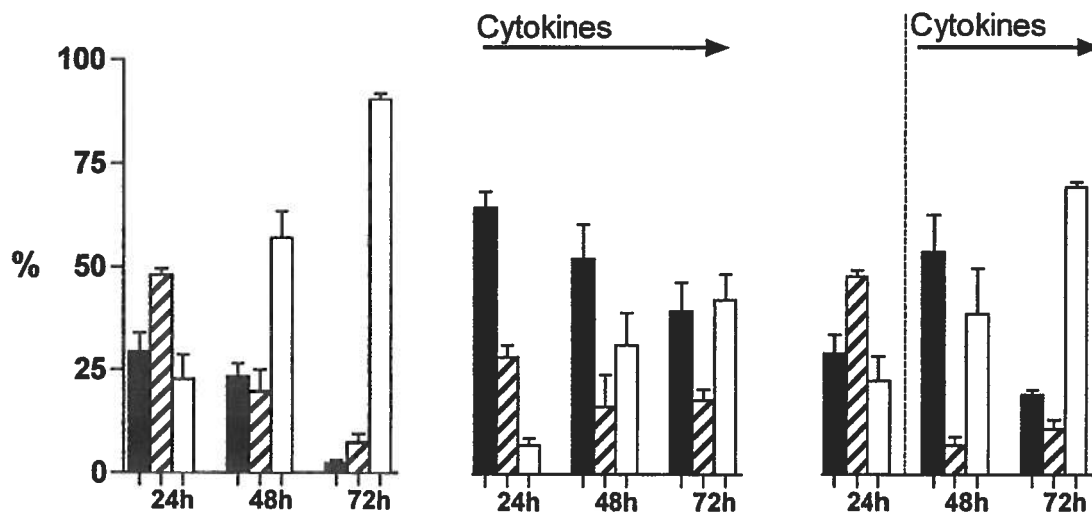


FIGURE 12 : Proportion de neutrophiles vivants (barres noires), de cellules apoptotiques (barres hachurées) et de cellules en nécrose secondaire (barres blanches) dans des cultures de 24, 48 et 72 heures en absence de signaux anti-apoptotiques (section de gauche) ou en présence d'un mélange de 200 ng/ml d'IL-4, 200 ng/ml d'IL-15 et 65 ng/ml de GM-CSF (section centrale). Les cellules des 3 mêmes donneurs (N = 3) ont également été cultivées durant 24 heures en absence de signaux de survie, puis ont été exposées au mélange de cytokines pour le restant de la période de culture (section de droite).

La section gauche de la figure 11 présente la répartition des neutrophiles vivants, des cellules en apoptose et des cellules en nécrose secondaire dans des suspensions cellulaires cultivées pour des périodes de 24 à 72 heures. On y voit que la quantité de neutrophiles vivants diminue rapidement avec le temps au profit des cellules apoptotiques en premier lieu, puis des cellules nécrotiques, de sorte qu'au terme de 72 heures de culture, on ne retrouve pratiquement plus que des cellules au stade de la nécrose secondaire.

En contre partie, la section centrale de la figure 11 présente les neutrophiles cultivées en présence d'un mélange de GM-CSF, d'IL-4 et d'IL-15 afin d'exposer les cellules à des signaux anti-apoptotiques puissants. On y voit clairement les effets de survie générés par ces cytokines

car la proportion de neutrophiles vivants est beaucoup plus élevée que chez les cellules cultivées en absence d'agonistes.

La section de droite de la figure 11 présente le résultat d'intérêt de cette expérience, c'est à dire les neutrophiles qui n'ont reçu les signaux anti-apoptotiques qu'après les premières 24 heures de culture. On y voit qu'au terme de 24 heures de culture, les proportions de cellules vivantes, apoptotiques et nécrotiques sont les mêmes que celles de la section gauche de la figure puisque qu'il s'agit aussi de cellules cultivées 24 heures en absence de signaux de survie. Toutefois, après 48 heures de culture, comme les cellules ont reçu dans ce cas les signaux après les premières 24 heures (section droite), on voit que la proportion de neutrophiles vivants est plus élevée que chez les cellules cultivées 48 heures sans jamais recevoir de signaux (section gauche), et cette proportion de cellules vivantes se rapproche davantage de ce qu'on observe lorsque les cellules qui sont cultivés en présence des signaux anti-apoptotiques dès le départ (section centrale). Ainsi, cela démontre que les neutrophiles cultivés 24 heures sont encore susceptibles à répondre à des signaux anti-apoptotiques.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Nous avons donc évalué la réponse aux IL-4 et IL-15 des neutrophiles humains maintenues en culture *in vitro* pour des périodes de 24 et 48 heures en absence de signaux de survie, et comparés ces réponse à celles des cellules fraîchement isolées de mêmes donneurs. Cette étude s'inscrit dans la ligne de pensée de plus en plus reconnue selon laquelle les neutrophiles seraient des cellules plus modulables qu'on le pensait auparavant[60]. En effet, longtemps considérés comme des cellules immuables vouées à une mort certaine et rapide, avec un rôle strictement limité à l'immunité innée; on reconnaît désormais que les neutrophiles seraient peut-être des cellules moins éphémères qu'on le croyait, ayant un rôle de régulateurs de l'immunité acquise[5], dotées d'un niveau de plasticité et pouvant être « reprogrammées » par des combinaisons de cytokines[4, 7], et pouvant potentiellement acquérir de nouvelles fonctions qui leur étaient jusqu'alors insoupçonnées telle que la présentation antigénique[8, 10].

Les fonctions que nous avons testées en réponse aux IL-4 et IL-15 sont les principales fonctions inflammatoires des neutrophiles qui s'inscrivent dans un modèle simplifié du déroulement d'une infiltration de neutrophiles en condition inflammatoire. Ces mêmes fonctions ont été évaluées sur des neutrophiles humains âgés en culture par un seul autre groupe, l'équipe de Chakravarti et al. qui ont travaillé avec des cellules cultivées 72 heures en présence d'un mélange de cytokines incluant le GM-CSF, le TNF- α et l'IL-4[7]. Étant donné qu'ils ont évalués les fonctions de neutrophiles activés par des cytokines, leurs observations visaient à démontrer le caractère reprogrammable des neutrophiles en présence de signaux pro-inflammatoires. De notre côté, nous avons évalués les fonctions des neutrophiles cultivés de façon prolongée en absence de tout signaux afin de vérifier jusqu'à quel point les neutrophiles préservent leur fonctionnalité inflammatoire à mesure qu'ils se dirigent vers l'apoptose spontanée, et s'ils maintiennent leur capacité à répondre aux cytokines pro-inflammatoires qui exacerbent ces fonctions, en l'occurrence les IL-4 et IL-15.

Les fonctions des neutrophiles âgés en culture

Adhésion

Les neutrophiles doivent tout d'abord être en mesure de s'adhérer à l'endothélium vasculaire afin de pouvoir quitter la circulation sanguine. Pour représenter cette fonction, nous avons employé un tapis de cellules épithéliales de la lignée A-549 pour y faire adhérer nos cellules âgées. Nous avons choisi cette lignée cellulaire puisque les cellules épithéliales expriment le même patron de molécules d'adhésion que les cellules endothéliales, mais sont plus stables en culture *in vitro*.

Nos résultats de la figure 6 démontrent que les neutrophiles cultivés 24 heures répondent encore sensiblement de la même façon que les cellules fraîchement isolées aux IL-4, IL-15 et IL-8, mais qu'à compter de 48 heures, il n'y a plus de différence significative entre les cellules non stimulées et celles traitées avec les cytokines. Ceci pourrait s'expliquer par une diminution de l'expression des récepteurs des cytokines chez les neutrophiles cultivés au-delà de 24 heures. Dans les cas des IL-4 et IL-15, cette hypothèse pourrait s'avérer vraie puisque ces deux cytokines, dont les récepteur sont issues la famille des « γ c users », partagent la sous-unité de récepteur commune à tous les membre de cette famille et l'absence de cette sous-unité gamma pourrait être suffisante pour inhiber la réponse à la fois de l'IL-4 et de l'IL-15. Cependant, l'IL-8 possède un tout autre récepteur n'utilisant pas la chaîne gamma et il faudrait donc que les neutrophiles âgés de 48 heures aient également perdu ce récepteur pour expliquer l'absence de réponse des cellules à cet agent. Or, nos résultats de chimiotaxie et transmigration (voir figure 7) indiquent que les neutrophiles cultivés 48 heures répondent encore à l'IL-8.

Ainsi, on pourrait alternativement expliquer l'absence de réponse des neutrophiles cultivés 48 heures aux trois cytokines testées relativement à l'adhésion cellulaire par la présence des cellules apoptotiques dans les échantillons. En effet, en observant la section de gauche de la figure 11, on constate que les suspensions de cellules cultivés 48 heures sans signaux anti-apoptotiques contiennent environ 20% de cellules apoptotiques et plus de 50% de cellules nécrotiques. La calcéine-AM, le marqueur fluorescent utilisé pour observer les neutrophiles adhérents sur le tapis de cellules A-549, est un agent couramment employé pour identifier les cellules vivantes puisque cette molécule doit être métabolisée par les cellules pour émettre son spectre de fluorescence[61]. Toutefois, nous avons déjà analysés par cytométrie

en flux des neutrophiles âgés de 24 à 72 heures marqués à la fois à la calcéine-AM et à l'annexin-V (un rapporteur de l'apoptose) et nous avons constaté que les cellules étaient transitoirement positives pour les deux marqueurs (données non présentées). Il est probable que lors des stades précoces du programme apoptotique, les neutrophiles sont probablement encore capable de métaboliser la calcéine-AM en même temps qu'ils commencent à présenter une affinité pour l'annexin-V; et ce phénomène est justement plus marquant chez les cellules cultivées 48 heures.

De plus, on sait que les neutrophiles en apoptose excrètent des acides nucléiques et des protéines sous forme de filaments nommés NETs qui sont impliqués dans l'activité microbicide post-mortem de ces cellules[62]. Les NETs, qui servent normalement à emprisonner les microorganismes environnants, pourraient conférer aux neutrophiles apoptotiques une propension à adhérer non spécifiquement à leur environnement.

Ainsi, dans les suspensions de neutrophiles cultivés 48 heures soumises au test d'adhérence, on peut supposer qu'il y aurait une grande proportion de cellules en apoptose pouvant adhérer de façon non spécifique aux cellules A-549 et encore capable de métaboliser la calcéine-AM, donc observables au microscope à fluorescence. Ces neutrophiles apoptotiques et positifs pour la calcéine-AM viendraient donc masquer la réponse des cellules que l'on souhaite évaluer, à savoir les neutrophiles âgés de 48 heures vivants et fonctionnels.

L'équipe de Chakravarti et al. avait observés une augmentation de l'adhésion chez les neutrophiles cultivés 72 heures en présence d'un cocktail de cytokines[7]. La différence dans nos observations pourrait s'expliquer par le fait qu'ils aient utilisé des cultures primaires de fibroblastes comme substrat d'adhésion, tandis que nous avons optés pour une lignée de cellules épithéliales. Cependant, la différence réside probablement plutôt dans le fait que nos deux équipes ont étudiées et observées deux concepts différents, à savoir les neutrophiles activés par des cytokines au cours de la culture prolongée, versus les neutrophiles naïfs âgés en culture; ce qui démontre que ces cellules se comportent différemment dépendamment si elles sont activées avec une apoptose retardée ou si elles demeurent à l'état naïves, se dirigeant vers l'apoptose spontanée.

Chimiotaxie

Après avoir adhéré à l'endothélium vasculaire, les neutrophiles doivent être en mesure de suivre un gradient chimiotactique et de traverser la matrice endothéliale pour atteindre le site inflammatoire. Pour évaluer cette fonction chez les neutrophiles âgés, nous avons utilisé une chambre de Boyden, une méthode largement employée dans la littérature, mais nous y avons apportés de légères modifications afin d'adapter la technique aux cellules âgées. En effet, le taux de migration s'établi généralement en dénombrant les cellules du coté inférieur de la membrane de polycarbonate (voir matériel et méthode) après 1 heure de migration. Cependant, les capacités chimiotactiques et migratoires des neutrophiles après les premières 24 heures de culture diminuent rapidement de sorte qu'en se limitant à n'observer que la membrane, on pourrait croire qu'il n'y a aucune cellules ayant répondu au gradient chimiotactique dans chacune des conditions; or ce n'est pas le cas car en observant le contenu des puits inférieurs de la chambre de Boyden, on constate que bon nombre de neutrophiles auront traversés totalement la membrane et qu'il y a une différence significative entre le nombre de cellules présentes dans les puits témoins et le nombre de cellules observées dans les puits contenant l'agent chimioattractif.

On remarque en observant la figure 7 que les neutrophiles conservent leur propension à suivre un gradient chimiotactique jusqu'à 48 heures de culture *in vitro*. Toutefois, le rapport entre le nombre de cellules dans les puits témoin et celles dans les puits contenant l'IL-8 va en diminuant. Pour atteindre les puits inférieurs de la chambre, les neutrophiles doivent non seulement être capable de suivre un gradient chimiotactique, mais doivent également être en mesure de procéder à un réarrangement de leur cytosquelette afin de traverser les pores de 3 μm de diamètre de la membrane. Ainsi, on considère que les neutrophiles retrouvés dans les puits inférieurs sont tous vivants (ou « non apoptotiques ») étant donné que la perte des capacités chimiotactique est associée aux cellules en apoptose et que le démantèlement du cytosquelette est une propriété du programme apoptotique[53]. La diminution des capacités chimiotactiques chez les neutrophiles âgés de 24 et 48 heures démontré à la figure 7 n'est donc pas due à un taux d'apoptose élevé puisque les cellules apoptotiques demeurent vraisemblablement dans les puits supérieurs, et que même s'il y a de moins en moins de cellules vivantes en fonction du temps, nous avons calculé le rapport entre les puits témoins et les puits contenant l'IL-8. En somme, la proportion de neutrophiles vivants, non apoptotiques et donc, théoriquement aptes à répondre au signal chimiotactique diminue évidemment avec le

temps puisque les taux d'apoptose augmente, mais en plus, cette fraction de cellules encore vivantes au terme de 24 et 48 heures de culture semble perdre progressivement la capacité à suivre le gradient d'IL-8.

Ces observations sont concomitantes avec les résultats de Chakravarti et al. qui avaient noté une forte diminution des capacités chimiotactiques chez les neutrophiles activés par les cytokines et cultivés 72 heures[7]. Nous avons pour notre part démontré que cette perte de l'activité migratoire des neutrophiles âgés s'initie dès les premières 24 heures et, à la lumière des résultats de Chakravarti et al, il appert que cette perte ne puisse être rescapée en cultivant les cellules en présence d'agents anti-apoptotiques.

Phagocytose

Les neutrophiles forment la première ligne de défense contre les infections fongiques et bactériennes, et leur principale arme pour y parvenir est la phagocytose. Nous avons évalués cette fonction en calculant les taux de phagocytose de globules rouges de mouton opsonisés, puis nous avons comparés la réponse des cellules cultivées 24 heures avec celle des cellules fraîchement isolées de mêmes donneurs.

La figure 8 démontre que les neutrophiles humains maintenus en culture *in vitro* durant 24 heures en absence d'agents activateurs et anti-apoptotiques, préservent leur capacité phagocytaires et conservent leur habileté à répondre aux agonistes potentialisant cette fonction. Si les taux de phagocytose des neutrophiles non stimulés (HBSS) semblent plus élevés chez les cellules cultivées 24 heures, c'est probablement en raison de la présence de cellules apoptotiques dans les échantillons. Tel que mentionné dans la section « matériel et méthode », cette fonction est évalué sur la base d'observations cytologiques et par conséquent, seuls les neutrophiles vivants (non apoptotiques) sont dénombrés pour établir les taux de phagocytose. La présence de cellules apoptotiques ne devrait donc pas influencer les données. Toutefois, comme il y a moins de neutrophiles vivants après 24 heures de culture, le rapport de 5 globules rouges pour 1 neutrophile n'est plus exactement respecté; ce qui pourrait avoir comme effet de « forcer » en quelque sorte la capture de globule rouges par les neutrophiles se traduisant par une augmentation du taux de phagocytose apparent.

Pour évaluer la phagocytose chez les neutrophiles cultivés 48 heures, une étape supplémentaire d'enrichissement était nécessaire (voir matériel et méthode). Bien que cette technique nous permettait d'obtenir des suspensions de neutrophiles âgés de 48 heures

presque exemptes de cellules apoptotiques/nécrotiques et d'éosinophiles; cela entraînait également une perte importante de neutrophiles vivants. Par conséquent, nos échantillons ainsi traités ne nous permettaient pas d'obtenir suffisamment de cellules pour tester chacune de nos conditions sur les neutrophiles âgés 48 heures. Nous avons donc seulement évalué la réponse des neutrophiles stimulés au GM-CSF (le témoin positif pour cette fonction) comparée à celle des cellules non stimulées (HBSS). Il n'y avait pas de différence significative entre ces 2 conditions, et le fait que nous avons travaillé avec des suspensions dont la majorité des cellules apoptotiques et nécrotiques ont été retirés, suggère qu'il s'agit peut-être d'une perte de la réponse au GM-CSF chez les neutrophiles âgés de 48 heures étant donné que, dans ce cas, le rapport de 5 :1 entre les globules rouges et les neutrophiles vivants était respecté.

Cela demeure tout de même hypothétique car les taux de phagocytose chez les neutrophiles de 48 heures frôlaient les 100% et donc, il est également possible que lors du vieillissement en culture, les neutrophiles voient leur capacité phagocytaire augmentée. Un phénomène qui ne serait pas dépourvu de pertinence physiologique car les neutrophiles sont de véritables machines à tuer; même après leur mort ils continuent à capturer et dégrader les microorganismes grâce à leur NETs[62]. Ainsi, il ne serait pas étonnant qu'à mesure que les neutrophiles progressent vers la mort cellulaire spontanée, leur capacité phagocytaire augmente de façon à tirer à profit leur courte durée de vie et de maximiser la capture des microorganismes avant leur finalité apoptotique. Dans cet ordre d'idée, il est à noter que Chakravarti et al. ont observés une nette augmentation de la phagocytose chez les neutrophiles cultivés 72 heures en présence de cytokine comparativement aux cellules fraîchement isolées[7]. Dans leur cas, il s'agissait de la phagocytose de particules de zymosan (un constituant de la paroi des organismes levuriformes) opsonisés, et non de cellules entières (globules rouges de mouton). Quoiqu'il en soit, l'augmentation des capacités phagocytaires chez les neutrophiles maintenues en culture *in vitro* prolongée ne semble pas être un phénomène dû uniquement à l'effet activateur des cytokines, mais pourrait être une propriété intrinsèque du vieillissement des neutrophiles en culture.

Production de ROS

En plus de la phagocytose, un autre aspect important de l'activité microbicide des neutrophiles est la synthèse de composés hautement réactifs à base d'oxygène (ROS). Ces molécules qui incluent entre autres les anions superoxydes, les radicaux hydroxyl et le peroxyde

d'hydrogène sont produites par les enzymes NADPH oxydase, présente chez tous les phagocytes, et la myeloperoxydase, que l'on retrouve principalement chez les neutrophiles, et sont impliquées dans de nombreux processus biologiques, notamment dans des événements signalétiques, mais surtout, dans la digestion des microorganismes phagocytés. Puisqu'il s'agit d'une autre fonction importante des neutrophiles, nous avons donc voulu évaluer si l'activité de ces enzymes était maintenue chez les cellules vieillies en culture.

Tel que démontré par la figure 9, les neutrophiles répondent encore au PMA, relativement à la production de ROS, jusqu'à 48 heures de culture; bien que l'intensité de la réponse diminue progressivement. En contrepartie, la réponse au fMLP n'est plus significative dès les premières 24 heures. L'induction de ROS par le PMA, un composé organique dérivé des plantes[63], passent par l'activation de la PKC[64, 65], mais les mécanismes en amont sont méconnus. Il est possible que la molécule pénètre dans les cellules et interfère directement avec la signalétique sans passer par un récepteur membranaire. Pour ce qui est du fMLP, un métabolite bactérien, son action est perpétré via un récepteur spécifique exprimé par les neutrophiles et reconnu pour induire une synthèse de ROS[66].

On pourrait donc aisément supposer que l'expression à la membrane des neutrophiles du récepteur au fMLP diminue progressivement à mesure que les cellules vieillissent en culture entraînant une diminution de leur susceptibilité à répondre au fMLP pour la production de ROS suivant les premières 24 heures de culture. Dans le cas du PMA, puisqu'on ne sait pas si son effet dépend d'un récepteur, on ne peut par conséquent avancer l'hypothèse d'une diminution de l'expression d'un récepteur membranaire. Si la réponse au PMA semble toutefois diminuer avec le temps, c'est sans doute parce que l'appareil de cytométrie ne peut distinguer les cellules en apoptose avancée (incapable de générer des ROS) des cellules vivantes âgées (en progression vers l'apoptose, mais encore aptes à répondre aux agonistes). Ainsi, l'intensité moyenne de fluorescence diminue avec le temps puisque la proportion de cellules en apoptose sur la totalité des événements analysés augmente progressivement.

Les IL-4 et IL-15 ne sont pas connues pour induire de synthèse de ROS chez les neutrophiles fraîchement isolés. Chez les neutrophiles âgés, cette situation ne change pas; nous n'avons pas noté de gain de réponse à ces agonistes à mesure que les cellules vieillissent comme on peut le voir à la figure 9.

L'équipe de Chakravarti et al. a noté une augmentation de 3 à 4 fois la production de ROS en réponse au fMLP chez les neutrophiles âgés et activés par des agonistes comparativement aux cellules fraîchement isolées. La réponse au PMA était quant à elle

maintenue chez les cellules âgées et activées comparée aux cellules fraîches. Ils ont également effectué l'expérience sur des suspensions d'éosinophiles et de monocytes purifiées, les deux types de cellules contaminantes pouvant se retrouver dans les isolats de neutrophiles humains. Il en ressortait que la production de ROS en réponse au fMLP provenait majoritairement des neutrophiles, alors que dans le cas du PMA, les éosinophiles y répondaient presque aussi fortement que les neutrophiles[7]. Une autre étude menée par cette équipe rapporte que chez les neutrophiles âgés et activés, l'expression du récepteur au fMLP diminue avec le temps[67]. Selon leurs résultats, ce serait plutôt l'expression de la PKC qui serait augmentée par l'exposition aux cytokines et c'est ce qui expliquerait les plus hauts niveaux de production de ROS observés. Quoiqu'il en soit, le comportement en réponse au fMLP des cellules âgées et activées diffère de ce qu'on observe chez les neutrophiles cultivés en absence d'agonistes, pour lesquelles la diminution de la réponse pourrait s'expliquer par une baisse de l'expression du récepteur chez les cellules vieillissantes combinée à la présence dans le milieu de cellules apoptotiques incapables à répondre à l'agent.

En ce qui a trait au PMA, les résultats de Chakravarti et al. suggèrent que les éosinophiles y répondent de façon similaire aux neutrophiles concernant la production de ROS. En l'occurrence, ceci pourrait expliquer le maintien de la réponse à ce composé chez les cellules âgées et activées étant donné que, rappelons-le, les éosinophiles ont une demi-vie plus longue que les neutrophiles et donc, au terme d'une culture prolongée, présenteront une plus grande proportion de cellules vivantes aptes à répondre. Le même constat s'applique à nos résultats : en plus de l'indépendance du PMA à un récepteur pour éliciter une réponse comme explication possible du maintien de la réponse chez les neutrophiles âgés non activés, la présence d'une faible proportion d'éosinophiles dans les échantillons (proportion qui augmente avec le temps puisque les éosinophiles possèdent une plus longue espérance de vie), pourrait biaiser légèrement la réponse apparente des suspensions de neutrophiles cultivés.

Dégranulation

Les granulocytes, dont font partie les neutrophiles, tiennent leur nom du fait que le cytoplasme de ces cellules contient de nombreuses vésicules lui conférant un aspect granuleux lorsqu'observé au microscope photonique. Il existe plusieurs types de ces vésicules et on les désigne sous le terme général de « granules ». L'exocytose de ces granules ou dégranulation est le processus par lequel les neutrophiles relâchent le contenu de leurs vésicules dans le

milieu extracelulaire; notamment des composées microbicides et des enzymes protéolytiques. Les trois principales granules retrouvées chez les neutrophiles sont les granules spécifiques, les vésicules sécrétoires ainsi que les granules azurophiles[68]; et leur exocytose est un marqueur de l'activation des cellules. La figure 10 présente l'exocytose de ces trois granules évaluée par cytométrie chez les neutrophiles cultivés 24 et 48 heures en absence d'agonistes comparée à la réponse des cellules fraîchement isolées.

L'absence de réponse des neutrophiles au fMLP pour les 3 granules étudiées à la suite des premières 24 heures concorde avec nos résultats obtenus pour la production de ROS en réponse au fMLP et vient renforcer notre idée selon laquelle les neutrophiles perdraient le récepteur au fMLP dans les premières 24 heures de culture. Toutefois, Chakravarti et al. ont également observé une perte de la réponse au fMLP pour l'exocytose des granules azurophiles et spécifiques chez les neutrophiles cultivés en présence d'agents activateurs. Comme leur résultats pour la production de ROS suggérait que le récepteur au fMLP était préservé par les effets des cytokines, on ne peut dans leur cas expliquer la perte de réponse par une diminution de l'expression du récepteur. On serait plutôt porté à penser que les neutrophiles activés durant la culture par des cytokines, en particulier le GM-CSF et le TNF- α qui sont connus pour induire la sécrétion des granules primaires (azurophiles) et secondaire (spécifiques) [69, 70], procéderaient à l'exocytose des granules durant la culture prolongée de sorte qu'il ne resterait pratiquement plus de vésicules à sécréter lors de la stimulation subséquente au fMLP. À cet effet, on peut voir dans leurs résultats que les cellules âgées qui n'ont pas reçu de stimulation au fMLP présentent des niveaux de fluorescence plus élevés que les cellules fraîchement isolées non stimulées.

On ne peut cependant pas appliquer cette hypothèse à nos résultats de dégranulation puisque les neutrophiles âgés de 24 et 48 heures non stimulés (HBSS) présentent des intensités de fluorescence de même niveau que chez les cellules fraîchement isolées non stimulées. Advenant que les neutrophiles subiraient en quelque sorte une auto-activation de la dégranulation lors de la culture prolongée même en absence de signaux activateurs, on devrait alors observer une augmentation de l'intensité de fluorescence chez les cellules non stimulées après 24 et 48 heures de culture, témoignant de l'exocytose des granules préalablement au test. Or, ce n'est pas le cas et on serait ainsi plutôt porté à pencher pour l'hypothèse de la perte du récepteur au fMLP chez les neutrophiles cultivées 24 heures ou plus en absence de signaux activateurs.

Réponse aux signaux anti-apoptotiques

La figure 3 démontre bien le patron de vieillissement des neutrophiles humains en culture *in vitro*. Ceux-ci passent du stade de cellules vivantes au stade de cellules apoptotiques avant d'entrer en nécrose secondaire. La section gauche de la figure 11 démontre la répartition de ces trois stades chez des suspensions de neutrophiles cultivés 24, 48 et 72 heures en absence de stimuli. Le cheminement des cellules vers le stade apoptotique peut être ralenti par des cytokines anti-apoptotiques comme le démontre la section centrale de la figure 11. Les résultats présentés précédemment suggèrent que les neutrophiles qui sont encore au stade de cellules vivantes après 24 heures de culture sont encore apparemment fonctionnels pour la plupart de leurs fonctions inflammatoires et peuvent encore répondre aux agonistes stimulants ces fonctions. Toutefois, peut-on encore retarder l'apoptose de ces neutrophiles cultivés 24 heures, non activés et encore vivants et fonctionnels, en leur fournissant des signaux anti-apoptotiques?

Nos observations présentées à la section droite de la figure 11 semblent démontrer que oui. En effet, après avoir été cultivés 24 heures en absence de signaux, ces neutrophiles ont été exposés aux cytokines anti-apoptotiques et y ont répondu puisqu'après les 24 heures suivantes, donc 48 heures après le départ de la culture, leur proportion de cellules vivantes est plus élevée que chez les neutrophiles cultivés 48 heures en absence de signaux (section gauche de la figure 11), et similaire à ce qu'on observe chez les neutrophiles cultivés 48 heures en présence de signaux anti-apoptotiques dès le début (section centrale de la figure 11).

La différence entre la répartition des stades vivants, apoptotiques et nécrotiques des neutrophiles cultivés 48 heures en présence des signaux dès le départ de la culture et celle des neutrophiles cultivés 48 heures lorsque les signaux n'ont été ajoutés qu'après les premières 24 heures, se retrouve donc au niveau des cellules apoptotiques et nécrotiques. En effet, les cytokines anti-apoptotiques peuvent ralentir le passage des cellules vivantes vers l'apoptose, mais ne peuvent rescaper les cellules déjà en apoptose et inaptées à répondre aux signaux. Les cellules déjà en apoptose au moment où les signaux de survie sont ajoutés continuent donc de progresser vers le stade suivant, à savoir la nécrose secondaire.

Modulation phénotypique et pré-activation

L'absence de signaux anti-apoptotiques dans le milieu de culture nous a permis d'écarter les effets potentiellement activateurs des cytokines afin de maintenir autant que possible les cellules à l'état naïf dans le but d'évaluer uniquement les effets de la progression des neutrophiles vers l'apoptose spontanée sur leurs propriétés inflammatoires. Il apparaît que les neutrophiles cultivés 24 heures apparemment non activés demeurent relativement aussi fonctionnels que les cellules fraîchement isolées. On sait toutefois qu'il existe possiblement une différence entre la demi-vie *in vivo* et la demi-vie *in vitro*, et donc, les cellules qui sont retirées de la circulation sanguine, isolées puis mises en culture *in vitro*, perçoivent vraisemblablement cet état et cela pourrait bien constituer en soit une forme de signal pré-activateur. En somme, on ne peut considérer les neutrophiles en culture *in vitro* comme étant vraiment à l'état naïf, mais plutôt dans un état « quasi naïf ». Cet état, dans lequel se trouvent les neutrophiles au terme d'une culture prolongée en absence d'agonistes, est différent de celui associé aux neutrophiles âgés et activés par des cytokines, mais pourrait également être différent de l'état naïf qu'on attribue aux cellules fraîchement isolées.

Comme la présence d'IL-8 dans le milieu est un marqueur de l'activation des neutrophiles, nous avons voulu vérifier s'il y avait une production d'IL-8 par les neutrophiles cultivés en absence de signaux; c'est à dire maintenus à l'état « quasi naïf ». Nous avons donc analysés par ELISA la présence d'IL-8 dans les surnageants de neutrophiles cultivés à l'état quasi naïf pour des périodes de 24, 48 et 72 heures comparés à des cellules des mêmes donneurs cultivés en présence de GM-CSF (un inducteur de la production d'IL-8 par les neutrophiles) pour les mêmes temps d'incubation.

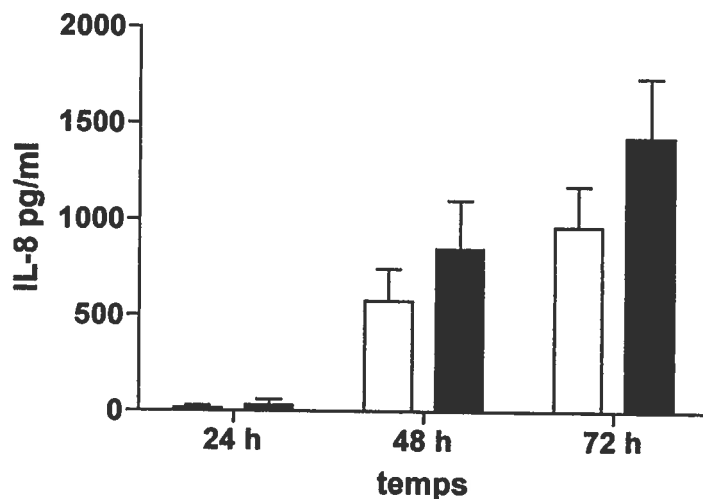


FIGURE 13 : Production d'interleukine-8 par des neutrophiles maintenus en culture *in vitro* prolongée. Les surnageants d'isolats de neutrophiles ultra-purifiés cultivés de 24 à 72 heures sans agonistes (barres blanches) ou en présence de 65 ng/ml de GM-CSF (barres noires) ont été analysés par ELISA pour détecter la présence d'IL-8 (N = 4).

On voit à la figure 12 qu'il n'y a pas de différence significative entre les neutrophiles à l'état quasi naïf et ceux à l'état activés concernant la production d'IL-8. Cela démontre que les neutrophiles cultivés 24 heures et plus en absence de signaux activateurs présentent tout de même une certaine forme d'activation et donc, que ces cellules ne peuvent être vraiment considérées comme étant encore à l'état naïf.

Ceci étant dit, nous avons vu qu'en terme de fonctions inflammatoires, les neutrophiles cultivés à l'état quasi naïf se comportaient différemment des neutrophiles cultivés à l'état activés. Cependant, étant donné que les cellules quasi naïves semblent avoir également certaines propriétés de cellules activées, on pourrait considérer l'état quasi naïf comme un état entre naïf et activé, partageant certaines propriétés avec les deux autres états; un phénomène qui n'est pas sans rappeler le concept de pré-activation.

Comme l'acquisition de marqueurs de cellules présentatrice d'antigènes (CPA) semble être une constante dans les études portant sur les neutrophiles cultivés en présence de signaux activateurs, il est possible que les neutrophiles cultivés à l'état quasi naïf expriment aussi de tels marqueur tout en préservant les propriétés inflammatoires des neutrophiles naïfs. En ce sens, l'équipe de Park et al. ont évalué l'expression des marqueurs CD80, CD83, CD86 et HLA-DR (CMH II) sur des neutrophiles humains maintenus 24 heures en présence ou non de divers composés anti et pro-apoptotiques[8]. Il en ressortait que l'expression de ces marqueurs était différente selon les composés auxquels étaient exposés les neutrophiles, mais que ces

marqueurs étaient également détectables chez les neutrophiles cultivés en absence de signaux, donc à l'état quasi naïf. Rappelons que ces marqueurs ne sont jamais exprimés par les neutrophiles naïfs fraîchement isolés et donc, ces observations viennent renforcer l'idée que les cellules quasi naïves partagent des propriétés avec les cellules activées en ce qui a trait à l'expression de marqueurs associés aux CPA.

Nous avons également vérifié l'expression du HLA-DR, du CD80 et du CD86 chez les neutrophiles cultivés de 24 à 72 heures à l'état quasi naïf comparé aux neutrophiles cultivés en présence GM-CSF, d'IL-4 et de TNF- α , un mélange bien connu pour induire l'expression de ces marqueurs (résultat non présenté). Bien que nos données soient insuffisantes pour l'analyse statistique, nos résultats préliminaires suggèrent que les neutrophiles quasi naïfs expriment le HLA-DR et le CD80, mais pas le CD86, et qu'à l'instar de la production d'IL-8, il n'y a pas de différence entre les cellules quasi naïves et les cellules activées par le mélange de cytokines au niveau de l'expression de ces deux marqueurs par les neutrophiles cultivés.

Tout cela porte à penser que les neutrophiles cultivés *in vitro* en absence de signaux, un état que l'on pourrait désormais désigner « quasi naïf », semble constituer un nouveau phénotype de neutrophiles qui se distingue des cellules naïves fraîchement isolées et des cellules activées en culture par des agents pro-inflammatoires.

Conclusions

Les neutrophiles humains isolés du sang périphérique et cultivés 24 heures en absence de signaux de survie répondent donc à l'instar des cellules fraîchement isolés en regard à leurs fonctions inflammatoires. En ce sens, ces neutrophiles se comportent comme des cellules naïves, mais étant donné qu'ils semblent posséder également certaines propriétés associées aux cellules activées telles que la production d'IL-8 et l'expression de marqueurs de CPA, on doit ainsi les considérer comme un phénotype de neutrophile distinct. Ces cellules que l'on pourrait qualifier de quasi naïves, ou âgées *in vitro*, ou encore pré-activées par la culture, partagent donc des caractéristiques à la fois des neutrophiles naïfs et activés.

Les neutrophiles cultivés 24 heures à l'état quasi naïfs répondent aux agonistes inflammatoires IL-4 et IL-15 de façon similaire aux neutrophiles fraîchement isolés. Les effets du vieillissement en culture *in vitro* n'influence donc pas le comportement des cellules en réponse à ces deux signaux pour les fonctions que nous avons testés. Cependant, comme les neutrophiles quasi naïfs ne se comportent pas comme des cellules naïves à tous les niveaux, on pourrait

penser que le vieillissement en culture aurait possiblement des effets sur d'autres fonctions médiées par les IL-4 et IL-15 comme la synthèse *de novo* des protéines ou la sécrétion de cytokines. Ce principe s'applique sans doute à tous les agonistes du neutrophile puisque rien n'indique qu'un agent ayant tel effet sur les cellules naïves et tel effet sur les cellules activées aurait nécessairement les mêmes effets sur les cellules quasi naïves; rappelons que les effets du fMLP différaient entre les neutrophiles naïfs, quasi naïfs et activés en culture pour les fonctions de dégranulation et de production de ROS.

Nos résultats démontrent que les neutrophiles quasi naïfs répondent comme les cellules naïves après 24 heures de culture *in vitro* pour les fonctions inflammatoires que nous avons testés, sauf pour la production de ROS et la dégranulation en réponse au fMLP. Après 48 heures les neutrophiles semblent encore fonctionnels, mais ne répondent apparemment plus aux agonistes potentialisant ces fonctions. Tel que discuté précédemment, en ce qui a trait à l'adhésion cellulaire, il est probable que la proportion de cellules apoptotiques présentes dans les culture de 48 heures viennent masquer la réponse des cellules vivantes encore aptes à répondre aux agents. Ainsi, en appliquant à cette expérience la méthode de retrait des cellules apoptotiques que nous avons développé pour tester la phagocytose après 48 heures, on pourrait évaluer la réponse des neutrophiles quasi naïfs âgés de 48 heures et il est possible que l'on observerait alors une réponse significative aux agonistes quant à l'adhésion sur un substrat cellulaire. De la même façon, en évaluant la production de ROS et la dégranulation en cytométrie avec des échantillons exempts de cellules apoptotiques et nécrotiques, on pourra confirmer ou infirmer nos conclusions concernant la réponse au fMLP de ces deux fonctions. Pour ce qui est de la chimiotaxie et la phagocytose, il appert que ces fonctions sont respectivement diminuées et exacerbées chez les neutrophiles quasi naïfs cultivés plus de 24 heures.

Ainsi, les neutrophiles humains demeurent fonctionnels plus longtemps qu'on le pensait auparavant et procèdent à des changements phénotypiques en culture *in vitro* même en absence de signalisation par les cytokines.

BIBLIOGRAPHIE

1. El Kebir, D. and J.G. Filep, *Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation*. ScientificWorldJournal, 2010. **10**: p. 1731-48.
2. Hallett, M.B. and D. Lloyds, *Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green'*. Immunol Today, 1995. **16**(6): p. 264-8.
3. Pillay, J., et al., *In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days*. Blood, 2010. **116**(4): p. 625-7.
4. Oehler, L., et al., *Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics*. J Exp Med, 1998. **187**(7): p. 1019-28.
5. Yamashiro, S., et al., *Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(5): p. 698-704.
6. Abdel-Salam, B.K. and H. Ebaid, *Upregulation of major histocompatibility complex class II, CD83, CD64, and CD14 on polymorphonuclear neutrophils stimulated with interleukin-15*. J Microbiol Immunol Infect, 2008. **41**(6): p. 462-8.
7. Chakravarti, A., et al., *Reprogramming of a subpopulation of human blood neutrophils by prolonged exposure to cytokines*. Lab Invest, 2009. **89**(10): p. 1084-99.
8. Park, H.Y., et al., *Expression of dendritic cell markers on cultured neutrophils and its modulation by anti-apoptotic and pro-apoptotic compounds*. Exp Mol Med, 2007. **39**(4): p. 439-49.
9. Caux, C., et al., *Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking*. J Exp Med, 1994. **180**(4): p. 1263-72.
10. Abi Abdallah, D.S., et al., *Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation*. Int Immunol, 2011.
11. Summers, C., et al., *Neutrophil kinetics in health and disease*. Trends Immunol, 2010. **31**(8): p. 318-24.
12. Rankin, S.M., *The bone marrow: a site of neutrophil clearance*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(2): p. 241-51.
13. Ren, Y., et al., *Nonphlogistic clearance of late apoptotic neutrophils by macrophages: efficient phagocytosis independent of beta 2 integrins*. J Immunol, 2001. **166**(7): p. 4743-50.
14. Bazan, J.F., *Haemopoietic receptors and helical cytokines*. Immunol Today, 1990. **11**(10): p. 350-4.
15. Becknell, B. and M.A. Caligiuri, *Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells*. Adv Immunol, 2005. **86**: p. 209-39.
16. Cote-Sierra, J., et al., *Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(11): p. 3880-5.

17. Brown, M.A. and J. Hural, *Functions of IL-4 and control of its expression*. Crit Rev Immunol, 1997. 17(1): p. 1-32.
18. Nelms, K., et al., *The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions*. Annu Rev Immunol, 1999. 17: p. 701-38.
19. Fry, T.J. and C.L. Mackall, *Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis?* Trends Immunol, 2001. 22(10): p. 564-71.
20. Soussi-Gounni, A., M. Kontolemos, and Q. Hamid, *Role of IL-9 in the pathophysiology of allergic diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2001. 107(4): p. 575-82.
21. Fehniger, T.A. and M.A. Caligiuri, *Interleukin 15: biology and relevance to human disease*. Blood, 2001. 97(1): p. 14-32.
22. Bulfone-Paus, S., et al., *Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo*. Nat Med, 1997. 3(10): p. 1124-8.
23. Ozaki, K., et al., *A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production*. Science, 2002. 298(5598): p. 1630-4.
24. Noguchi, M., et al., *Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans*. Cell 73: 147-157. 1993. J Immunol, 2008. 181(9): p. 5817-27.
25. Girard, D., et al., *Effects of interleukin-2 on gene expression in human neutrophils*. Blood, 1995. 86(3): p. 1170-6.
26. Girard, D. and A.D. Beaulieu, *Absence of the IL-7 receptor component CDw127 indicates that gamma(c) expression alone is insufficient for IL-7 to modulate human neutrophil responses*. Clin Immunol Immunopathol, 1997. 83(3): p. 264-71.
27. Girard, D., N. Boiani, and A.D. Beaulieu, *Human neutrophils express the interleukin-15 receptor alpha chain (IL-15Ralpha) but not the IL-9Ralpha component*. Clin Immunol Immunopathol, 1998. 88(3): p. 232-40.
28. Pelletier, M., A. Bouchard, and D. Girard, *In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation*. J Immunol, 2004. 173(12): p. 7521-30.
29. Boey, H., et al., *Interleukin-4 is a neutrophil activator*. J Allergy Clin Immunol, 1989. 83(5): p. 978-84.
30. Musso, T., et al., *Interleukin-15 activates proinflammatory and antimicrobial functions in polymorphonuclear cells*. Infect Immun, 1998. 66(6): p. 2640-7.
31. Girard, D., R. Paquin, and A.D. Beaulieu, *Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis*. Biochem J, 1997. 325 (Pt 1): p. 147-53.
32. Ennaciri, J. and D. Girard, *IL-4R(alpha), a new member that associates with Syk kinase: implication in IL-4-induced human neutrophil functions*. J Immunol, 2009. 183(8): p. 5261-9.
33. Ratthe, C., et al., *Molecular mechanisms involved in interleukin-4-induced human neutrophils: expression and regulation of suppressor of cytokine signaling*. J Leukoc Biol, 2007. 81(5): p. 1287-96.

34. Pelletier, M., C. Ratthe, and D. Girard, *Mechanisms involved in interleukin-15-induced suppression of human neutrophil apoptosis: role of the anti-apoptotic Mcl-1 protein and several kinases including Janus kinase-2, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases-1/2*. FEBS Lett, 2002. **532**(1-2): p. 164-70.
35. Pelletier, M. and D. Girard, *Interleukin-15 increases neutrophil adhesion onto human respiratory epithelial A549 cells and attracts neutrophils in vivo*. Clin Exp Immunol, 2005. **141**(2): p. 315-25.
36. Girard, D., et al., *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, 1996. **88**(8): p. 3176-84.
37. Silva, M.T., A. do Vale, and N.M. dos Santos, *Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications*. Apoptosis, 2008. **13**(4): p. 463-82.
38. Mihalache, C.C., et al., *Inflammation-associated autophagy-related programmed necrotic death of human neutrophils characterized by organelle fusion events*. J Immunol, 2011. **186**(11): p. 6532-42.
39. Leist, M. and M. Jaattela, *Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(8): p. 589-98.
40. Amarante-Mendes, G.P. and D.R. Green, *The regulation of apoptotic cell death*. Braz J Med Biol Res, 1999. **32**(9): p. 1053-61.
41. Redman, S.N., et al., *In situ detection of cell death in articular cartilage*. Methods Mol Med, 2007. **135**: p. 183-99.
42. Albert, M.L., B. Sauter, and N. Bhardwaj, *Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs*. Nature, 1998. **392**(6671): p. 86-9.
43. Rovere, P., et al., *Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function*. J Immunol, 1998. **161**(9): p. 4467-71.
44. Rovere, P., et al., *Remnants of suicidal cells fostering systemic autoaggression. Apoptosis in the origin and maintenance of autoimmunity*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(8): p. 1663-72.
45. Jaeschke, H. and J.J. Lemasters, *Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury*. Gastroenterology, 2003. **125**(4): p. 1246-57.
46. Goldspink, D.F., J.G. Burniston, and L.B. Tan, *Cardiomyocyte death and the ageing and failing heart*. Exp Physiol, 2003. **88**(3): p. 447-58.
47. El-Benna, J., P.M. Dang, and M.A. Gougerot-Pocidallo, *Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane*. Semin Immunopathol, 2008. **30**(3): p. 279-89.
48. Cassatella, M.A., et al., *Lipopolysaccharide primes neutrophils for a rapid response to IL-10*. Eur J Immunol, 2005. **35**(6): p. 1877-85.
49. Muller, W.E., A. Skorokhod, and I.M. Muller, *Receptor tyrosine kinase, an autapomorphic character of metazoa: identification in marine sponges*. Acta Biol Hung, 1999. **50**(4): p. 395-411.

50. von Vietinghoff, S. and K. Ley, *Homeostatic regulation of blood neutrophil counts*. J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5183-8.
51. Lord, J.M., et al., *Neutrophil ageing and immunosenescence*. Mech Ageing Dev, 2001. **122**(14): p. 1521-35.
52. Warner, H.R., *Apoptosis: a two-edged sword in aging*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **887**: p. 1-11.
53. Whyte, M.K., et al., *Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis*. J Immunol, 1993. **150**(11): p. 5124-34.
54. Radsak, M., et al., *Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation*. Immunology, 2000. **101**(4): p. 521-30.
55. Shigematsu, H., et al., *Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin*. Immunity, 2004. **21**(1): p. 43-53.
56. Binet, F., et al., *Arsenic trioxide (AT) is a novel human neutrophil pro-apoptotic agent: effects of catalase on AT-induced apoptosis, degradation of cytoskeletal proteins and de novo protein synthesis*. Br J Haematol, 2006. **132**(3): p. 349-58.
57. Ratthe, C. and D. Girard, *Interleukin-15 enhances human neutrophil phagocytosis by a Syk-dependent mechanism: importance of the IL-15Ralpha chain*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(1): p. 162-8.
58. Simard, J.C., et al., *Damage-associated molecular pattern S100A9 increases bactericidal activity of human neutrophils by enhancing phagocytosis*. J Immunol, 2011. **186**(6): p. 3622-31.
59. Simard, J.C., D. Girard, and P.A. Tessier, *Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism*. J Leukoc Biol, 2010. **87**(5): p. 905-14.
60. Cassatella, M.A., M. Locati, and A. Mantovani, *Never underestimate the power of a neutrophil*. Immunity, 2009. **31**(5): p. 698-700.
61. Giordano, G., et al., *Measurements of cell death in neuronal and glial cells*. Methods Mol Biol, 2011. **758**: p. 171-8.
62. Medina, E., *Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host*. J Innate Immun, 2009. **1**(3): p. 176-80.
63. Hecker, E., et al., *Structure and stereochemistry of the tetracyclic diterpene phorbol from croton tiglium L*. Tetrahedron Letters, 1967. **8**(33): p. 3165-3170.
64. Pontremoli, S., et al., *Participation of protein kinase C in the activation of human neutrophils by phorbol ester*. Ital J Biochem, 1986. **35**(5): p. 368-74.
65. Pontremoli, S., et al., *Differential mechanisms of translocation of protein kinase C to plasma membranes in activated human neutrophils*. Biochem Biophys Res Commun, 1986. **136**(1): p. 228-34.
66. Zhang, Y., et al., *Evaluation of human leukocyte N-formylpeptide receptor (FPR1) SNPs in aggressive periodontitis patients*. Genes Immun, 2003. **4**(1): p. 22-9.

67. Matron, C., et al., *PKC-delta controls the fMLF-induced overproduction of superoxide by neutrophils*. Free Radic Biol Med, 2010. **48**(2): p. 207-15.
68. Borregaard, N., O.E. Sorensen, and K. Theilgaard-Monch, *Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins*. Trends Immunol, 2007. **28**(8): p. 340-5.
69. Kaufman Se Fau - DiPersio, J.F., J.C. DiPersio Jf Fau - Gasson, and J.C. Gasson, *Effects of human GM-CSF on neutrophil degranulation in vitro*. (0301-472X (Print)).
70. Richter, J., T. Andersson, and I. Olsson, *Effect of tumor necrosis factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on neutrophil degranulation*. J Immunol, 1989. **142**(9): p. 3199-205.