

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**RÔLE DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE DANS LA SUPPRESSION DE
L' APOPTOSE DES NEUTROPHILES HUMAINS PAR L' INTERLEUKINE-15**

Par
Amélie Bouchard

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

Jury d' évaluation

Président du jury
et examinateur interne

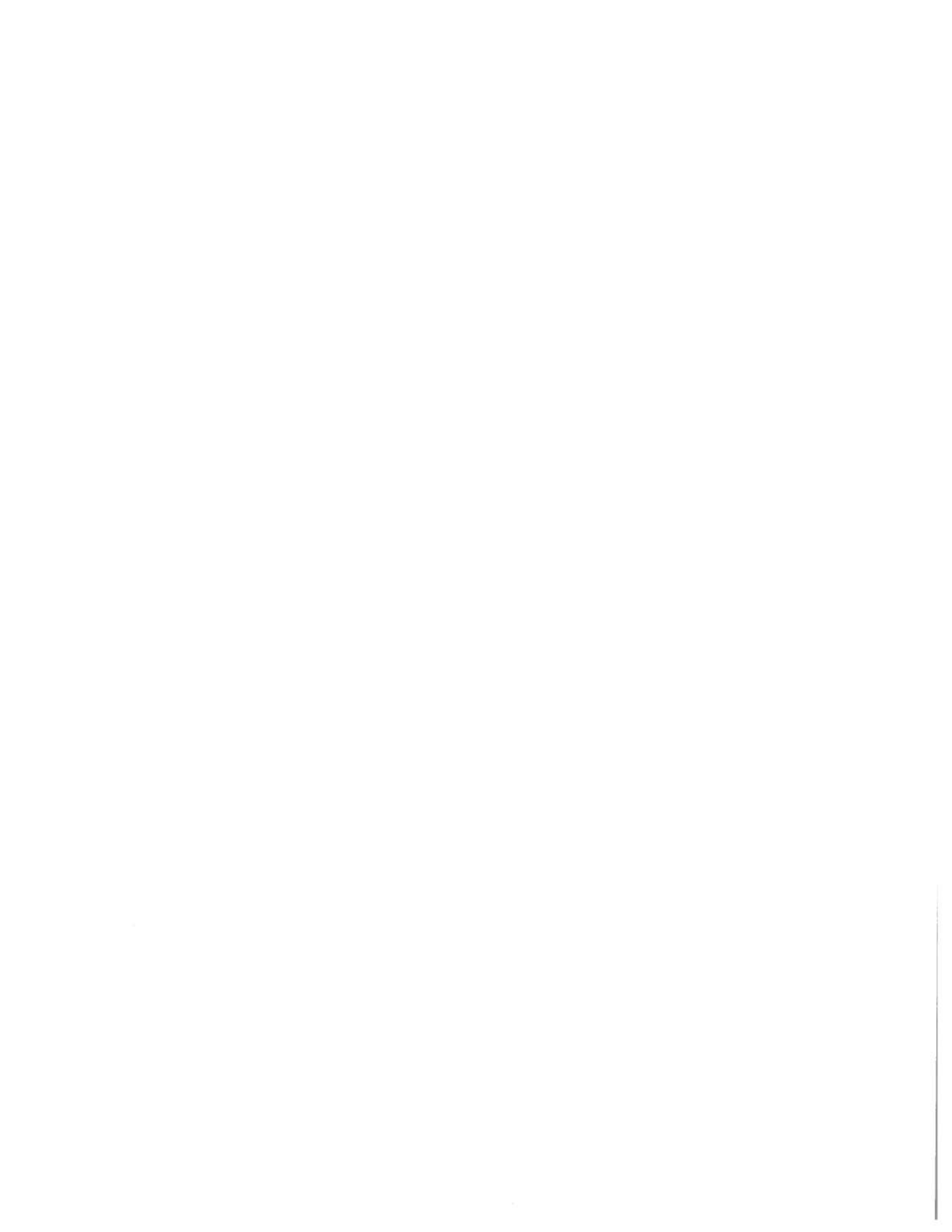
M. Mathieu Cellier, PhD
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

M. Sylvain-Georges Bourgoïn, PhD
Centre de recherche en rhumatologie
et immunologie
CHUL, Université Laval

Directeur de recherche

M. Denis Girard, PhD
INRS-Institut Armand-Frappier



REMERCIEMENTS

Cet ouvrage étant le reflet de deux importantes années de travail, il me serait impossible de ne pas mentionner la contribution des personnes qui m'ont côtoyée durant cette période et m'ont permis de faire de mon passage dans le monde des études graduées un souvenir inoubliable.

Un gros merci à mon directeur de recherche, Denis Girard, pour avoir cru en moi dès le début et m'avoir assistée tout au long de mon séjour dans son laboratoire. Merci Denis pour tout ce que tu m'as appris, tant au niveau technique qu'intellectuel, et pour m'avoir montré à aimer... non, à adorer les neutrophiles. Merci aussi pour m'avoir aidé à garder le sourire durant ces deux ans.

Je voudrais également souligner la collaboration quotidienne de mes consœurs de laboratoire : Valérie Lavastre, Claude Rathé, Eliane Moisan et Sonia Chiasson. Je vous remercie toutes pour vos judicieux conseils, pour les techniques que vous m'avez apprises, pour les longues discussions scientifiques ou non et pour les projets tous plus fous les uns que les autres.

Je n'en serais sûrement pas là si je n'avais pas eu le précieux soutien de mes parents, Raymonde et Marc-André, qui m'ont vue à travers mes joies, mes peines, mes angoisses et mes déceptions. Mille mercis pour avoir eu confiance en moi et m'avoir encouragé dans tout ce que j'ai entrepris.

Finalement, un remerciement particulier à mon collègue et douce moitié que j'adore et admire, Martin Pelletier, pour m'avoir apporté l'équivalent de toutes les autres personnes réunies. Merci donc pour ton soutien, tes enseignements, ton dynamisme, tes conversations, tes encouragements, ta confiance et surtout pour ton amour et ta patience au jour le jour.

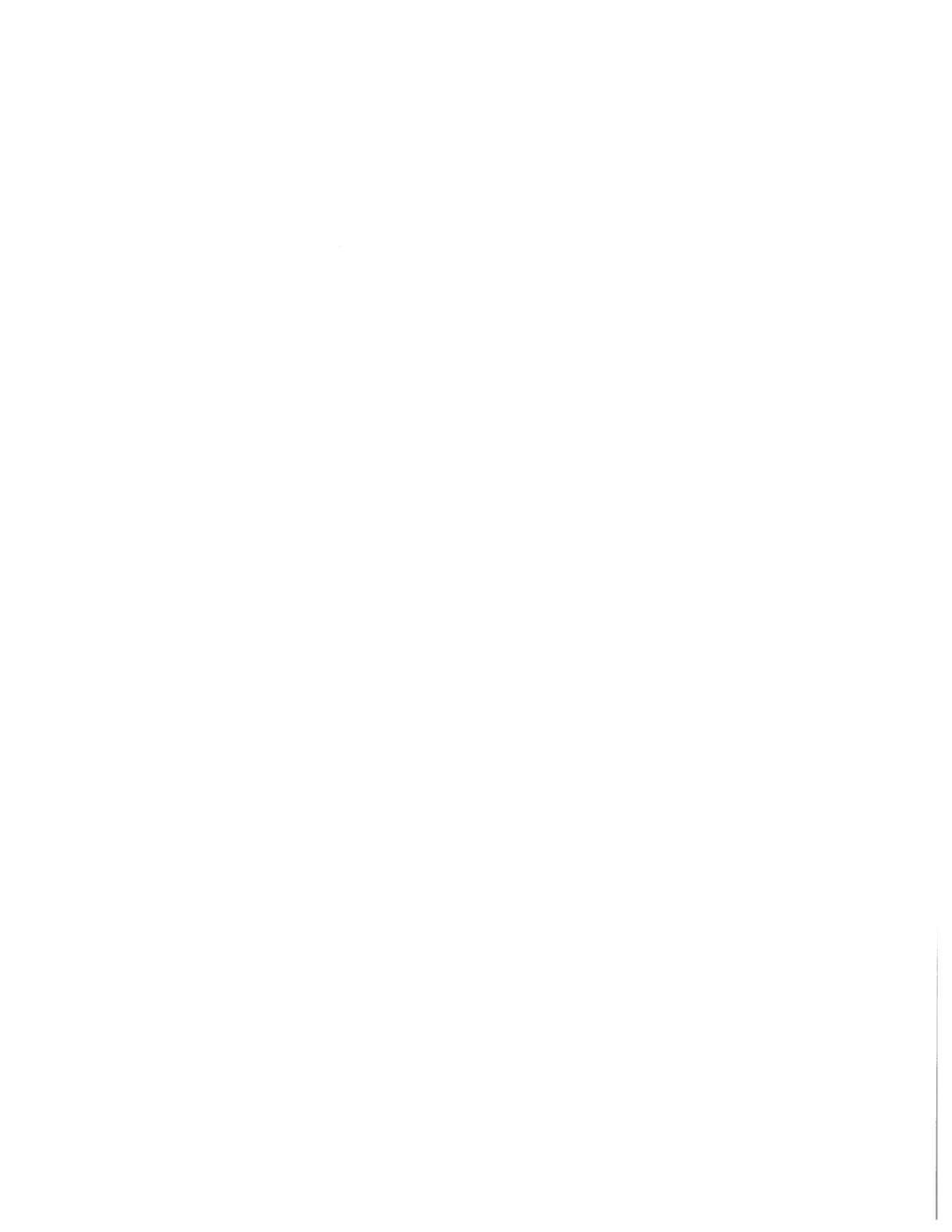


TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	iii
Liste des abréviations	vi
Liste des figures et des tableaux	viii
Résumé	ix
Introduction	1
SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE	3
Chapitre 1 L'apoptose	5
1.1 Les principales caractéristiques de l'apoptose	5
1.2 Les protéines impliquées dans le processus apoptotique	5
1.2.1 Les récepteurs membranaires	6
1.2.2 Les caspases	7
1.2.3 La famille de Bcl-2	8
1.2.4 Les facteurs de transcription	9
1.3 La synthèse protéique lors de l'apoptose	11
1.3.1 L'apoptose requérant une synthèse protéique <i>de novo</i>	12
1.3.2 L'apoptose ne requérant pas de synthèse <i>de novo</i>	12
1.3.3 L'apoptose inhibée par la synthèse <i>de novo</i>	13
1.4 L'apoptose dans le système immunitaire	14
1.4.1 L'apoptose et l'immunité acquise	14
1.4.2 L'apoptose et l'immunité innée	17
Chapitre 2 Le neutrophile : un modèle particulier d'apoptose	21
2.1 Le rôle des neutrophiles dans l'inflammation	21
2.1.1 Les principales fonctions des neutrophiles	21
2.1.2 La synthèse de cytokines et de chimiokines	23
2.2 L'apoptose des neutrophiles	24
2.2.1 Les protéines anti- et pro-apoptotiques présentes chez les neutrophiles ...	25
2.2.2 L'apoptose spontanée des neutrophiles	26
2.2.3 La modulation de l'apoptose des neutrophiles	28
2.2.4 La synthèse protéique lors de l'apoptose des neutrophiles	33
SECTION 2 : ARTICLE	37
Résumé en français de l'article	39
Contribution des auteurs de l'article	40
Texte original de l'article	41
Discussion et conclusion	89
Bibliographie	97
Autres travaux non inclus dans l'article	115

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AICD	mort induite par activation (« activation-induced cell death »)
AIF	facteur induisant l'apoptose (« apoptosis-inducing factor »)
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ARNm	ARN messenger
BCR	récepteur des cellules B (« B cell receptor »)
CD	amas de différenciation (« cluster of differentiation »)
CGD	granulomatose chronique (« chronic granulomatous disease »)
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	cellule présentatrice d'antigène
CR	récepteur du complément (« complement receptor »)
DD	domaine de mort (« death domain »)
DED	domaine effecteur de mort (« death effector domain »)
DIABLO	« direct IAP binding protein with low pI »
DISC	« death-inducing signaling complex »
DNase	désoxyribonucléase
FADD	« Fas-associating protein with death domain »
FcεR	récepteur pour la portion Fc des immunoglobulines de type IgE
FLIP	« FADD-like ICE inhibitory proteins »
fMLP	N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine
G-CSF	« granulocyte colony-stimulating factor »
GM-CSF	« granulocyte-macrophage colony-stimulating factor »
HSP	protéine de choc thermique (« heat shock protein »)
IAP	inhibiteur de l'apoptose
ICE	« interleukin-1β-converting enzyme » = caspase-1
IFN	interféron
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
JAK	« Janus kinase »
LFA-1	« lymphocyte-function-associated antigen-1 »

LPS	lipopolysaccharide
NF- κ B	« nuclear factor kappa-B »
NK	tueuse naturelle (« natural killer »)
NPS	nitroprusside de sodium
NGF	facteur de croissance nerveux (« nerve growth factor »)
PAF	« platelet-activating factor »
PARP	poly (ADP-ribose) polymérase
PECAM	« Platelet-endothelial cell adhesion molecule »
PMN	polymorphonucléaire
RIP	protéines inhibant les ribosomes (« ribosome-inactivating proteins »)
Smac	« second mitochondria-derived activator of caspases »
STAT	« signal transducer and activator of transcription »
TCR	récepteur des cellules T (« T cell receptor »)
TLR	récepteur de la famille TOLL (« TOLL-like receptor »)
TNF	facteur nécrosant les tumeurs (« tumor necrosis factor »)
TRANCE	« TNF-related activation-induced cytokine »
T _c	lymphocyte T cytotoxique
zVAD-fmk	benzyloxycarbonyl-Valine-Alanine-Aspartate-fluorométhylcétone

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

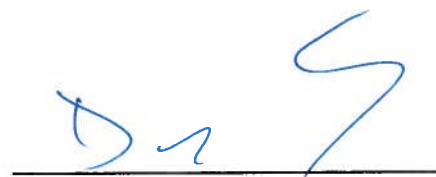
Figure 1 : Schéma général des différentes voies apoptotiques et de leurs principales protéines régulatrices	7
Figure 2 : Rôle de l'apoptose dans le développement des lymphocytes B et T	16
Figure 3 : Régulation de l'apoptose chez les cellules de l'immunité innée	18
Figure 4 : Principales fonctions des neutrophiles dans l'inflammation	22
Figure 5 : Immunobuvardage de type western en deux dimensions de l'IL-1Ra retrouvé dans le surnageant de neutrophiles	115
Figure 6 : Migration sur gel SDS-PAGE 2D de surnageants de neutrophiles marqués au ³⁵ S	116
Figure 7 : Immunoprécipitation de l'IL-1Ra produit par des neutrophiles stimulés à l'IL-15 durant 24 h migrée sur gel SDS-PAGE 2D et colorée au nitrate d'argent.	117
Figure 8 : Pourcentage de neutrophiles apoptotiques après une incubation de 24 h en présence de différents agonistes avec ou sans un excès d'IL-1Ra dans le milieu	117
Tableau 1 : Cytokines et chimiokines produites par les neutrophiles	21

RÉSUMÉ

L'interleukine-15 (IL-15) est une cytokine pro-inflammatoire connue pour retarder l'apoptose spontanée des neutrophiles humains par un mécanisme encore obscur. Les neutrophiles et l'IL-15 ayant un rôle important dans l'inflammation, nous nous sommes penchés sur le mécanisme causant le retard d'apoptose des neutrophiles par l'IL-15. Dans l'étude présentée ici, nous démontrons que l'IL-15 induit la synthèse *de novo* de plusieurs protéines par les neutrophiles, dont une d'environ 23kDa qui semble être prédominante dans le milieu extracellulaire. Nous avons identifié cette protéine comme étant l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1Ra). Nous avons observé que l'IL-15 n'induit pas la production d'IL-1 α ni d'IL-1 β , laissant supposer que la sécrétion d'IL-1Ra n'est pas liée à la modulation de la voie de l'IL-1 chez les neutrophiles. De plus, nous démontrons que l'IL-1Ra ne module pas directement le taux d'apoptose des neutrophiles, même à une concentration 250 fois plus élevée que celle mesurée dans le milieu extracellulaire. Contrairement au surnageant provenant de cellules cultivées en présence de GM-CSF, nous n'avons pu retarder l'apoptose des neutrophiles par l'ajout du surnageant des cellules stimulées à l'IL-15, démontrant que l'IL-15 ne module pas l'apoptose via la production d'un facteur soluble. L'ajout de cycloheximide montre que l'IL-15 retarde l'apoptose via la synthèse *de novo* de protéines intracellulaires, incluant la protéine anti-apoptotique Mcl-1. Une protéine du cytosquelette, la vimentine, est également synthétisée *de novo*, mais pas la vinculine. Par conséquent, malgré que l'IL-15 soit reconnue comme étant une cytokine pro-inflammatoire, nos résultats indiquent que celle-ci peut aussi activer une boucle anti-inflammatoire, étant donné sa capacité à induire la synthèse de l'IL-1Ra qui pourrait inhiber l'effet de l'IL-1 sur d'autres cellules durant l'inflammation *in vivo*. De plus, cette cytokine semble avoir une action directe sur l'apoptose des neutrophiles via la modulation de la synthèse de protéines intracellulaires.



Étudiante



Directeur de recherche



INTRODUCTION

Le processus apoptotique comporte des mécanismes complexes qui ne cessent d'être découverts. Un des aspects de cette complexité est le fait que la régulation de l'apoptose diffère d'un type cellulaire à un autre. Par exemple, les leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles se distinguent du profil général de l'apoptose puisqu'ils meurent spontanément après 24 heures, ils ne possèdent pas toutes les protéines normalement impliquées dans ce mécanisme et la régulation de ces protéines se fait en grande partie au niveau de leur synthèse. Les agents capables de moduler l'apoptose des neutrophiles semblent donc agir au niveau de cette synthèse *de novo*, mais les mécanismes exacts qui sont impliqués restent encore à déterminer.

Dans ce projet, notre attention s'est penchée sur l'interleukine-15 (IL-15), cytokine ayant la capacité de retarder la mort spontanée des neutrophiles. Étant donné sa capacité à induire la synthèse de nouvelles protéines chez ces cellules, nous nous sommes intéressés à identifier ces protéines et à établir le rôle de celles-ci dans le processus apoptotique. Nous avons donc tenté de déterminer si un facteur soluble serait en cause et si des protéines intracellulaires connues pour être impliquées dans l'apoptose sont régulées au niveau de leur synthèse *de novo*.

Ce document comporte deux sections : une première faisant une revue des connaissances actuelles concernant l'apoptose en général et celle des neutrophiles en particulier. L'accent sera d'abord porté sur les différentes protéines impliquées dans le processus apoptotique, le rôle de la synthèse protéique *de novo* dans l'apoptose, ainsi que sur l'importance de l'apoptose dans le système immunitaire. En deuxième lieu, la particularité de l'apoptose des neutrophiles sera mise en évidence à travers leur profil d'expression protéique, leur mort cellulaire spontanée, la modulation de cette dernière et l'importance de la synthèse *de novo* dans ces processus. La deuxième section inclura un article dont je suis l'auteur principal. Par la suite, l'ensemble de cet ouvrage sera synthétisé et analysé dans une discussion. Finalement, quelques résultats obtenus durant ma maîtrise qui ne sont pas inclus dans l'article seront présentés en annexe.



SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

Chapitre 1

L'APOPTOSE

1.1 Les principales caractéristiques de l'apoptose

L'apoptose est un processus biologique important chez les organismes multicellulaires puisqu'elle joue un rôle essentiel dans plusieurs phénomènes physiologiques tels l'embryogenèse, le développement du système nerveux, le maintien de l'homéostasie, la déléation de cellules inopérantes, le vieillissement, etc. Une dérégulation de ce processus peut mener à certaines pathologies telles le cancer, l'immunosuppression, la neurodégénération et les maladies auto-immunes. Il devient donc essentiel d'étudier ce phénomène afin de mieux comprendre et éventuellement guérir ces désordres physiologiques.

Plusieurs stimuli peuvent causer l'apoptose, comme par exemple des radiations, des dommages à l'ADN, un choc thermique ou une signalisation intracellulaire suite à l'engagement de protéines de surface spécialisées. Les caractéristiques les plus importantes de l'apoptose sont une diminution de la taille cellulaire, un bourgeonnement de la membrane plasmique, une perte de l'asymétrie membranaire, une condensation de la chromatine et une dégradation de l'ADN par des endonucléases. L'apoptose se distingue de la nécrose par le fait que les cellules mourant par cette voie restent intactes ou forment des corps apoptotiques. Les cellules en apoptose ou leurs débris sont phagocytés par des cellules avoisinantes suite à une reconnaissance via certains marqueurs de surface. Aucune réaction inflammatoire n'est produite lors de ce processus, faisant de l'apoptose un excellent moyen d'éliminer des cellules indésirables.

1.2 Les protéines impliquées dans le processus apoptotique

L'apoptose est un phénomène physiologique qui découle d'une signalisation intracellulaire via une panoplie de protéines. On divise habituellement le processus

apoptotique en deux phases : une phase d'induction impliquant la réception du signal déclencheur de l'apoptose et l'activation de protéines pro-apoptotiques, suivie d'une deuxième phase, nommée exécution, qui est généralement plus rapide que la première et durant laquelle la dégradation de protéines et de l'ADN conduit inévitablement à la mort cellulaire. On pourrait aussi ajouter à ces procédés un système de régulation s'appliquant à toutes les étapes de l'apoptose. Les principales protéines impliquées dans ces mécanismes sont les récepteurs de surface et les transducteurs de signaux, les caspases, les protéines de la famille de Bcl-2 et les facteurs de transcription. La **figure 1** résume cette signalisation et l'interaction entre les différentes familles de protéines.

1.2.1 Les récepteurs membranaires

Le processus apoptotique débute souvent par un signal reçu par un récepteur de surface tels ceux faisant partie de la famille du TNF/NGF, aussi connus sous le nom de récepteurs de mort. On retrouve dans cette famille Fas (CD95/Apo1) qui, tout comme le récepteur au TNF (TNF-R1), comprend une portion cytoplasmique nommée domaine de mort (« death domain » ou DD). Ce motif d'environ 80 acides aminés est nécessaire à la transmission du signal apoptotique. De façon générale, l'activation des récepteurs comportant des DD se fait via l'oligomérisation de ces récepteurs suscitant le recrutement près de la membrane de protéines adaptatrices capables de s'associer physiquement aux DD via leur propre DD. Par exemple, l'oligomérisation de Fas permet le recrutement à la membrane de la protéine FADD (« Fas-associating protein with death domain ») qui, outre son domaine de mort, possède dans sa partie amino-terminale un autre domaine appelé domaine effecteur de mort (« death effector domain » ou DED), grâce auquel FADD attire à son tour la pro-caspase-8 via le DED de cette dernière. L'ensemble de ces protéines forment avec le récepteur un complexe multiprotéique nommé DISC (« death-inducing signaling complex »). La pro-caspase-8 est activée lorsqu'elle fait partie du DISC, puis la portion active de cette protéase activera la cascade protéolytique des caspases menant à la mort cellulaire. Le recrutement de la caspase-8 peut être bloqué de façon compétitive par les protéines c-FLIP (Schulze-Osthoff et al., 1998 : 439).

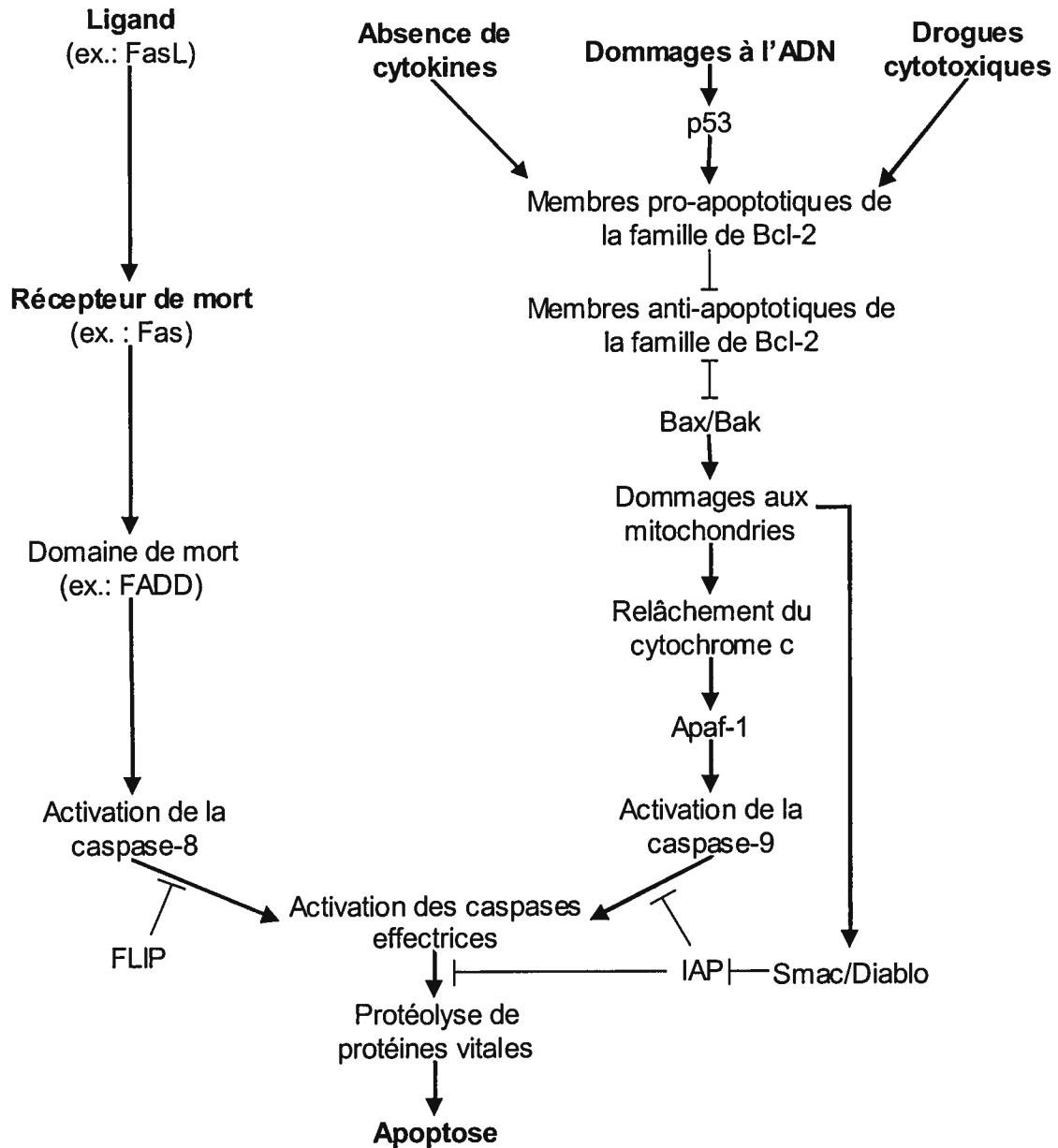


Figure 1 : Schéma général des différentes voies apoptotiques et de leurs principales protéines régulatrices

(Inspiré de Marsden et Strasser, 2003)

1.2.2 Les caspases

Les caspases, nommées ainsi puisque qu'elles sont des protéases à cystéine clivant après un résidu aspartique (« cysteinyl aspartate-specific proteases »), font partie intégrante de la machinerie apoptotique. Elles sont généralement présentes sous la forme inactive de

pro-caspases (ou zymogènes) qui doivent être clivées en réponse à un stimulus apoptotique pour devenir catalytiquement actives. Lors de la réception d'un signal apoptotique, les caspases dites initiatrices sont recrutées et sont ensuite activées. Une cascade d'activation s'ensuit généralement, les caspases initiatrices recrutant et clivant les caspases exécutrices afin de les activer à leur tour. Les caspases exécutrices ont comme rôle de cliver directement plusieurs protéines vitales et d'activer d'autres enzymes qui contribueront elles aussi à l'arrêt du cycle cellulaire et de la prolifération, la dégradation de l'ADN et le démantèlement du cytosquelette. L'activité des caspases semble être régulée par plusieurs voies : au niveau des récepteurs contenant des domaines de mort, au niveau transcriptionnel, via le relâchement de cytochrome *c* par les mitochondries, via des modifications post-transcriptionnelles et via des interactions avec les protéines de la famille des inhibiteurs de l'apoptose (IAP). Ces dernières peuvent être, à leur tour, inhibées par la protéine Smac/DIABLO, tel que montré à la **figure 1**.

L'activation des caspases est généralement perçue comme étant indispensable à l'exécution du processus apoptotique, mais il est aussi possible de causer certains aspects de l'apoptose sans activer les caspases, entre autres via des protéines de la famille de Bcl-2. En effet, l'inhibiteur général des caspases zVAD-fmk est incapable d'empêcher l'apoptose causée par une surexpression de Bax, mais peut bloquer celle induite par Fas (Xiang, Chao et Korsmeyer, 1996 : 14559). De plus, le facteur AIF et l'endonucléase G peuvent tous les deux induire des changements nucléaires reliés à l'apoptose sans nécessiter l'activation des caspases (Susin et al., 1999 : 441 ; Li, Luo et Wang, 2001 : 95). Cependant, ces deux protéines sont incapables d'entraîner l'exposition des phosphatidylsérines ou la dégradation de protéines cytosoliques. Ces événements sont d'ailleurs tous les deux bloqués par l'inhibiteur z-VAD-fmk, laissant supposer que ces caractéristiques de l'apoptose requièrent l'activité enzymatique des caspases.

1.2.3 La famille de Bcl-2

Les membres de la famille de Bcl-2 jouent un rôle clé dans la régulation de l'apoptose. En effet, une des protéines anti-apoptotiques les plus étudiées est sans aucun doute Bcl-2 elle-même. Bcl-2 est un important inhibiteur de l'apoptose dont les multiples fonctions

vont du contrôle du relâchement du cytochrome *c* (Kluck et al., 1997 : 1132) à la modulation des mécanismes antioxydants (Hockenbery et al., 1993 : 241). Ainsi, cette protéine peut empêcher l'apoptose induite par une grande variété de stimuli, dont les radiations ionisantes, la chaleur, l'absence de facteurs de croissance et, dans certains cas, l'activation de récepteurs de surface (Sentman et al., 1991 : 879). La famille de Bcl-2 contient d'autres molécules anti-apoptotiques telles A1, Bcl-w, Bcl-x_L, Boo et Mcl-1, mais aussi des protéines pro-apoptotiques : Bad, Bax, Bak, Bcl-G_S, Bcl-rambo, Bcl-x_S, Bid, Bik, Bim, Blk, Bmf, Bnip3, Bok, EGL-1, Hrk, Noxa et PUMA. Les molécules anti-apoptotiques siègeraient au niveau de la membrane externe mitochondriale, tandis que les protéines pro-apoptotiques posséderaient une localisation différente (cytosol ou microtubules). À la suite d'un signal apoptotique, ces dernières s'inséreraient dans la membrane mitochondriale et induiraient sa perméabilisation (Crompton, 2000 : 414). Les différents membres de la famille de Bcl-2 ont la capacité de former des hétérodimères et ainsi contrôler leur action réciproque. La balance entre le niveau de protéines pro- et anti-apoptotiques contrôlerait ainsi en partie l'activation du processus d'apoptose. Cependant, il a été observé que le niveau d'expression des protéines de la famille de Bcl-2 n'est pas toujours directement lié à la susceptibilité des cellules à la mort programmée (Jaattela, 1999 : 30). Ceci laisse croire que ces régulateurs peuvent aussi être sujets à des modifications post-transcriptionnelles ou des interactions avec des protéines autres que celles de leur propre famille. Il est aussi important de considérer la localisation intracellulaire des protéines puisque, par exemple, l'expression de Bax à elle seule n'est pas létale pour les cellules, alors qu'il a été démontré que sa translocation vers la mitochondrie est une étape importante pour l'induction de l'apoptose (Wolter et al., 1997 : 1281).

1.2.4 Les facteurs de transcription

La panoplie de facteurs influençant l'expression de protéines impliquées dans l'apoptose ne cesse de se complexifier. L'activité de ces facteurs devient cruciale afin de réguler les niveaux intracellulaires des protéines pro- et anti-apoptotiques. On retrouve un très grand nombre de facteurs ayant un rôle à jouer dans l'apoptose. Les quelques exemples cités ici sont probablement les plus représentatifs.

NF- κ B est bien connu pour augmenter l'expression de plusieurs protéines impliquées dans l'immunité, l'inflammation ou la prolifération cellulaire, telles certaines cytokines, chimiokines, facteurs de croissance hématopoïétique, protéines de la phase aiguë et molécules d'adhésion. NF- κ B est un terme générique désignant les facteurs de transcription dimériques appartenant à la famille de Rel (NF- κ B1, NF- κ B2, RelA, RelB et c-Rel) qui sont régulés par un va-et-vient entre le cytoplasme et le noyau en réponse à une stimulation cellulaire. Le rôle de NF- κ B dans l'apoptose n'est pas clairement défini, puisque les résultats publiés jusqu'à maintenant sont contradictoires. Selon le contexte, NF- κ B pourrait soit activer l'apoptose soit l'empêcher, puisqu'il participe à la transcription de plusieurs gènes codant pour des protéines connues pour protéger ou non les cellules de l'apoptose. On note entre autres une augmentation de l'expression de protéines telles que certaines IAP, c-FLIP, TRAF1, TRAF2 et A1 par NF- κ B (Wang et al., 1998 : 1680 ; Lee et al., 1999 : 9136).

On a dénommé STAT (« signal transducers and activators of transcription ») les facteurs de transcription impliqués dans les processus inflammatoires et apoptotiques activés par les tyrosines kinases JAK (« Janus kinases »). La famille des STAT compte aujourd'hui sept membres : STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5a, STAT-5b et STAT-6. Lorsque phosphorylés sur des résidus tyrosine, les STAT forment des homodimères ou des hétérodimères qui se dirigent vers le noyau où ils augmentent la transcription de gènes contrôlant des mécanismes cellulaires importants, tels la prolifération, le développement, l'apoptose et les réponses immunitaires. Quelques protéines anti-apoptotiques sont reconnues pour être transcrites par les STAT. Par exemple, l'activation de STAT-3 et STAT-5 induit la transcription de Bcl-x_L (Bromberg et al., 1999 : 295) et de Mcl-1 (Epling-Burnette et al., 2001 : 351). De plus, STAT-3 augmente aussi l'expression de c-Myc, lui-même un facteur de transcription ayant des propriétés proto-oncogènes.

AP-1 a été l'un des premiers facteurs de transcription à être identifié, mais ses fonctions exactes sont toujours à définir. AP-1 n'est pas une seule protéine, mais plutôt un ensemble de dimères faisant partie des sous-familles de Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos

(c-Fos, FosB, Fra-1 et Fra2), Maf (c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K and Nrl) et ATF (ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1, JDP2). L'activité transcriptionnelle d'AP-1 est associée autant à l'induction de l'apoptose qu'à sa protection, selon le type cellulaire et le stade de développement. L'effet différentiel d'AP-1 pourrait être expliqué par le fait que l'induction d'AP-1 cause l'activation de différents gènes codant pour des régulateurs positifs ou négatifs de l'apoptose, comme Fas, FasL, p53, Bim ou Bcl-3, un membre de la famille de IκB, des inhibiteurs de NF-κB (Rebollo et al., 2000 : 3407 ; Shaulian et Karin, 2001 : 2390 ; Shaulian et Karin, 2002 : E131-E136). La balance entre les gènes pro-apoptotiques et anti-apoptotiques dépendrait du type cellulaire ainsi que du stimulus activant AP-1 et les autres facteurs de transcription.

1.3 La synthèse protéique lors de l'apoptose

La présence de facteurs de transcription pouvant réguler la balance apoptotique laisse croire que certaines protéines impliquées dans le processus de mort cellulaire doivent être synthétisées *de novo* dans certaines circonstances. En 1991, Cohen divisait les mécanismes causant l'apoptose en trois catégories : une première qui nécessite l'induction d'une synthèse protéique, une deuxième qui est indépendante de la synthèse protéique, reposant donc sur une modification des protéines existantes, et une troisième pour laquelle un blocage de la synthèse protéique cause l'apoptose (Cohen, 1991 : 55). Cette division propose que le rôle de la synthèse protéique lors du processus apoptotique dépendrait entre autres du type cellulaire. Les cellules nécessitant une longévité élevée, tels les thymocytes, doivent recevoir un stimulus externe afin de synthétiser les protéines nécessaires à l'exécution de l'apoptose. D'autres types cellulaires, par contre, ont déjà en permanence la machinerie apoptotique et un stimulus externe ne fait qu'activer cette machinerie par activation des protéines existantes. Finalement, certaines cellules dont la vie se doit d'être de courte durée, ont besoin d'une stimulation afin de rester en vie. La machinerie apoptotique est non seulement présente dans ces cellules, mais déjà active.

1.3.1 L'apoptose requérant une synthèse protéique *de novo*

Puisque l'apoptose est un processus actif, il est logique de penser qu'une synthèse protéique *de novo* est essentielle à son exécution. Plusieurs laboratoires ont confirmé cette hypothèse en observant que la cycloheximide et l'actinomycine D, des inhibiteurs de la traduction et de la transcription respectivement, pouvaient entraver la mort programmée de plusieurs types cellulaires. Par exemple, chez les thymocytes, la cycloheximide et l'actinomycine D bloquent tous les deux l'apoptose induite par des glucocorticoïdes (Wyllie et al., 1984 : 67). Le même phénomène a été constaté chez des neurones (Martin et al., 1988 : 829) et des hybridomes de lymphocytes T (Shi et al., 1990 : 3326). Il reste donc à identifier la nature des protéines devant être synthétisées lors de l'apoptose. Une hypothèse serait que la synthèse d'endonucléases nécessaires à la dégradation de l'ADN serait requise, puisque certaines cellules n'exprimeraient pas ces enzymes (Cohen, 1991 : 55). Par contre, certaines cellules exprimeraient déjà les endonucléases nécessaires à l'exécution de l'apoptose, ce qui suggère que les protéines synthétisées *de novo* seraient en fait celles requises pour l'activation de ces endonucléases (Alnemri et Litwack, 1989 : 4104). C'est le cas entre autres des ostéoblastes qui, en présence de nitroprusside de sodium (NPS), un agent qui mène à la production d'oxyde d'azote, augmentent leur expression de Bax (Chen et al., 2002 : 295). Chez ces cellules, l'ajout de cycloheximide avant la stimulation au NPS bloque en partie l'apoptose causée par ce dernier, démontrant l'importance de la synthèse protéique *de novo*, et en particulier celle de Bax, dans ce processus.

1.3.2 L'apoptose ne requérant pas de synthèse *de novo*

D'autres études ont démontré que la synthèse de protéines n'était pas requise à l'apoptose. En effet, l'activation des caspases exécutrices survient généralement suite à une activation des caspases initiatrices et peut donc avoir lieu en absence de synthèse protéique *de novo*. Un excellent exemple de ce type de mort cellulaire est la cytotoxicité dépendante des lymphocytes T. En effet, les lymphocytes T cytotoxiques se doivent d'éliminer une cellule infectée le plus rapidement possible afin de limiter la réplication virale. Pour ce faire, l'engagement de Fas ou du TNFR-1 avec leur ligand respectif (FasL

ou TNF- α) induit une cascade de signalisation activant rapidement les caspases et causant l'apoptose. Les lymphocytes peuvent aussi libérer des granules cytotoxiques contenant des perforines et des granzymes qui activent directement les endonucléases dégradant l'ADN sans nécessiter une synthèse protéique *de novo*. C'est également ce qui a été remarqué chez des cellules musculaires lisses dont le taux d'apoptose n'était pas changé par l'ajout de cycloheximide ou d'actinomycine D (Taurin et al., 2002 : 254). De plus, la même équipe a remarqué qu'une élévation intracellulaire de l'AMPc retardait l'apoptose induite par le manque de sérum chez ces cellules, mais ce phénomène n'était pas influencé par l'ajout d'inhibiteurs de transcription ou de traduction. Il a aussi été observé que l'apoptose induite par des dérivés de la vitamine A (ou rétinoïdes) chez les lymphocytes T ne dépendait pas de la synthèse de protéines ni d'ARN, mais plutôt d'une activation directe des caspases (Piedrafita et Pfahl, 1997 : 6348). Ceci laisse donc croire que l'activation ou la modification post-transcriptionnelle de protéines déjà présentes dans la cellule peut être suffisante à l'exécution du mécanisme apoptotique ou à son blocage.

1.3.3 L'apoptose inhibée par la synthèse *de novo*

Dans certains cas, il a été observé que la cycloheximide et l'actinomycine D à elles seules pouvaient induire l'apoptose, suggérant que certaines cellules requièrent une synthèse protéique constante pour échapper à la mort programmée. C'est le cas entre autres des neutrophiles, dont l'apoptose est accélérée par la cycloheximide et l'actinomycine D (Brach et al., 1992 : 2920). Le même effet pro-apoptotique des inhibiteurs de transcription et de traduction a été observé chez des hépatocytes (Ledda-Columbano et al., 1992 : 545), des lymphocytes B (Collins et al., 1991 : 518), des macrophages (Lewis, Adams et Fan, 1995 : 635), ainsi que chez les lignées cellulaires HL-60 (Martin et al., 1990 : 1859) et U937 (Kochi et Collier, 1993 : 296). Il a aussi été démontré que la synthèse protéique *de novo* est induite lors d'une hausse légère de la température et serait nécessaire à la tolérance à la chaleur conférée par cette pré-incubation (Poe et O'Neill, 1997 : 510). La synthèse de protéines de stress, en particulier les protéines de choc thermique (« heat shock proteins » ou HSP), serait probablement en cause lors de ce phénomène. De plus,

contrairement aux thymocytes qui nécessitent une synthèse protéique lors de l'apoptose, les inhibiteurs de transcription ou de traduction accélèrent l'apoptose de lymphocytes T matures plutôt que de l'empêcher (Bazar et Deeg, 1992 : 80 ; Martin, 1993 : 125), laissant croire que la machinerie apoptotique diffère selon le niveau de maturité des cellules. C'est d'ailleurs ce qu'ont conclu Rehen et collaborateurs en observant l'apoptose de l'ensemble des cellules de la rétine (Rehen et al., 1996 : 1439). En effet, l'inhibition de la synthèse protéique dans le tissu rétinien de jeunes rats a eu des effets contraires sur différentes couches cellulaires qui, selon eux, seraient à différents stades de différenciation. Par contre, chez la rétine de rats adultes, l'ajout de cycloheximide n'a eu aucun effet sur l'ensemble des cellules. Ils ont donc conclu que les cellules plus matures perdaient leur dépendance à la synthèse de protéines clés pour l'exécution de l'apoptose.

1.4 L'apoptose dans le système immunitaire

La régulation de l'apoptose est essentielle au bon fonctionnement du système immunitaire, tant pour le maintien du nombre de cellules en circulation que pour la déletion des cellules autoréactives ou indésirables après une réponse immune. Au niveau de l'immunité acquise, l'apoptose intervient principalement lors du processus de différenciation des lymphocytes B et T et lors de l'élimination de ces cellules suite à leur activation. Les lymphocytes T et les cellules NK sont aussi à l'origine de l'apoptose des cellules infectées. De plus, l'apoptose permet l'élimination des leucocytes ayant été impliqués dans une réponse inflammatoire lorsque cette dernière est contrôlée.

1.4.1 L'apoptose et l'immunité acquise

Les cellules de l'immunité acquise ou spécifique regroupent les lymphocytes B et T. Ces cellules ont la particularité d'avoir à leur surface un récepteur reconnaissant un antigène spécifique, leur procurant ainsi la capacité de distinguer le soi du non-soi. Les lymphocytes sont sujets à l'apoptose lors de leur maturation et suite à leur activation, tel qu'illustré à la **figure 2**. En fait, la majorité des lymphocytes en développement sont destinés à mourir avant d'atteindre la maturité. Puisque le répertoire des lymphocytes B et

T est produit suite à une série de réarrangements et de mutations aléatoires des gènes de leurs récepteurs, la plupart de ces cellules ne génèreront pas de récepteurs fonctionnels et seront naturellement éliminées par apoptose. D'autres lymphocytes T seront éliminés dans le thymus durant un mécanisme nommé sélection positive s'ils ne possèdent pas un récepteur capable de lier le CMH autologue. Les lymphocytes restant peuvent, dans certains cas, posséder un récepteur spécifique pour des antigènes de l'hôte, les rendant potentiellement auto-réactifs. Ces cellules seront aussi éliminées par apoptose, un processus nommé sélection négative (Shortman et al., 1990 : 3 ; Nossal, 1994 : 229). La régulation de l'apoptose durant la maturation des lymphocytes semble s'effectuer principalement via l'expression de Bcl-2 (Marsden et Strasser, 2003 : 71).

Les lymphocytes matures peuvent aussi être éliminés par apoptose suite à leur activation et leur expansion clonale. Une régulation stricte du nombre de lymphocytes se retrouvant en périphérie doit être maintenue afin d'éliminer les cellules lorsqu'elles ne sont plus nécessaires. Les lymphocytes B doivent recevoir un signal provenant de leur récepteur (BCR) et un de leurs co-récepteurs comme le CD40 pour être activés et proliférer. Cette synergie entre les deux types de stimulation s'explique par le fait que la liaison du CD40 avec son ligand occasionne une augmentation de l'expression de Fas. Sans une stimulation provenant du BCR, les cellules B deviennent ainsi plus vulnérables à l'apoptose par Fas. Cependant, les cellules B recevant à la fois un signal du BCR et du CD40 sont protégées de l'apoptose par Fas et peuvent proliférer et se différencier en plasmocytes (Rothstein et al., 1995 : 163). Les plasmocytes se dirigeront ensuite vers les centres germinaux où les gènes des Ig subiront des mutations somatiques, créant ainsi des anticorps ayant une plus grande ou une plus faible affinité pour un antigène donné. Dans le second cas, les cellules seront encore une fois éliminées par apoptose afin de maintenir un répertoire de cellules B mémoires relativement restreint pour éviter des désordres liés aux complexes immuns (Marsden et Strasser, 2003 : 71).

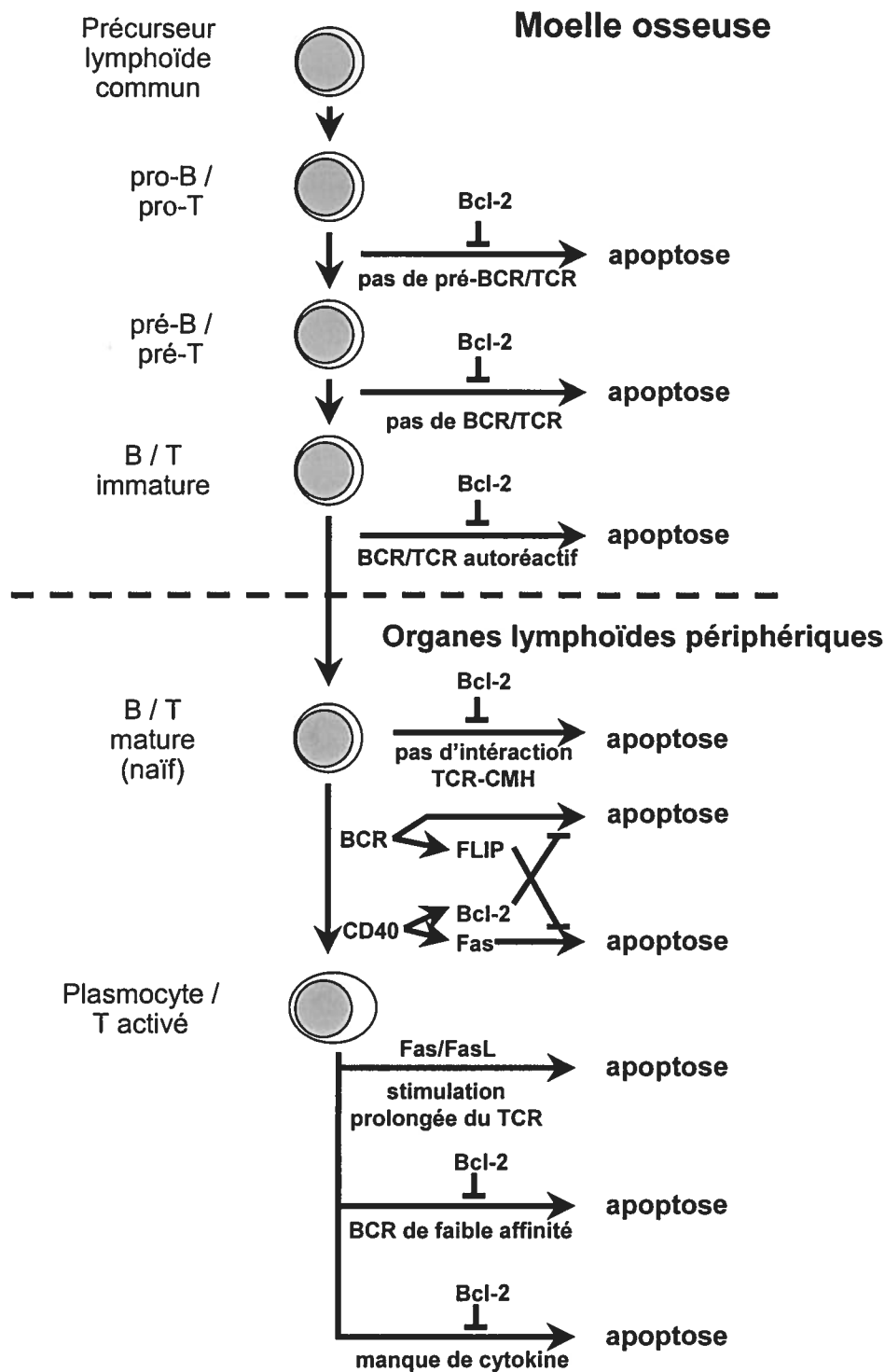


Figure 2 : Rôle de l'apoptose dans le développement des lymphocytes B et T

(Inspiré de Marsden et Strasser, 2003)

De leur côté, les lymphocytes T matures recevant une stimulation via leur TCR sont sujets à une activation et une prolifération qui sont accompagnées d'une production d'IL-2 (Vella et al., 1998 : 3810). Les lymphocytes T activés deviennent alors dépendants de l'IL-2 et de l'IL-15 pour leur survie et leur prolifération (Li et al., 2001 : 114). L'absence de ces cytokines lors de la résolution de l'inflammation occasionne donc l'apoptose des lymphocytes surnuméraires. Une seconde façon d'éliminer les lymphocytes T suite à leur prolifération se fait directement via le TCR. Une stimulation prolongée ou répétée du TCR sensibilise les cellules T à l'apoptose par Fas, un phénomène nommé mort induite par activation (« activation-induced cell death » ou AICD). En effet, les lymphocytes T activés sont d'abord réfractaires à l'apoptose par Fas, mais à long terme ces cellules augmentent leur expression de Fas et FasL, occasionnant une sorte de suicide collectif (Alderson et al., 1995 : 71 ; Strasser, 1995 : 385).

Il est à noter que les lymphocytes T cytotoxiques (T_c) peuvent eux-mêmes causer l'apoptose de cellules infectées. Ceci s'effectue entre autres via la diffusion de granules cytotolytiques dans l'espace intercellulaire. Ces granules contiennent entre autres des estérases, ou granzymes, capables d'activer les caspases et une protéine capable de perforer la membrane cytoplasmique nommée perforine. Le relâchement des granules s'effectue très rapidement puisque les T_c emmagasinent des enzymes cytotoxiques dans des granules prêts à être sécrétés. Il est aussi possible de détruire des cellules infectées par la liaison de Fas ou de TNF-R1 par leur ligand, tel que mentionné précédemment. Les T_c agissent de façon sélective, c'est-à-dire qu'ils ne tuent que les cellules présentant à leur surface un antigène pouvant être reconnu par le TCR. De plus, la liaison du TCR avec un complexe CMH-antigène induit la synthèse *de novo* de perforine et de granzymes afin de renouveler les réserves et pouvoir tuer rapidement d'autres cellules (Janeway et al., 99 : 293-296).

1.4.2 L'apoptose et l'immunité innée

Les cellules de l'immunité innée, aussi dénommée non spécifique ou naturelle, comprennent les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles, regroupés sous le nom de granulocytes ou leucocytes polymorphonucléaires (PMN), les monocytes, les

macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes et les cellules NK. Ces leucocytes jouent un rôle critique dans l'inflammation, la phagocytose des pathogènes et la présentation d'antigènes au lymphocytes T. L'activité de ces cellules est en partie contrôlée par la modulation de leur apoptose. Cette modulation diffère d'un type cellulaire à un autre, tel que le démontre la **figure 3**.

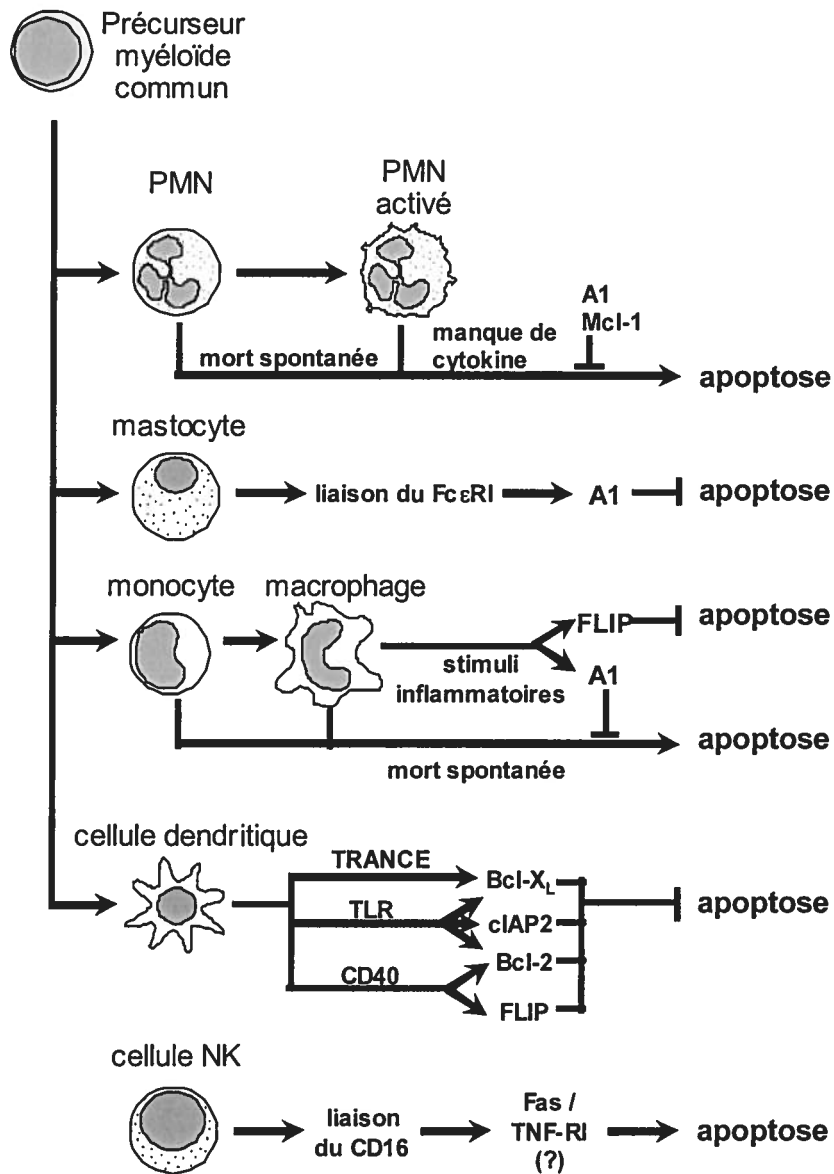


Figure 3 : Régulation de l'apoptose chez les cellules de l'immunité innée

(Inspiré de Marsden et Strasser, 2003)

Contrairement aux lymphocytes, les cellules myéloïdes n'ont pas à subir de sélection durant leur développement, étant donné qu'elles n'ont pas de récepteur spécifique pour le non-soi. Par contre, les cellules myéloïdes, en particulier les PMN, ont une durée de vie beaucoup plus courte que les lymphocytes, puisqu'elles peuvent causer des dommages importants à l'organisme si elles sont présentes en trop grand nombre ou pour une période prolongée. Les granulocytes ont une durée de vie d'environ 24 heures suite à laquelle ils mourront par apoptose spontanée. Cependant, leur survie peut être allongée en présence de facteurs pro-inflammatoires. Les mécanismes régulant l'apoptose spontanée des PMN ne sont pour l'instant pas très bien définis, mais les protéines de la famille de Bcl-2 telles que Mcl-1 et A1 semblent être des effecteurs importants puisque leur expression est induite par des facteurs de survie tels le G-CSF et le GM-CSF (Chuang et al., 1998 : 361 ; Moulding et al., 1998 : 2495 ; Epling-Burnette et al., 2001 : 7486). Le chapitre 2 traitera plus en profondeur de l'apoptose des neutrophiles, le sujet principal de nos études.

La protéine A1 semble aussi être indispensable à la survie des mastocytes. Ces leucocytes, principalement impliqués dans les défenses muco-sales et les réactions allergiques, sont activés suite à la liaison de leur récepteur FcεRI par des anticorps de type IgE. Cette liaison occasionne le relâchement de médiateurs inflammatoires, mais aussi l'augmentation de l'expression de A1 (Xiang et al., 2001 : 1561).

Tout comme pour les granulocytes, l'apoptose spontanée des monocytes et des macrophages est régulée en partie par les protéines A1 et Mcl-1 en conditions inflammatoires (Daigle et Simon, 2001 : 147). Par contre, ces cellules peuvent également être tuées par les lymphocytes T via la liaison de Fas (Ashany et al., 1995 : 11225). Les macrophages activés sont moins vulnérables à ce type d'apoptose puisqu'ils surexpriment la protéine FLIP afin de bloquer l'activation de la caspase-8 (Perlman et al., 1999 : 1679).

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) professionnelles qui servent de sentinelles pouvant recueillir des échantillons de leur environnement avant leur maturation pour pouvoir migrer dans les organes lymphoïdes où elles pourront présenter ces antigènes aux lymphocytes. Leur apoptose est contrôlée

par des facteurs solubles émis par les lymphocytes T tels que le CD40L et la cytokine TRANCE. La liaison du CD40 induit l'expression de Bcl-2 et diminue la sensibilité à l'apoptose par les récepteurs de mort via l'expression de FLIP (Bjorck, Banchereau et Flores-Romo, 1997 : 365 ; Ashany et al., 1999 : 5303), alors que TRANCE augmente l'expression de Bcl-X_L (Wong et al., 1997 : 2075). De plus, une signalisation via les récepteurs de la famille Toll (« Toll-like receptor » ou TLR) occasionne une augmentation de Bcl-2, Bcl-X_L et de certaines IAP (Park, Lee et Sung, 2002 : 5).

Finalement, les cellules NK sont des leucocytes dont les activités cytotoxiques sont essentielles à la réponse immunitaire contre les tumeurs, les bactéries intracellulaires et les infections virales. Malgré qu'elles aient un précurseur commun avec les lymphocytes T, les cellules NK n'expriment ni le CD3 ni un TCR. Ces cellules ont cependant des récepteurs capables de différencier les CMH autologues et non autologues, ce qui leur permet d'activer ou non leur toxicité cellulaire et la sécrétion de cytokines. Cette cytotoxicité s'effectue de manière semblable à celle causée par les lymphocytes T_c, soit par le relâchement de granules contenant des perforines et des granzymes ou via la liaison de Fas ou TNF-R (Warren et Smyth, 1999 : 64). Tout comme les lymphocytes T, les cellules NK sont aussi sujets à une apoptose suite à leur activation. En effet, suite à une interaction avec une cellule cible, la signalisation provenant de leurs récepteurs activateurs se change en un signal apoptotique. Le mécanisme par lequel ces leucocytes meurent est encore controversé et peut impliquer ou non la liaison de Fas/FasL ou de TNF- α /TNF-RI (Eischen et al., 1996 : 2693 ; Ortaldo et al., 1997 : 209 ; Jewett, Cavalcanti et Bonavida, 1997 : 4815 ; Ida et Anderson, 1998 : 1292).

Chapitre 2

LE NEUTROPHILE : UN MODÈLE PARTICULIER D' APOPTOSE

2.1 Le rôle des neutrophiles dans l'inflammation

L'inflammation est une réaction qui est généralement induite en réponse à un dommage infligé aux tissus de l'organisme. Ces dommages peuvent être causés par une infection microbienne ou des agents physiques et chimiques. Les neutrophiles ont un rôle capital dans le processus inflammatoire puisqu'ils peuvent répondre rapidement à l'invasion de micro-organismes, en particulier des bactéries. Étant donné leur nombre considérable dans la circulation sanguine (ils sont les leucocytes les plus abondants) et leur rapidité à répondre à un stimulus chimioattractant, les neutrophiles sont les premières cellules à quitter la circulation sanguine et à s'accumuler au site inflammatoire. Leurs activités phagocytaires et antimicrobiennes assurent une élimination efficace des microbes.

2.1.1 Les principales fonctions des neutrophiles

Lors d'une infection, divers facteurs chimioattractants sont relâchés par les micro-organismes invasifs ou les cellules de l'hôte en réponse à cette agression. Parmi ces facteurs, on note entre autres le GM-CSF, l'IL-8, le TNF- α , le leucocyte B₄ et l'élément C5a du système du complément. Les neutrophiles attirés par la présence de chimioattractants adhèrent fermement à la membrane endothéliale et traversent cette dernière en se comprimant dans l'interstice entre des cellules adjacentes. Cette transmigration des leucocytes à travers l'endothélium résulte entre autres de l'action des molécules d'adhésion telles LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CR3 ou CD11b/CD18), la sélectine-L, la sélectine-E et la « Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 » ou PECAM-1 (Janeway et al., 99 : 377-378). Suite à ce processus nommé diapédèse, les neutrophiles continuent de migrer en direction du site de l'infection en suivant le gradient de chimioattractants. Malgré que les neutrophiles fassent partie de l'immunité innée, la

phagocytose des pathogènes est grandement augmentée par la présence d'opsonines, facteurs solubles composant l'immunité acquise. Les opsonines généralement impliquées dans la phagocytose par les PMN sont les anticorps de type IgG, certaines protéines de la phase aiguë, la fibronectine et les fragments C3b et C3bi du complément. Les neutrophiles se lient aux microbes opsonisés via leurs récepteurs aux Ig et aux facteurs du complément et peuvent ainsi effectuer une phagocytose en entourant le pathogène avec des pseudopodes. C'est lors de la fusion du phagosome avec des lysosomes contenant des enzymes protéolytiques, hydrolytiques et d'autres granules générant des métabolites réactifs dérivés de l'oxygène ou de l'azote que le pathogène sera détruit (Pelczar, Chan et Krieg, 93 : 487 ; Edwards, 94 : 30 ; Witko-Sarsat et al., 2000 : 617). Par la suite, les neutrophiles peuvent sécréter à leur tour des agents solubles pouvant influencer la réponse inflammatoire de leur pairs ou d'autres cellules immunes. Finalement, lorsque l'agent infectieux est détruit, les neutrophiles diminuent leurs activités et meurent par apoptose. L'inflammation sera achevée par la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages et autres cellules environnantes. Les différentes étapes du processus inflammatoire sont illustrées à la **figure 4**.

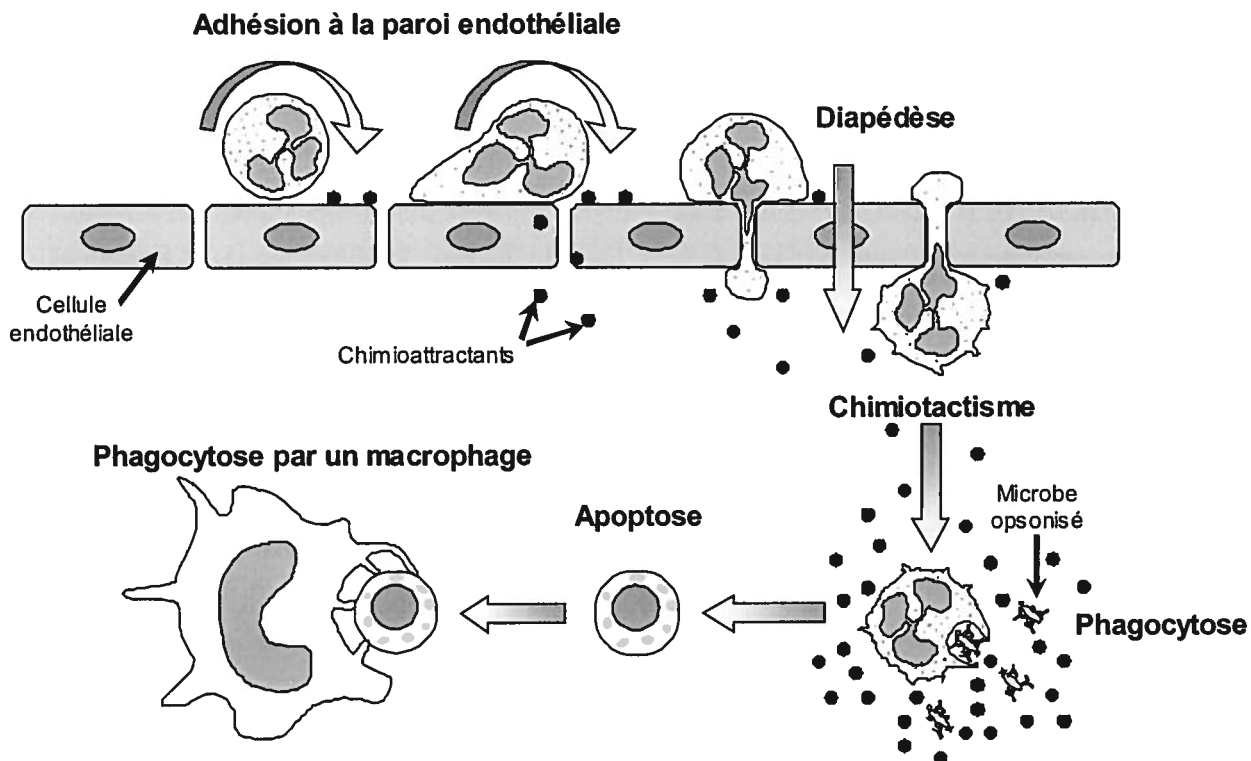


Figure 4 : Principales fonctions des neutrophiles dans l'inflammation

(Adapté de Janeway et al. 1999)

2.1.2 La synthèse de cytokines et de chimiokines

Il y a quelques années, on considérait les neutrophiles comme étant des cellules matures terminales n'ayant pas la faculté de synthétiser de l'ARN ou des protéines. Cependant, on retrouve de plus en plus d'études démontrant le contraire. En effet, non seulement les neutrophiles sont capable de synthétiser des macromolécules qui participent directement à leurs fonctions effectrices, mais ils peuvent aussi exprimer une panoplie de cytokines pro- et anti-inflammatoires (des interleukines, des facteurs de croissance, des interférons), ainsi que certaines chimiokines. Les différentes cytokines et chimiokines dont la sécrétion par les neutrophiles a été démontrée jusqu'à présent sont énumérées dans le **tableau 1**. Dans cette liste, on retrouve des facteurs chimioattractants pour les neutrophiles (IL-8 et GRO- α), les lymphocytes (IP-10) ou les monocytes (MIP-1 α et MIP-1 β), des cytokines pro-inflammatoires pyrogènes (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α et IL-6) et des cytokines anti-inflammatoires (IL-1Ra, IL-10 et TGF- β). La production de ces facteurs solubles peut être induite par d'autres cytokines ou chimiokines, ainsi que par des produits dérivés de bactéries ou de levures. Il est donc désormais établi que les neutrophiles peuvent à la fois maintenir et moduler l'inflammation (Cassatella, 1999 : 369 ; Witko-Sarsat et al., 2000 : 617).

Tableau 1 : Cytokines et chimiokines produites par les neutrophiles

<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
cytokines pro-inflammatoires	
BLyS **	BLyS **
IL-1 α	IL-1 α
IL-1 β	IL-1 β
IL-6 **	IL-6
IL-12	IL-12
IFN- α	TNF- α
IFN- γ **	
TNF- α	
cytokines anti-inflammatoires	
IL-10 **	IL-1Ra
IL-1Ra	TGF- β
TGF- β	
chimiokines C-X-C	
CINC	CINC
GRO- α	GRO- α **
GRO- β * **	IL-8
IL-8	
IP-10	
I-TAC *	
MIG	
chimiokines C-C	
MIP-1 α	MIP-1 β **
MIP-1 β	MCP-1
MIP-3 α	
MIP-3 β	
MCP-1 *	
facteurs de croissance	
G-CSF	M-CSF **
GM-CSF **	
HGF	
IL-3 **	
M-CSF **	
SCF * **	
VEGF	

* : ARNm seulement

** : requiert une confirmation

(adapté de Cassatella, 1999)

Dans l'étude présentée en deuxième partie de cet ouvrage, nous nous sommes attardés à la production de cytokines de la famille de l'IL-1 par les neutrophiles humains, en particulier l'IL-1 α , l'IL-1 β et l'IL-1Ra. Les actions de l'IL-1 sont très diversifiées, mais cette cytokine est surtout reconnue pour ses effets pro-inflammatoires lors de la réponse de la phase aiguë. En effet, l'IL-1 induit entre autres l'hypotension, la fièvre, la neutrophilie et est impliquée dans l'inflammation chronique. L'équipe de Yoshinaga a décrit pour la première fois la production d'IL-1 β par les neutrophiles *in vitro* (Yoshinaga, Nakamura et Hayashi, 1975 : 533). Cette production s'avéra être subséquente à la synthèse *de novo* de la cytokine, puisqu'elle était bloquée par des inhibiteurs de transcription ou de traduction (Yoshinaga, Goto et Ohkahara, 1987 : 931). Pour ce qui est des études *in vivo*, les neutrophiles semblent être la principale source d'IL-1 β dans les cas d'inflammation induite par l'injection de LPS chez des rats et des lapins, ainsi que dans les cas d'arthrite rhumatoïde chez l'humain (Matsukawa et Yoshinaga, 1999 : 511). La sécrétion d'IL-1 β peut être induite par différents agonistes, tels le LPS, le TNF- α , le GM-CSF, le PMA et l'IL-1 β elle-même. Ces agonistes peuvent être produits soit par les microbes infectieux, les cellules endothéliales sur les lieux de l'inflammation ou par les neutrophiles eux-mêmes. Ces mêmes facteurs pro-inflammatoires induisent la production d'IL-1Ra par les neutrophiles, un antagoniste naturel de l'IL-1, mais cette production est généralement légèrement décalée par rapport à celle de l'IL-1 β et de l'IL-8, suggérant que la production endogène d'IL-1Ra régulerait la réponse inflammatoire afin d'éviter une amplification non contrôlée de cette dernière (Matsukawa et al., 1997 : 629 ; Matsukawa et Yoshinaga, 1999 : 511). On ne connaît pas d'autre fonction de l'IL-1Ra sur les cellules du système immunitaire, autre que sa capacité à se lier aux récepteurs de l'IL-1 (IL-1RI et IL-1RII) et ainsi bloquer la signalisation de l'IL-1.

2.2 L'apoptose des neutrophiles

Tel qu'il a été mentionné précédemment, les neutrophiles ont un arsenal exhaustif d'armes anti-microbiennes. Malheureusement, ces moyens de défense peuvent causer des dommages aux tissus normaux et occasionner des désordres inflammatoires. C'est

pourquoi la résolution de l'inflammation aiguë doit se faire par la diminution des effets toxiques des neutrophiles et par leur apoptose et leur élimination par les cellules environnantes. L'apoptose des neutrophiles est plutôt particulière, non seulement par le fait qu'elle soit spontanée en l'absence de stimulus externe, mais aussi par les mécanismes qui la régulent. Tout d'abord, ces cellules ne forment pas de corps apoptotiques, mais tendent à rétrécir légèrement, à former un noyau pycnotique dû à la condensation de l'hétérochromatine et à développer plusieurs vacuoles (Savill et Haslett, 99 : 55-56). Ces cellules ne possèdent qu'un faible nombre de mitochondries de structure atypique et l'initiation de l'apoptose via la relâche du cytochrome *c* des mitochondries fait toujours l'objet de controverse (Pryde et al., 2000 : 33574 ; Fossati et al., 2003 : 1964 ; Murphy et al., 2003 : 625). De plus, les neutrophiles n'expriment pas toutes les protéines pro- et anti-apoptotiques normalement retrouvées chez la plupart des cellules et leur dépendance à la synthèse protéique *de novo* pour leur survie est aussi une de leurs caractéristiques distinctes.

2.2.1 Les protéines anti- et pro-apoptotiques présentes chez les neutrophiles

Les neutrophiles ont une machinerie apoptotique particulière, puisqu'ils n'expriment ni la caspase-2 ni PARP, une enzyme réparant l'ADN qui est clivée par les caspases lors de l'apoptose. De plus, il a été démontré que les neutrophiles n'expriment pas la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Van Der Vliet et al., 1997 : 324 ; Moulding et al., 2001 : 783), mais expriment cependant d'autres protéines de cette famille. Par exemple, on retrouve les protéines pro-apoptotiques Bad, Bak, Bax, Bid et Bik chez ces cellules (Weinmann, Gaetgens et Walzog, 1999 : 3106 ; Santos-Beneit et Mollinedo, 2000 : 712 ; Moulding et al., 2001 : 783), ainsi que l'ARNm des protéines anti-apoptotiques Mcl-1, A1 et Bcl-X_L. Récemment, l'expression de cIAP2 a aussi été mise en évidence (Hasegawa et al., 2003 : 1164). Cependant, seule la présence de la protéine de survie Mcl-1 a été clairement observée par plusieurs équipes chez les neutrophiles humains. La demi-vie de l'ARNm et de la protéine Mcl-1 est courte (environ 30 minutes) dû à la présence de séquences PEST qui la dirigent rapidement vers la protéolyse (Akgul et al., 2000 : 684). D'un autre côté, les demi-vies des protéines pro-apoptotiques tendent à être plus longues. Ainsi, tout porte à croire que l'apoptose des neutrophiles serait gouvernée par la balance entre la synthèse

de novo des protéines de survie comme Mcl-1 et l'activité des protéines pro-apoptotiques dont la présence est constante (Akgul, Moulding et Edwards, 2001 : 318). En effet, l'expression de Mcl-1 est constitutive chez les neutrophiles en circulation, mais son niveau intracellulaire tend à diminuer lorsque les cellules sont en apoptose (Moulding et al., 1998 : 2495). Cependant, il a été observé que l'expression de la protéine Mcl-1 est maintenue en réponse au LPS, au GM-CSF et à l'IL-15, trois agents reconnus pour retarder l'apoptose des neutrophiles (Moulding et al., 1998 : 2495 ; Leuenroth et al., 2000 : 158 ; Pelletier, Ratthé et Girard, 2002 : 164). Il y aurait donc un lien direct entre la synthèse de Mcl-1 et la survie des neutrophiles. Ce lien a d'ailleurs été démontré par le fait que la suppression de Mcl-1 par des oligonucléotides antisenses chez des neutrophiles a grandement accéléré l'apoptose de ceux-ci (Leuenroth et al., 2000 : 158).

2.2.2 L'apoptose spontanée des neutrophiles

Les neutrophiles en apoptose diminuent leurs activités et perdent leur capacité à effectuer la chimiotaxie, la phagocytose, la dégranulation, la génération de radicaux libres, la sécrétion d'enzymes et à répondre à des stimuli externes tels le fMLP (Whyte et al., 1993 : 5124). On observe aussi chez ces cellules une diminution de l'expression de certaines molécules de surfaces telles PECAM-1, ICAM-3, FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16), TNF-R, CR1 et C5aR (Hart et al., 2000 : 493). Les neutrophiles en apoptose deviennent donc « isolés » de leur milieu externe et ne répondent plus à des stimuli exogènes. Par contre, ils augmentent l'exposition des phosphatidylsérines à leur surface, ce qui leur permet d'être reconnus par des macrophages environnants. Par la suite, la dégradation de l'ADN chez les neutrophiles s'effectuerait via une endonucléase acide sensible au pH différente des DNases I et II normalement impliquées dans l'apoptose des autres cellules (Gottlieb et al., 1995 : 2414). De plus, certaines protéines du cytosquelette sont clivées par les caspases, comme la gelsoline qui est un substrat de la caspase-3 (Kothakota et al., 1997 : 294). Ce clivage des composantes du cytosquelette serait à l'origine des changements morphologiques que subissent les neutrophiles en apoptose.

Étant donné que les neutrophiles meurent constitutivement par apoptose, cela implique qu'il existe chez ces cellules un programme apoptotique bien défini et pré-établi. La

signalisation intracellulaire impliquée dans ce programme est pour l'instant peu définie, mais la littérature compte cependant quelques informations à ce sujet. Il a d'abord été suggéré que l'interaction entre Fas et FasL était à l'origine de l'apoptose spontanée des neutrophiles par un mécanisme « fratricide », inspiré par le modèle d'AICD des lymphocytes T (Liles et Klebanoff, 1995 : 3289 ; Liles et al., 1996 : 429). Cependant, d'autres équipes se sont objectées à cette explication (Fadeel et al., 1998 : 4808 ; Brown et Savill, 1999 : 480 ; Renshaw et al., 2000 : 662). Il a par exemple été observé que des neutrophiles non activés n'exprimaient pas FasL de façon constitutive et que le blocage de la voie Fas-FasL n'affectait pas le taux d'apoptose des neutrophiles en culture (Brown et Savill, 1999 : 480). De plus, l'apoptose des neutrophiles semble normale chez les souris déficientes en Fas ou FasL, mais ces animaux présentent des déficiences au niveau de la granulopoïèse (Fecho et Cohen, 1998 : 373 ; Fecho, Bentley et Cohen, 1998 : 19). Ces évidences laissent supposer que Fas pourrait être impliqué, mais probablement pas indispensable lors de l'apoptose spontanée des PMN. D'autres études ont démontré que l'apoptose spontanée des neutrophiles impliquerait la participation des caspases, en particulier les caspases-3 et -8, qui activeraient ensuite la protéine kinase C- δ (Pongracz et al., 1999 : 37329). La caspase-1 aurait également un rôle à jouer dans cette cascade puisque les neutrophiles provenant de souris déficientes en caspase-1 présentent un retard dans leur apoptose spontanée (Rowe et al., 2002 : 6401). D'autres protéases telles les calpaïnes pourraient agir en aval des caspases, en synergie avec le protéasome, dans l'apoptose spontanée des neutrophiles (Knepper-Nicolai, Savill et Brown, 1998 : 30530).

Cependant, les caspases ne sont probablement pas les seules initiatrices d'apoptose impliquées puisque l'inhibiteur zVAD-fmk ne diminue que de moitié le taux d'apoptose spontanée des neutrophiles (Brown, Bailey et Savill, 1997 : 233). C'est pourquoi certains ont suggéré la translocation de Bax ou de Bim vers les mitochondries comme étant un des phénomènes expliquant l'apoptose spontanée des neutrophiles (Maïanski et al., 2002 : 672). Cette suggestion est quelque peu surprenante étant donné que les neutrophiles sont habituellement décrits comme ayant un nombre limité de mitochondries. Cependant, les mitochondries des neutrophiles ont probablement un rôle important dans l'apoptose de ces derniers puisqu'une surexpression de Bcl-2 rend ces cellules réfractaires à l'apoptose

(Lagasse et Weissman, 1994 : 1047). De plus, les neutrophiles de souris déficientes en A1 démontrent un taux d'apoptose accéléré (Hamasaki et al., 1998 : 1985). Une autre hypothèse émise serait la diminution des mécanismes de protection contre le stress oxydatif (Narayanan et al., 1997 : 481). Cependant, cette hypothèse reste encore à confirmer puisqu'il a été observé que l'apoptose spontanée des neutrophiles provenant de patients atteints de granulomatose chronique (CGD), une maladie affectant la NADPH oxydase, est normale (Fadeel et al., 1998 : 4808). D'autres ont néanmoins observé un retard dans l'apoptose spontanée des neutrophiles des patients CGD (Kasahara et al., 1997 : 1748). Malgré toutes ces évidences, l'apoptose spontanée des neutrophiles reste encore un mystère puisque l'élément déclencheur de tout ce processus est encore inconnu. Il reste encore à trouver les événements qui se trouvent en amont des protéines exécutrices et régulatrices décrites ici.

2.2.3 La modulation de l'apoptose des neutrophiles

Étant donné le rôle important de l'apoptose des neutrophiles dans la résolution de l'inflammation, la régulation de ce processus devient une cible intéressante pour des interventions thérapeutiques. Ainsi, il est possible de diminuer l'inflammation en forçant l'apoptose des neutrophiles, alors qu'un prolongement artificiel de leur survie peut prolonger et amplifier la réponse inflammatoire. Il existe une multitude de molécules susceptibles de moduler positivement ou négativement la mort des neutrophiles (Ward et al., 1999 : 503). Ces modulateurs comprennent entre autres des molécules de surface, des espèces réactives dérivées de l'oxygène, des cytokines, des hormones thyroïdiennes, des lectines et des toxiques de l'environnement (Akgul, Moulding et Edwards, 2001 : 318).

2.2.3.1 Les inhibiteurs d'apoptose

Plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-4, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-15, l'IFN- γ , le G-CSF et le GM-CSF ont la capacité de prolonger la survie des neutrophiles (Brach et al., 1992 : 2920 ; Colotta et al., 1992 : 2012 ; Klebanoff et al., 1992 : 225 ; Girard et al., 1996 : 3176 ; Girard, Paquin et Beaulieu, 1997 : 147 ; Kettritz et al., 1998 : 84 ; Watson et al., 1998 : 957). La plupart de ces cytokines inhibent l'apoptose spontanée

des neutrophiles en réduisant l'activité de la caspase-3 (Watson et al., 1999 : 67), en diminuant l'expression de Bax (Dibbert et al., 1999 : 13330), ou en maintenant l'expression de Mcl-1 (Moulding et al., 1998 : 2495). Plusieurs retardent également l'apoptose des neutrophiles en induisant la sécrétion de facteurs solubles capables d'agir de façon autocrine ou paracrine sur les neutrophiles et ainsi amplifier le signal de survie. C'est le cas du GM-CSF, de l'IL-1 β , de l'IL-6 et de l'IL-8 (Biffl et al., 1996 : 575 ; Cox et Austin, 1997 : 224 ; Watson et al., 1998 : 957 ; Grutkoski et al., 1999 : 373 ; Dunican et al., 2000 : 284 ; Grutkoski et al., 2002 : 47). Les facteurs de survie impliqués dans les exemples précédents semblent différer d'une cytokine à une autre. Par exemple, le GM-CSF induit la production d'IL-1 β (Watson et al., 1998 : 957), alors que l'IL-6 fait produire le facteur PAF (Biffl et al., 1996 : 575) par les neutrophiles. Ainsi, en plus d'affecter des protéines intracellulaires, certaines cytokines pourraient amplifier leur signal anti-apoptotique via la sécrétion d'autres facteurs anti-apoptotiques.

La paroi externe des bactéries Gram négatives est recouverte de lipopolysaccharide (LPS), une molécule qui active fortement les neutrophiles et retarde leur apoptose (Lee, Whyte et Haslett, 1993 : 283). Le mécanisme à l'origine de ce retard d'apoptose n'est pas clairement défini, mais plusieurs études ont démontré que l'activation de sérines/thréonines kinases telles que p38 MAPK seraient impliquées (Sweeney et al., 1998 : 64 ; Nolan et al., 1999 : 406). De plus, il a été démontré qu'une stimulation au LPS induisait l'augmentation de l'expression des chaînes α des intégrines β_2 (CD11a et CD11b) par les neutrophiles. Une stimulation de ces molécules de surface entraîne une augmentation du calcium intracellulaire, résultant en un retard de l'apoptose (Watson et al., 1997 : 945). Ainsi, l'apoptose des neutrophiles stimulés au LPS serait retardée suite à leur transmigration à travers la paroi endothéliale, puisque ce phénomène implique, entre autres, la participation des intégrines. L'augmentation de l'expression de Mcl-1 suite à une stimulation des neutrophiles au LPS explique aussi l'effet anti-apoptotique de ce dernier (Moulding et al., 1998 : 2495). De plus, le LPS amplifie son action via la libération d'éléments solubles dans le milieu extracellulaire (Cox et Austin, 1997 : 224).

Les glucocorticoïdes, hormones sécrétées principalement en période de stress, ont généralement des effets inhibiteurs sur le système immunitaire. C'est pourquoi ils sont employés dans le traitement de maladies inflammatoires telles que l'asthme (Barnes et al., 1993 : 877) et l'arthrite rhumatoïde (Morand et Goulding, 1993 : 816). Malgré qu'ils induisent l'apoptose des éosinophiles et des thymocytes, les corticostéroïdes tels que le dexaméthasone, la méthylprednisolone, l'hydrocortisone et le mométasone inhibent l'apoptose des neutrophiles (Liles, Dale et Klebanoff, 1995 : 3181 ; Cox, 1995 : 4719 ; Zhang et al., 2002 : 1523). D'ailleurs, les neutrophiles provenant de patients ayant subi de sévères brûlures ou un stress psychologique important démontrent un retard de leur apoptose par rapport à des cellules témoins (Chitnis et al., 1996 : 835 ; Sendo, Kato et Yazawa, 1997 : 511). De plus, les neutrophiles traités aux glucocorticoïdes *in vitro* démontrent une augmentation de leurs fonctions effectrices dont une production élevée de superoxyde (Cox, 1995 : 4719). Ces études suggèrent donc que la prolongation de la survie des neutrophiles, ainsi que l'augmentation de leurs fonctions effectrices, pourraient être dévastatrices lors d'utilisations thérapeutiques de ce genre d'hormone. Cependant, il a été démontré que la présence de glucocorticoïdes pouvait induire la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages, ce qui favoriserait la résolution de l'inflammation (Liu et al., 1999 : 3639). Il est donc primordial d'approfondir les conséquences des thérapies hormonales sur l'ensemble du système immunitaire afin d'éviter des effets secondaires non désirables.

Dans notre laboratoire, nous sommes intéressés par les mécanismes régissant l'action de l'IL-15 sur les neutrophiles humains. En plus des neutrophiles, l'IL-15 agit sur plusieurs cellules du système immunitaire, notamment sur les lymphocytes B, les lymphocytes T et les cellules NK. Cette cytokine est entre autres retrouvée dans le liquide synovial d'environ 50 % des patients atteints d'arthrite rhumatoïde et serait alors produite par les macrophages et les fibroblastes bordant la membrane synoviale (McInnes et Liew, 1998 : 75). Ce liquide contient également un nombre important de neutrophiles, ce qui laisse croire que l'IL-15 serait impliquée dans le recrutement et/ou dans le maintien de ces leucocytes sur les lieux de l'inflammation. En plus de prolonger la survie des neutrophiles, l'IL-15 induit une augmentation de la phagocytose, l'activité anti-

microbienne contre *Candida albicans*, la production d'IL-8, l'activation du facteur de transcription NF- κ B et la synthèse *de novo* de plusieurs protéines, notamment l'actine (Girard et al., 1996 : 3176 ; McDonald et al., 1998 : 4828 ; Musso et al., 1998 : 2640). Il a également été démontré que l'IL-15 pouvait maintenir les niveaux intracellulaires de Mcl-1, diminuer les niveaux intracellulaires de Bax et diminuer l'activité de la caspase-3, ce qui expliquerait en partie son activité anti-apoptotique (Ottonello et al., 2002 : 125 ; Pelletier, Ratthé et Girard, 2002 : 164).

2.2.3.2 Les inducteurs d'apoptose

Il n'y a maintenant plus de doute que les neutrophiles expriment à leur surface le récepteur de mort Fas et son ligand et que leur apoptose peut être induite via cette molécule. (Iwai et al., 1994 : 1201 ; Liles et al., 1996 : 429 ; Santos-Beneit et Mollinedo, 2000 : 712). Malgré que l'induction de l'apoptose entre neutrophiles soit controversée, il se pourrait que les macrophages ayant phagocyté des particules ou encore des neutrophiles apoptotiques soient à l'origine de la mort des neutrophiles environnants via la voie de Fas, pouvant ainsi accélérer la résolution de l'inflammation (Brown et Savill, 1999 : 480). Il existe cependant de nombreuses autres voies apoptotiques pouvant être activées chez les neutrophiles.

Par exemple, le stress oxydatif est un des moyens d'activer l'apoptose des neutrophiles. Puisque les neutrophiles produisent eux-mêmes des molécules réactives dérivées de l'oxygène lors de la destruction des pathogènes, ils peuvent donc être à la source de leur propre mort cellulaire à la fin du processus inflammatoire. Ce phénomène a été mis en évidence par l'équipe de Watson en 1996 lorsqu'ils ont démontré que la phagocytose de bactéries *E. coli* doublait la rapidité des neutrophiles à se diriger en apoptose et que cet effet pouvait être bloqué par des anti-oxydants (Watson et al., 1996 : 3986). Ainsi, plusieurs modulateurs d'apoptose des neutrophiles agissent via la modification du statut redox des cellules. Par exemple, l'éthanol, la cytarabine, le toxaphène et les rayons ultraviolets induisent une hausse de l'activité oxydative des cellules, contribuant à augmenter le stress oxydatif et l'apoptose de celles-ci (Sweeney et al., 1997 : 517 ; Singhal et al., 1999 : 930 ; Gauthier et al., 2001 : 46 ; Iacobini et al., 2001 : 1033).

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire qui affecte principalement la production de cytokines de type Th1 par les lymphocytes, monocytes, macrophages, neutrophiles et cellules NK. Parmi les fonctions biologiques des neutrophiles affectées par l'IL-10, on retrouve la production de cytokines (TNF- α , IL-1 α/β , IL-1Ra, IL-8, GRO- α , MIP-1 α/β , IL-12, IP-10), la production de prostaglandines, la flambée oxydative, la phagocytose, la migration et l'apoptose (Cassatella, 1998 : 148). L'IL-10 ne semble pas moduler directement l'apoptose des neutrophiles, mais peut renverser l'effet anti-apoptotique de certaines cytokines et celui du LPS (Keel et al., 1997 : 3356). Il a d'abord été présumé que l'action de l'IL-10 sur l'apoptose des neutrophiles découlait de la modulation de la sécrétion de cytokines vers une balance anti-apoptotique. Cependant, il a été démontré que l'action de l'IL-10 n'était pas influencée par l'ajout de cytokines pro-inflammatoires recombinantes et que l'IL-10 augmentait la phosphorylation de protéines sur des résidus tyrosine (Keel et al., 1997 : 3356). Ceci suggère donc que l'accélération de l'apoptose des neutrophiles par l'IL-10 impliquerait l'activation de kinases et d'autres voies de signalisation. *In vivo*, Cox a confirmé que l'IL-10 pouvait bloquer le retard d'apoptose des neutrophiles induit par le LPS puisqu'une co-injection intratrachéale d'IL-10 et de LPS démontrait une plus grande rapidité à éliminer les neutrophiles présents dans les poumons comparativement aux animaux n'ayant reçu que du LPS (Cox, 1996 : L566-L571). Tout porte à croire que l'IL-10 serait un candidat de choix dans le traitement de maladies inflammatoires dans lesquelles l'apoptose des neutrophiles est retardée par la présence de niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires.

La *Viscum album* agglutinine-I (VAA-I) est une lectine de plante faisant partie de la famille des protéines inhibant les ribosomes (« ribosome-inactivating proteins », ou RIP) qui, à de fortes concentrations, induit l'apoptose des neutrophiles selon un mécanisme dépendant des caspases. Cette induction d'apoptose est très drastique (80 % d'apoptose en 12 heures) et semble s'exécuter sans la synthèse de nouveaux facteurs (Savoie et al., 2000 : 845). Son action s'effectue via le blocage de la synthèse protéique, tel que décrit plus bas. De plus, cette lectine peut bloquer le retard d'apoptose causé par le GM-CSF et

l'IL-15 (Savoie et al., 2000 : 845 ; Pelletier et al., 2001 : 229). La VAA-I offre donc une stratégie thérapeutique intéressante visant à combattre diverses maladies inflammatoires.

Le TNF- α est un agoniste ayant des effets particuliers sur l'apoptose des neutrophiles humains. En effet, cette cytokine peut induire l'apoptose à court terme, alors qu'elle inhibe cette dernière après 18 heures chez la sous-population de cellules ayant survécu (Murray et al., 1997 : 2772). De plus, le TNF- α peut également avoir des effets divergents sur les neutrophiles selon la concentration utilisée : à de faibles concentrations il retarde l'apoptose de ces cellules, mais l'accélère lorsque utilisé à de plus fortes concentrations (van den Berg et al., 2001 : 467). Curieusement, l'ajout de zVAD-fmk augmente de façon dose-dépendante l'apoptose induite par le TNF- α à court terme (Liu et al., 2003 : 295). De plus, les neutrophiles résultant de cette double stimulation tendent, étrangement, à former des sortes de corps apoptotiques et présentent des traits propres à la fois à l'apoptose et à la nécrose, démontrant encore une fois la particularité de la cytokine. Les effets opposés du TNF- α ne sont plus observés lorsqu'il y a inhibition de la synthèse protéique puisque toute la population de neutrophiles se dirige alors en apoptose en moins de deux heures. De plus, l'effet pro-apoptotique du TNF- α est également augmenté par des inhibiteurs de NF- κ B (Ward et al., 1999 : 4309). Le mécanisme d'action du TNF- α est encore obscur, mais il est possible que cette cytokine active la machinerie apoptotique déjà en place lors de sa liaison avec son récepteur et induise aussi la synthèse de protéines anti-apoptotiques via le facteur NF- κ B chez les cellules ayant résisté au premier signal pro-apoptotique.

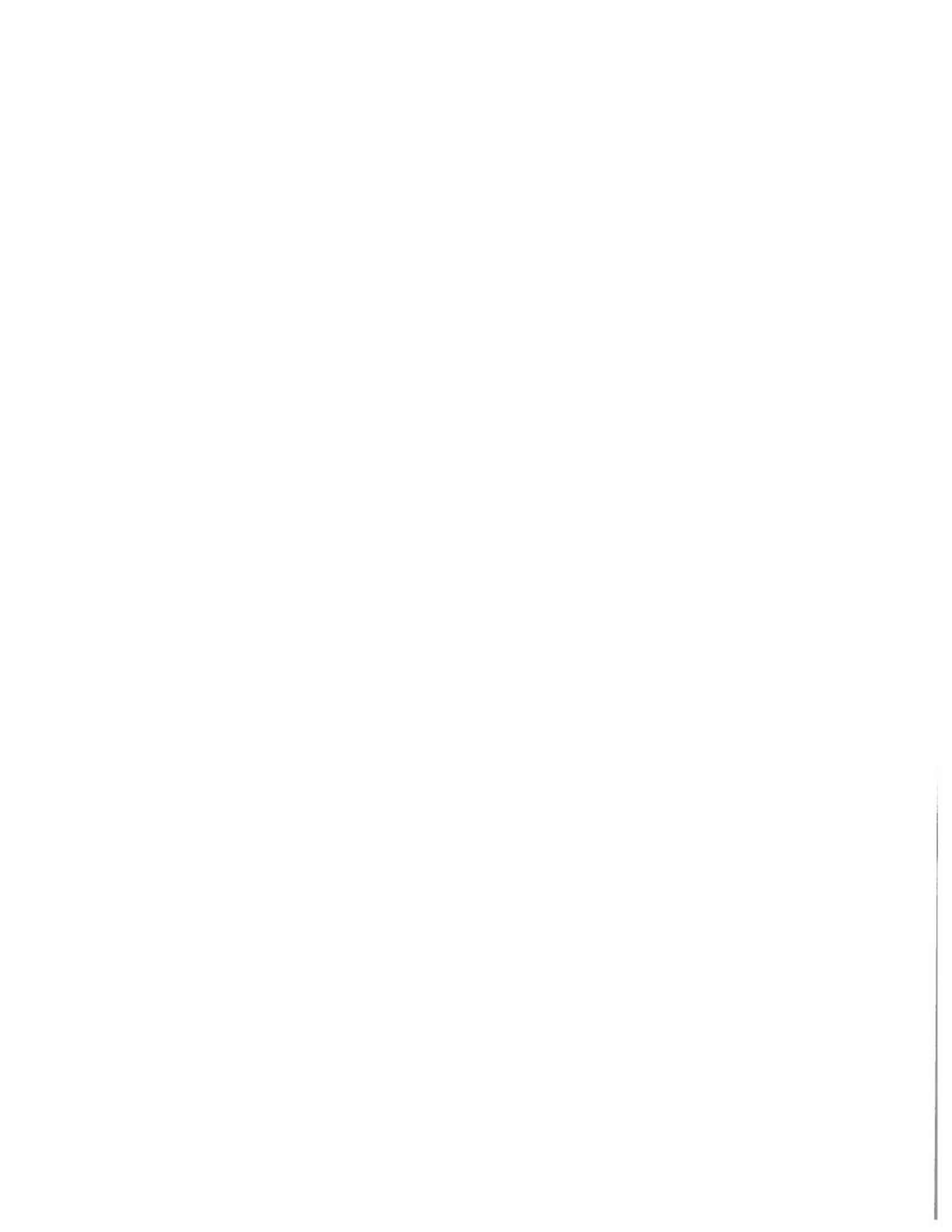
2.2.4 La synthèse protéique lors de l'apoptose des neutrophiles

Tel que mentionné précédemment, l'apoptose des neutrophiles est accélérée par le blocage de leur synthèse protéique (Brach et al., 1992 : 2920). De plus, la plupart des agents capables de retarder l'apoptose des neutrophiles ont comme conséquence d'augmenter la synthèse protéique, laissant croire que la survie de ces cellules dépendrait d'une expression *de novo* de protéines anti-apoptotiques. C'est le cas entre autres du G-CSF et du GM-CSF dont les effets anti-apoptotiques sont bloqués par la cycloheximide

et l'actinomycine D (Maianski et al., 2002 : 672 ; Sakamoto et al., 2003 : 60). De plus, la VAA-I, à forte concentration, bloque la synthèse protéique et empêche le retard d'apoptose normalement induit par l'IL-15 (Pelletier et al., 2001 : 229). L'importance de la synthèse protéique dans l'inhibition de l'apoptose par l'IL-15 est d'ailleurs mise en évidence dans l'article présenté en deuxième partie. La dexaméthasone pourrait elle aussi augmenter l'expression de protéines inhibitrices d'apoptose chez les neutrophiles puisque son effet anti-apoptotique est bloqué par la cycloheximide (Kato et al., 1995 : 198). Ce n'est cependant pas le cas de tous les inhibiteurs d'apoptose des neutrophiles puisque les effets de la zVAD-fmk et de l'AMPC ne sont pas (ou sont partiellement) renversés par le blocage de la synthèse *de novo* (Sakamoto et al., 2003 : 60). La nature des protéines nouvellement synthétisées lors du retard d'apoptose des neutrophiles reste encore à être élucidée. Dans le cas de la dexaméthasone et de l'IL-15, les protéines anti-apoptotiques nouvellement synthétisées sont probablement intracellulaires, puisque aucun facteur de survie n'a été retrouvé dans le surnageant de neutrophiles stimulés par ces agents, contrairement à d'autres agonistes. De plus, le facteur de transcription NF- κ B semble avoir un rôle important à jouer dans la synthèse protéique impliquée dans la survie des neutrophiles. En effet, la gliotoxine, un inhibiteur de NF- κ B, augmente de façon radicale l'apoptose des neutrophiles et bloque l'effet anti-apoptotique du LPS sur ces cellules (Ward et al., 1999 : 4309). Ceci laisse supposer que NF- κ B coderait pour un ou plusieurs facteur(s) de survie lors du retard d'apoptose des neutrophiles. Les protéines cIAP2, Mcl-1 et Bcl-X_L ont été suggérés comme étant ces protéines (Chu et al., 1997 : 10057 ; Chen, Edelstein et Gelinas, 2000 : 2687).

Le contrôle de l'apoptose des neutrophiles via l'inhibition des processus pro-inflammatoires pourrait s'avérer très utile en clinique. En effet, l'élucidation des mécanismes moléculaires régissant la survie de ces cellules pourrait mener à l'élaboration de cibles thérapeutiques. Le but des recherches présentées dans la deuxième section de cet ouvrage était donc de déterminer quelles protéines sont synthétisées *de novo* suite à une stimulation par l'IL-15 et si celles-ci sont impliquées dans la modulation de l'apoptose des neutrophiles. Plus précisément, la détection des protéines par marquage métabolique, l'identification de celles-ci, suivie par la évaluation de leur rôle dans le phénomène de

retard d'apoptose des neutrophiles induit par l'IL-15 étaient les principaux objectifs de nos travaux.



SECTION 2 : ARTICLE

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE

Titre : La synthèse et sécrétion de l'antagoniste du récepteur à l'interleukine-1 (IL-1Ra) et d'autres protéines solubles ne sont pas impliquées dans la suppression de l'apoptose des neutrophiles par l'IL-15 : importance des protéines intracellulaires dont Mcl-1 et la vimentine.

L'interleukine-15 (IL-15) est une cytokine pro-inflammatoire connue pour activer les neutrophiles humains. Nous avons démontré précédemment que, chez les neutrophiles, l'IL-15 induit la synthèse protéique *de novo* de plusieurs polypeptides intracellulaires et qu'elle retarde l'apoptose par un mécanisme encore inconnu. Ici, nous démontrons que l'IL-15 induit la synthèse *de novo* d'une protéine d'environ 23kDa représentant la protéine prédominante excrétée dans le milieu extracellulaire. Nous avons identifié cette protéine comme étant l'IL-1Ra par immunobuvardage de type western et par immunoprécipitation. Nous avons mesuré les concentrations d'IL-1Ra, d'IL-1 α et d'IL-1 β par ELISA dans les fractions intracellulaires et extracellulaires de cellules stimulées à l'IL-15 ou au GM-CSF. Nous avons observé que l'IL-15 n'induit pas la production d'IL-1 α ni d'IL-1 β , mais qu'elle induit la sécrétion d'IL-1Ra de façon moins efficace que le GM-CSF. De plus, nous démontrons que l'IL-1Ra ne module pas directement le taux d'apoptose des neutrophiles, tel qu'évalué par cytologie, liaison de l'Annexine-V-FITC et expression du CD16, même à une concentration 250 fois plus élevée que celle mesurée dans le milieu extracellulaire. Contrairement au surnageant provenant de cellules cultivées en présence de GM-CSF, nous n'avons pu retarder l'apoptose des neutrophiles par l'ajout du surnageant des cellules stimulées à l'IL-15, démontrant que l'IL-15 ne module pas l'apoptose via la production d'un facteur soluble. L'ajout de cycloheximide démontre que l'IL-15 retarde l'apoptose via la synthèse *de novo* des protéines intracellulaires, incluant la protéine anti-apoptotique Mcl-1 et la protéine du cytosquelette vimentine, mais pas la vinculine. Malgré que l'IL-15 soit reconnue comme étant une cytokine pro-inflammatoire, nos résultats indiquent que cette cytokine peut activer simultanément une boucle anti-inflammatoire, d'après sa capacité à induire la synthèse de l'IL-1Ra par les neutrophiles pour contrecarrer des concentrations excédantes d'IL-1 ou d'autres cytokines semblables durant l'inflammation.

CONTRIBUTION DES AUTEURS DE L'ARTICLE

Contribution personnelle

J'ai réalisé les expériences dont les résultats paraissent dans la majorité des figures de l'article. J'ai en outre participé à l'isolement des neutrophiles, leur stimulation en présence de divers agonistes et l'évaluation de leur apoptose par trois méthodes différentes. J'ai également effectué le marquage métabolique des neutrophiles, les immunobuvardages de type western, les immunoprécipitations radioactives et la confirmation des tests ELISA effectués auparavant par madame Ratthé. J'ai également participé à la planification de certaines expériences, à la rédaction du manuscrit, aux analyses statistiques et à l'analyse des résultats. Ma contribution à cet article comprend donc la démonstration que l'IL-15 induit la production *de novo* de l'IL-1Ra par les neutrophiles humains, que cette molécule ne module pas directement l'apoptose des neutrophiles et que l'IL-15 ne module pas l'apoptose des neutrophiles via la sécrétion d'un facteur soluble mais par la synthèse *de novo* de protéines intracellulaires telles Mcl-1.

Contribution des co-auteurs

Claude Ratthé : Madame Ratthé a effectué les tests ELISA ayant permis la quantification de la production d'IL-1 α , d'IL-1 β et d'IL-1Ra par les neutrophiles humains en réponse à divers agonistes dont l'IL-15. Ses résultats ont permis de conclure que la production d'IL-1Ra par les neutrophiles n'était pas consécutive à une surproduction d'IL-1 par ces cellules.

Denis Girard : Le Dr Girard est le responsable de ce projet. Il a participé à la planification des expériences, à l'analyse des résultats, aux analyses statistiques, ainsi qu'à la correction et la rédaction du manuscrit.

TEXTE ORIGINAL DE L'ARTICLE

Synthesis and release of Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and other soluble proteins are not involved in IL-15-induced suppression of neutrophil apoptosis: importance of intracellular proteins including Mcl-1 and vimentin.

Amélie Bouchard, Claude Ratthé, and Denis Girard*

From INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Pointe-Claire, PQ, Canada.

*Correspondence to: Dr Denis Girard, INRS-Institut Armand-Frappier
245 boul. Hymus, Pointe-Claire (PQ), Canada, H9R 1G6.
Tel/Fax: (514) 630-8847/8850.
e-mail: Denis.Girard@INRS-iaf.Uquebec.ca

Keywords: Neutrophils, cytokine, inflammation, apoptosis

¹This study was supported by Canadian Institutes of Health Research (MOP-89534) and Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). AB and CR hold a M.Sc. FRSQ-FCAR-Santé award and DG is an FRSQ Scholar.

ABSTRACT

Interleukin-15 (IL-15) is a pro-inflammatory cytokine known to activate human neutrophils. We have previously demonstrated that in neutrophils, IL-15 induces the de novo protein synthesis of several intracellular polypeptides and delays apoptosis by an unknown mechanism. Here, we found that IL-15 induces de novo synthesis of a ~23 kDa protein, representing the most predominant protein released into the external milieu. We identified this protein as IL-1Ra, using Western blotting and immunoprecipitation. We quantified IL-1Ra, IL-1 α and IL-1 β concentrations by ELISA in both intracellular and extracellular fractions from IL-15- or GM-CSF-induced cells. We found that IL-15 does not increase IL-1 α nor IL-1 β production, but induces IL-1Ra release less efficiently than GM-CSF. In addition, we demonstrated that IL-1Ra does not itself modulate neutrophil apoptotic rate, as assessed by cytology, FITC-annexin-V binding and cell surface expression of CD16, even at a concentration 250 times greater than that measured in the external milieu. In contrast to the supernatant harvested from GM-CSF-induced cells, we could not delay neutrophil apoptosis by addition of IL-15-treated neutrophil-conditioned medium, demonstrating that IL-15 does not modulate apoptosis via the release of a soluble factor. Addition of cycloheximide demonstrates that IL-15 delays apoptosis via de novo synthesis of intracellular proteins, including the antiapoptotic Mcl-1 and the cytoskeletal protein vimentin, but not vinculin. Although IL-15 is known as a pro-inflammatory cytokine, our results indicate that this cytokine can simultaneously activate an anti-inflammatory loop, based on its ability to induce the synthesis of IL-1Ra by

neutrophils to prevent excess concentrations of IL-1 or other related cytokines during inflammation.

INTRODUCTION

Neutrophils are terminally non-dividing mature cells known to spontaneously undergo apoptosis without any apparent stimulation. These cells were originally described as having limited protein synthesis ability. However, when appropriately activated, neutrophils are able to synthesize various proteins (1-4). Knowing the importance of neutrophils in the inflammatory process, and because of their high cell turnover rate, it is not surprising that an increasing number of studies have focused on the cellular and molecular biology of neutrophil apoptosis (5-7). This explains why pharmacological manipulation of neutrophil apoptosis represents an important avenue of research for developing potential therapeutic strategies (5,6).

Interleukin-15 (IL-15)¹ is a pro-inflammatory cytokine suspected to be an important pathogenic factor in different human diseases, including inflammatory disorders (8). In this regard, high concentrations of IL-15 have been detected in the synovial fluid and in synovial cell membrane from rheumatoid arthritis patients (9-12). Human neutrophils are known to express the three IL-15R subunits on their surface, namely, IL-2/15R β (CD122), γ_c (CD132) and IL-15R α (13,14). We have previously documented that IL-15 is a neutrophil agonist (15). This cytokine induces RNA synthesis, *de novo* protein synthesis, phagocytosis, and delays apoptosis. IL-15, unlike IL-2, was also found to induce the production of the potent neutrophil chemoattractant IL-8 and the activation of NF- κ B (16). In

addition, it has been reported that IL-15, although known as a general inhibitor of apoptosis, could not inhibit the ability of the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) to induce neutrophil apoptosis, and this was correlated with an inhibition of *de novo* protein synthesis induced by VAA-I (17). In neutrophils, IL-15 is known to act by different cell signaling pathways, since it activates Jak-2, p38 mitogen-activated protein kinase, and ERK-1/2 (18). In a recent study, IL-15 was found to induce the simultaneous secretion of IL-1 β and its natural inhibitors IL-1Ra and sIL-1RII by human neutrophils isolated from normal and tumor-bearing hosts (19). IL-15 was also found to induce IL-1 β and IL-1Ra secretion by neutrophils from healthy controls, but not by neutrophils from cancer patients. However, a priming effect of IL-15 on IL-1 β production by LPS-stimulated cells was noted in patients with oral cavity cancers (19). The precise role of IL-1Ra is still obscure, but it is clear that this molecule inhibits the biological activity of IL-1. Its role on a specific neutrophil function has never been reported.

The present study was conducted in order to better understand the mechanism by which IL-15 delays human neutrophil apoptosis. Because we have previously found that IL-15 induces *de novo* protein synthesis in human neutrophils (15), we decided to investigate the potential role of *de novo* protein synthesis in IL-15-induced suppression of neutrophil apoptosis. We identified the predominant protein detected in the supernatant as IL-1Ra. Unfortunately, we found that this protein is not involved in IL-15-induced suppression of neutrophil apoptosis. In fact, unlike GM-CSF-induced cells, the supernatant harvested from IL-15-induced

neutrophils was devoid of activity which delayed neutrophil apoptosis. This suggested the existence of a specific set of proteins (probably intracellular) that were involved in this process. We found that at least two of these proteins were Mcl-1 and vimentin.

¹**Abbreviations used: IL-15, interleukin-15; IL-1 α / β , interleukin-1 α / β ; IL-1Ra, IL-1 receptor antagonist; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; CHX, cycloheximide**

MATERIALS AND METHODS

Chemicals, agonists and antibodies. IL-15 and GM-CSF were obtained from PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ). LPS, cycloheximide (CHX) and the monoclonal antibodies to human cytoskeletal vimentin (clone Vim 13.2) and vinculin (clone Vin-11-5) were purchased from Sigma Chemical Company (St-Louis, MO). Recombinant human IL-1Ra and the goat anti-human IL-1Ra polyclonal antibody were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). IL-1 α , IL- β and IL-1Ra ELISA kits were obtained from Medicorp (Montreal, Qc). The Mcl-1 antibody (RC13 clone) was purchased from BioSource (Montreal, Qc). FITC-annexin-V and FITC-mouse anti-human CD16 mAb were purchased from Pharmingen Canada (Mississauga, ONT). Horseradish peroxidase-labeled rabbit anti-goat and goat anti-mouse (IgM + IgG) secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA).

Neutrophil isolation. Cells were isolated from venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech Inc, Qc), as previously described (15,17,20). Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to our institutionally approved procedures. Cell viability (>98%) was monitored by Trypan blue exclusion and the purity (>98%) was verified by cytology from cytocentrifuged preparations colored by the Hema 3 Stain Set (Biochemical Sciences Inc., Swedesboro, NJ).

Metabolic labeling and de novo protein synthesis assay. Cells (10×10^6 cells/ml in RPMI-1640 supplemented with 1% autologous serum) were metabolically labeled with 125 μ Ci of the Redivue Pro-Mix L- 35 S] *in vitro* cell labeling mix (Amersham BioSciences Inc. Baie d'Urfé, Qc) in the presence or absence of agonists as indicated in the figure legends, for 22 h as previously published (15,17). Cell lysates were prepared, and SDS-PAGE was performed. An equivalent of 0.5×10^6 cells was loaded per well (in order to compare de novo protein synthesis) (15,17). After electrophoresis, gels were stained with Coomassie blue (to verify equivalent loading), dried, and exposed to Kodak film X OMAT-RA at -80°C for 1-3 days.

Western blot. Freshly isolated neutrophils (300 μ l of a 10×10^6 cells/ml suspension) were incubated in RPMI-1640-HEPES-penicillin-streptomycin supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS) for 21 h at 37°C with buffer, GM-CSF (65 ng/ml), or IL-15 (250 ng/ml) (15). Cells were harvested and centrifuged in order to collect the cells and the supernatant, to which an equivalent volume of 2X Laemmli sample buffer was added. An equivalent of 0.5×10^6 cells were loaded onto 15 % SDS- PAGE and transferred to a PVDF membrane (Millipore, Bedford, MA). Non-specific sites were blocked with 2 % skim milk in TBS-Tween (25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 190 mM NaCl, 0.15 % Tween 20) overnight at 4°C . The goat anti-IL-1Ra polyclonal antibody (1 μ g/ml) was added for 1 h at room temperature followed by washes with TBS-Tween. The membrane was then

incubated with a horseradish peroxidase-labeled rabbit anti-goat secondary antibody at 1:10,000 in TBS-Tween + 2 % nonfat dry milk for 45 min at room temperature followed by washes. The IL-1Ra protein was revealed with the enhanced chemiluminescence (ECL) Western Blotting detection system (Amersham Biosciences Inc.). Protein loading was verified by staining the membranes with Coomassie blue at the end of the experiment. In some experiments, the primary antibodies were the anti-vimentin (1:1000), anti-vinculin (1:200) or anti-Mcl-1 (1 $\mu\text{g/ml}$), as described in **Chemicals and Agonists**.

Immunoprecipitation of radiolabeled IL-1Ra. 8×10^6 metabolically-labeled neutrophils were centrifuged in order to separate the cells from the medium. Pellets were washed twice with PBS and lysed in 160 μl of a non-denaturant lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 % deoxycholic acid, 1 % Triton X-100, 0.01 % SDS) for 30 min on ice. The lysates and supernatants were precleared using 20 μl of protein G-Sepharose (Amersham Biosciences Inc.). After 1 h, brief centrifugation followed to remove the Sepharose beads and the samples were incubated with 2 $\mu\text{g/ml}$ of goat anti-IL-1Ra with gentle agitation for 3 h at 4°C. 15 μl of protein G-Sepharose were then added for an additional 1-h incubation. The solid matrix was collected and washed three times with PBS before suspending it in 30 μl of sample buffer and heating to 100°C for 5 min. Labeled proteins were resolved by gel electrophoresis in a 15 % acrylamide/bis-acrylamide gel. After electrophoresis, gels were stained with Coomassie blue (to

verify equivalent loading), dried, and exposed with Kodak film X OMAT-RA at -80 °C for 1-3 days.

Cytokine production. Freshly isolated human neutrophils (10×10^6 cells/ml in RPMI-1640 supplemented with 5% FCS) were stimulated with buffer, 1 μ g/ml LPS, 100 or 250 ng/ml IL-15 for 24h, as previously described (21,22). After incubation, both cells and supernatants were harvested and centrifuged. Then, supernatants were transferred into corresponding tubes and pellets were washed twice. Both fractions (intracellular and extracellular) were conserved at -80 °C. Cell pellets were gently sonicated just prior to quantification. Both intracellular and extracellular concentrations of IL-1Ra, IL-1 α and IL-1 β were measured using commercially available ELISA kits according to the manufacturer's instructions no more than two weeks after harvesting. Cytokine concentrations were measured in parallel using eight blood donors.

Assessment of neutrophil apoptosis. Freshly isolated human neutrophils (10×10^6 cells/ml in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS) were incubated for 24h in the presence or absence of neutrophil agonists as indicated under figure legends. Apoptosis was evaluated by the three following methods as previously published (15, 18).

For assessment of apoptosis by FITC-annexin-V staining, cells were washed twice with cold PBS and then resuspended in 100 μ L of 1X binding buffer (10 mM

Hepes/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂). The cell suspension was incubated for 15 min at room temperature and light protected, after the addition of 2 µL of FITC-annexin-V (Medicorp). A volume of 400 µL of 1X binding buffer was added to each tube before FACS analysis. Flow cytometric analysis (10,000 events) was performed using a FACScan (Becton Dickinson).

CD16 expression is known to be down-regulated in apoptotic neutrophils and the level of CD16 expression was measured in order to evaluate the apoptotic rate according to previous procedures (23). After the incubation, cells were washed, suspended at a concentration of 1.5×10^6 cells/ml, and pre-incubated for 30 min (4°C, light protected) with 20% autologous serum to prevent non-specific binding via Fc receptors. Cells were then washed and incubated with 2 µl of FITC-mouse anti-human CD16 mAb (PharMingen Canada) for 30 min at 4 °C, in the dark, before FACS analysis.

For assessment of apoptosis by cytology, cytocentrifuged preparations of neutrophils (with ~200 µl) were performed using a Cyto-tek® centrifuge (Miles Scientific, IN, USA) and processed essentially as previously documented (15,20). Cells were examined by light microscopy at 400 X final magnification and apoptotic neutrophils were defined as cells containing one or more characteristic darkly stained pyknotic nuclei. An ocular containing a 10 x 10 squares grill was used in order to count at least five different fields (>100 cells) for the assessment of apoptotic cells. Results were expressed as percentage of apoptotic cells.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed with SigmaStat for Windows Version 2.0 with a one-way analysis of variance (ANOVA). Statistical significance was established at $p < 0.05$.

RESULTS

Detection of IL-15-induced de novo protein synthesis released in the supernatant.

The role of protein synthesis during neutrophil apoptosis is still obscure. Knowing that IL-15 delays human neutrophil apoptosis and induces de novo protein synthesis of several unidentified intracellular polypeptides (15), we decided to study the expression of newly synthesized polypeptides in the external milieu from IL-15-induced neutrophils. Curiously, only a few proteins were detected by SDS-PAGE (**Fig. 1**). Interestingly, one predominant protein of ~23 kDa was detected, and it co-migrated with the major protein detected in GM-CSF-induced cells, but at a weaker intensity (**Fig. 1**). Of note, although the corresponding Coomassie-stained gel reveals the presence of equal amount of proteins loaded (lower part), the effect of cycloheximide (CHX) can be clearly observed in lane 3, where very few radioactive polypeptides were detected (upper part).

Identification of the ~23 kDa protein as IL-1Ra. It has been previously reported that GM-CSF, LPS and TNF- α induce de novo neutrophil protein synthesis of IL-1Ra released into the milieu (24). Because the molecular mass of IL-1Ra is about 23 kDa, we suspected that the protein synthesized in response to IL-15 was IL-1Ra. We performed Western blots with the collected supernatants from unstimulated as well as from GM-CSF- or IL-15-induced neutrophils, using a commercially available neutralizing anti-human IL-1Ra antibody known to be suitable for Western blot and ELISA experiments. As illustrated in **Fig. 2**, IL-1Ra

expression was markedly increased in the supernatants from GM-CSF- or IL-15-induced neutrophils cells when compared to control cells. However, the intensity of the signal was weaker with IL-15 as compared to GM-CSF, corresponding with the intensity of the bands observed in **Fig. 1**. Our results strongly suggested that this protein was in fact IL-1Ra. To further demonstrate this, we then decided to investigate de novo synthesis of IL-1Ra. To do so, cells were metabolically labeled, stimulated, and supernatants were collected after 24h. Immunoprecipitation was performed using the same anti-IL-1Ra antibody. As illustrated in **Fig. 3**, the ~23 kDa detected from the supernatant was effectively IL-1Ra. Again, the intensity was weaker with IL-15 when compared with GM-CSF. Collectively, these data demonstrated that the major protein that is de novo synthesized and released into the supernatant of IL-15-induced neutrophils is IL-1Ra. We also performed immunoprecipitation with the intracellular fraction following metabolic labeling or not, and found that the levels of IL-1Ra remained similar regardless of whether cells were incubated with buffer, GM-CSF or IL-15 (*data not shown*).

Quantification of IL-1Ra, IL-1 α and IL-1 β in the intracellular and extracellular fractions from IL-15-induced neutrophils. Because of the importance of IL-1Ra in the general physiology of neutrophils in response to IL-1 α/β (25), we determined the concentration of this natural inhibitor found in both the intracellular and extracellular fractions of IL-15-induced neutrophils. As illustrated in **Fig. 4**, the levels of IL-1Ra found in the intracellular fractions were similar, whether cells

were stimulated with GM-CSF, IL-15 or even with LPS. Interestingly, the levels of IL-1Ra were significantly increased in the extracellular fractions from cells stimulated with GM-CSF or LPS and IL-15 at 250, but not 100 ng/ml. When plotting the results from both fractions, it became clear that the agonists induced the release of IL-1Ra into the external milieu (**Fig. 4**).

In parallel with the quantification of IL-1Ra, the concentrations of IL-1 α and IL-1 β were also quantified. As illustrated in **Fig. 5**, IL-15, unlike GM-CSF or LPS, does not significantly increase the production of IL-1 α in both fractions. Interestingly, GM-CSF was found to significantly increase IL-1 α levels in the intracellular, but not the extracellular fractions. LPS markedly increased the levels of IL-1 α in both fractions, suggesting that the cells release a higher amount of this cytokine over time. IL-15 did not significantly increase the levels of IL-1 β in both fractions, in contrast to GM-CSF and LPS (**Fig. 6**).

The production of neutrophil IL-1Ra by IL-15 is not linked with its ability to delay apoptosis. The direct role of IL-1Ra on neutrophil apoptosis has never been reported. Because IL-1Ra is the major product found in the supernatant of IL-15-induced neutrophils under experimental conditions in which IL-15 delays apoptosis, we were interested in studying its potential role during this biological process. Neutrophil apoptosis was evaluated by flow cytometry (FITC-Annexin-V binding and monitoring the CD16 expression) and by cytology. As illustrated in **Fig. 7**, addition of IL-1Ra in the culture did not alter the neutrophil apoptotic rate,

even at a concentration 250 times greater than that found in the extracellular milieu (500 ng/ml vs 2 ng/ml [2000 pg/ml in **Fig. 4**], respectively). This was not due to cell unresponsiveness, since, as expected, GM-CSF and IL-15 were found to delay neutrophil apoptosis (15).

IL-15-treated neutrophil-conditioned medium does not possess biological activity for delaying neutrophil apoptosis. Because of our interest in understanding the mechanism involved in IL-15-induced suppression of neutrophil apoptosis, and knowing that the major product IL-1Ra is not involved, we next investigated the role of the overall collected supernatant on neutrophil apoptosis. As illustrated in **Fig. 8**, when cells were incubated in the presence of 5, 10, 20, 50 or even 100% of IL-15-treated neutrophil-conditioned medium, the apoptotic rate remained similar to the basal apoptotic rate. However, the supernatant collected from GM-CSF-induced cells delayed apoptosis. This suggested that IL-15 does not modulate human neutrophil apoptosis via the release of a factor in the supernatant.

IL-15 delays human neutrophil apoptosis by a protein synthesis-dependent mechanism. Although we have previously suggested that IL-15 delays human neutrophils apoptosis via protein synthesis (15), this has not been directly investigated. Since IL-15-treated neutrophil-conditioned medium is devoid of activity for suppression of apoptosis, and since we recently found that IL-15 prevented the loss of the intracellular anti-apoptotic Mcl-1 protein, we next

investigated the role of protein synthesis dependency by treating cells in the presence of the potent protein synthesis inhibitor, CHX. As illustrated in **Fig. 9**, IL-15 did not delay neutrophil apoptosis when CHX was added in the culture. As expected, the antiapoptotic effect of GM-CSF was also inhibited by CHX. In order to further demonstrate the importance of intracellular protein synthesis in IL-15-induced suppression of human neutrophils, we monitored the expression of Mcl-1 and the cytoskeletal proteins vimentin and vinculin when CHX was added or not in the culture. As illustrated in **Fig. 10**, the levels of expression of Mcl-1 and vimentin proteins were decreased by the addition of CHX, but not vinculin, whose levels remained stable. This indicated that not all proteins are affected and that a selective mechanism exists.

DISCUSSION

IL-15 is a pro-inflammatory cytokine known as a general inhibitor of apoptosis. Despite this, its mode of action is still unclear and needs to be further elucidated. Under normal conditions, IL-15 production is under strict control (26-28), suggesting that unchecked release of this cytokine is not suitable for an organism. In this regard, elevated concentrations of IL-15 have been observed in several inflammatory disorders, including active sarcoidosis, chronic hepatitis C, active ulcerative colitis and rheumatoid arthritis (8-12). For example, up to 1200 pg/ml of IL-15 was detected in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients (12).

Several inhibitors of apoptosis are thought to act via de novo protein synthesis, since addition of CHX to the culture medium reverses this effect (29-31). Addition of this drug was reported to block TNF- α -mediated antiapoptotic signaling in neutrophils (32). Also, dexamethasone-induced suppression of neutrophil apoptosis was found to require continuous stimulation of new protein synthesis, based on the addition of CHX or actinomycin D (29,33). Prevention of apoptosis by GM-CSF was associated with induction of RNA and protein synthesis in neutrophils, since addition of actinomycin D or CHX reversed the effect (34). Even induction of MM46 mouse mammary carcinoma cell apoptosis by calprotectin was markedly inhibited by actinomycin D or CHX (35), suggesting that not only suppressors but also activators of apoptosis require de novo protein synthesis. Despite these observations, the role of de novo protein synthesis

during neutrophil apoptosis is still obscure, since newly synthesized polypeptides were not monitored after metabolic cell labeling.

Knowing that IL-15 induces *de novo* intracellular protein synthesis in neutrophils (15) and because of the importance in understanding how IL-15 delays apoptosis, we have hypothesized that this cytokine could act via the production and release of survival factor(s) in the milieu. A major newly synthesized polypeptide of ~23 kDa was detected in the supernatant of IL-15-induced neutrophils and identified as IL-1Ra. Despite the fact that IL-1Ra is the only as yet identified protein known to be *de novo* synthesized and released into the external milieu in response to GM-CSF, LPS or TNF- α (24), or IL-15 (this report), its direct role in neutrophil apoptosis has never been studied. We found that incubation of freshly isolated human neutrophils with rhIL-1Ra did not alter the apoptotic rate, even at a concentration 250 times greater than that which is detected after IL-15-treatment. It is important to mention that IL-15 did not significantly increase IL-1Ra levels at a concentration of 100 ng/ml, a concentration known to significantly delay neutrophil apoptosis (15, this report). This indicates that the mode of action of IL-15 for delaying neutrophil apoptosis is via an IL-1Ra-independent mechanism. Moreover, we can conclude that IL-15 delays this response by IL-1 α and IL- β -independent mechanisms, since IL-15 does not increase the production of intracellular and extracellular IL-1 α and IL- β . Our results contrast those reported in a unique study demonstrating that IL-15 can increase IL-1 β secretion by human neutrophils isolated from normal and

tumor-bearing patients (19). The discrepancies between these two studies may be related to the different experimental conditions used. Based on this, we believe that the major difference observed concerning the IL-1 β production in response to IL-15 resides in the fact that Jablonska et al. (2001) added 10% autologous serum to the culture and, in contrast to IL-15, they did not verify the level of IL-1 β present in the different sera (19). In our experiments, we added 5% FCS instead of 10% autologous serum to the culture. In one study, GM-CSF and LPS were reported to delay neutrophil apoptosis via an IL-1 β -dependent mechanism, since addition of an antisense oligonucleotide for IL-1 β , a blocking anti-IL-1 β antibody or a pre-incubation with IL-1Ra were found to reverse the suppression of apoptosis (36). In contrast to this study, pre-incubation with increasing concentrations of IL-1Ra failed to reverse the effect of IL-15 (*data not shown*), agreeing with the inability of IL-15 to increase IL-1 β production. Results from our experiments conducted with IL-15-treated neutrophil-conditioned medium indicate that, in contrast to GM-CSF, IL-15 does not delay apoptosis by the release of survival factors into the milieu. This presents the possibility that intracellular proteins are involved. In this respect, we recently demonstrated that IL-15 increases the expression of the antiapoptotic Mcl-1 protein, a member of the Bcl-2 family of proteins (18). Because we did not study de novo synthesis of Mcl-1 in these experiments, it was not clear whether the synthesis of Mcl-1 was increased or rather, if IL-15 prevents its loss by an unknown mechanism, as speculated by others in different systems (7,37,38). However, because Mcl-1 possesses a very short half-life and is subject to rapid turnover (37), induction of

its synthesis by IL-15 is plausible; this possibility was confirmed in the present study. GM-CSF was recently found to act via the regulation of Mcl-1 (38) indicating that, unlike IL-15, the mode of action of GM-CSF might involve both intra- and extracellular proteins which inhibit neutrophil apoptosis. Interestingly, we have recently demonstrated that IL-15, in contrast to GM-CSF, does not activate tyrosine phosphorylation of STAT5a/b (18), attesting to their different modes of action. The possibility that GM-CSF-treated neutrophil-conditioned medium delays apoptosis via free, available unbound GM-CSF is minimized by the fact that, in contrast to the total fluid, diluted from 1/1 (100%) to 1/20 (5%) which inhibits apoptosis, GM-CSF did not suppress apoptosis when diluted to a concentration which corresponds to 20% of the fluid (equivalent to 13 ng/ml) (*data not shown*).

In addition to Mcl-1, we found in this study that vimentin, but not vinculin, expression was also decreased by CHX treatment. This indicates that de novo synthesis of vimentin is potentially related to the ability of IL-15 to delay neutrophil apoptosis and that not all proteins are de novo synthesized in response to IL-15. Interestingly, it was recently found that vimentin is de novo synthesized and released into the milieu by activated human macrophages (39). This remains to be investigated in human neutrophils. However, if this was true, the concentration of vimentin released would be insufficient (or inactive), since we were unable to delay neutrophil apoptosis when cells were incubated in the presence of IL-15-treated neutrophil-conditioned medium. The importance of

cytoskeletal proteins in neutrophil apoptosis was recently demonstrated in gelsolin knock-out mice (*Gsn*^{-/-}). Neutrophils isolated from these animals were found to be more refractory to induction of apoptosis by TNF- α and CHX when compared with neutrophils isolated from wild type animals (40).

As previously mentioned, identification of proteins that are de novo synthesized from neutrophils has not been the object of numerous studies. In fact, except for IL-1Ra, only actin (15,41) and fibronectin (2) have been identified as being synthesized in response to an agent that suppresses human neutrophil apoptosis. Numerous studies indicate that stimulated neutrophils can produce/release different cytokines that can modulate apoptotic rate (1,42-45); however, none of these studies have demonstrated de novo synthesis of a particular cytokine following metabolic cell labeling.

Although IL-15 is frequently presented as a pro-inflammatory cytokine, data from the present study suggest that IL-15 might also induce an anti-inflammatory loop by increasing IL-1Ra production by neutrophils. Because we found that IL-15 did not induce these cells to produce IL-1 α and IL-1 β , but enhanced IL-1Ra production without altering apoptotic levels, it is tempting to speculate that IL-15 induces neutrophil IL-1Ra production rather than inhibiting or attenuating IL-1 α/β production from other cellular source(s). IL-1 is a critical mediator of inflammation, important in different pathologies leading to chronic inflammation, and it is well recognized that macrophages represent a major source of

proinflammatory cytokines, including TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, and chemokines including IL-8, MIP-1 α/β , etc. (46,47). To date, three forms of IL-1Ra have been identified: one soluble form (sIL-1Ra), and two intracellular forms (icIL-1RaI, and icIL-1RaII). Although sIL-1Ra is known to act as an IL-1 inhibitor by competitively binding to the IL-1 receptor without inducing signal transduction, the roles of both icIL-1RaI and icIL-1RaII remain to be determined. Interestingly, studies performed with IL-1Ra knockout mice indicate that the animals display growth retardation after weaning and an increased susceptibility to endotoxin-induced injury and collagen-induced arthritis, suggesting an important role not only in pathologic conditions, but also in general overall health.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mary Gregory for reading this manuscript.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *IL-15 induces the de novo synthesis of a neutrophil protein released into the external milieu with an apparent Mr of 23 kDa.* Human neutrophils (10×10^6 cells/ml) were metabolically labeled as described in Materials and Methods and incubated for 24 h in the presence or absence of stimuli. Extracellular fractions (supernatants) were prepared as described in Materials and Methods and then run on 15% SDS-PAGE. Lane 1, unstimulated cells; lane 2, 65 ng/ml GM-CSF; lane 3, 10 μ g/ml cycloheximide; and lane 4, 250 ng/ml IL-15. Results are from one representative experiment of 3. Note the very weak signal obtained after cycloheximide treatment on the film in lane 3 (^{35}S , upper panel) when compared to the total protein loaded in lane 3 (Coomassie blue, lower panel).

Figure 2. *Identification of the 23 kDa protein induced by IL-15 as IL-1Ra.* Freshly isolated neutrophils (300 μ l of a 10×10^6 cells/ml suspension) were incubated with buffer (Ctrl), GM-CSF (GM) or IL-15 as in legend of **Fig. 1**. Supernatants were harvested, prepared, and immunoblotting was performed with an anti-human IL-1Ra antibody as described in Materials and Methods. Note that the signal obtained with IL-15 is weaker than GM-CSF, but higher than control cells. Similar results were obtained with two other experiments performed with different blood donors.

Figure 3. *IL-1Ra is the most predominant protein de novo synthesized and released by IL-15-induced neutrophils.* Freshly isolated human neutrophils (300 μ l of a 10×10^6 cells/ml suspension) were metabolically labeled with 125 μ Ci of the Redivue Pro-Mix L- 35 S] *in vitro* cell labeling mix and stimulated with buffer (Ctrl), GM-CSF (GM) or IL-15, as described in **Fig. 1**. Supernatants were harvested, prepared, and immunoprecipitated using an anti-IL-1Ra antibody, as described in Materials and Methods. The upper panel illustrates the newly synthesized polypeptides detected following metabolic labeling (35 S) and the bottom panel is the corresponding gel stained with Coomassie blue indicating that the variation of radioactive polypeptide contents observed in the upper panel is not due to a variation in protein loading. Results are representative of four experiments.

Figure 4. *Quantification of IL-1Ra in the intracellular and extracellular fractions from IL-15-induced neutrophils.* Neutrophils were incubated for 24h in the presence of buffer (C), LPS (1 μ g/ml), GM-CSF (GM) or IL-15 (100 or 250 ng/ml) and intra and extracellular fractions were prepared for quantification of IL-1Ra by ELISA as described in Materials and Methods. Results are mean \pm SEM (from eight different blood donors). *, $p < 0.05$ by ANOVA.

Figure 5. *IL-15 does not induce IL-1 α production.* Neutrophils were isolated and stimulated as in legend of **Figure 4** and concentrations of IL-1 α were quantified by ELISA as described in Materials and Methods. Results are mean \pm SEM (eight different blood donors). Note that the donors were the same as those used in **Figure 4**. *, $p < 0.05$ by ANOVA.

Figure 6. *IL-15 does not induce IL-1 β production.* Neutrophils were isolated and stimulated (as described in **Figure 4**) and concentrations of IL-1 β were quantified by ELISA as described in Materials and Methods. Results are mean \pm SEM (eight different blood donors). Note that the donors were the same as those used in **Figures 4** and **5**. *, $p < 0.05$ by ANOVA.

Figure 7. *IL-1Ra does not modulate the apoptotic rate of human neutrophils.* Freshly isolated human neutrophils (10×10^6 cells/ml in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS) were incubated for 24h in the presence of buffer (Ctrl), GM-CSF (GM), IL-15 (250 ng/ml), or increasing concentrations of IL-1Ra (10, 100 or 500 ng/ml) and apoptosis was evaluated by flow cytometry (FITC-Annexin-V and FITC-CD16) and by cytology as described in Materials and Methods. Results are mean \pm SEM ($n \geq 3$). *, $p < 0.05$ by ANOVA.

Figure 8. *IL-15 does not modulate neutrophil apoptosis via the release of molecule(s) in the external milieu.* Freshly isolated human neutrophils (10×10^6 cells/ml in RPMI-1640 supplemented with 5, 10, 20, 50 or 100% of IL-15- or GM-CSF-conditioned medium) were incubated for 24h and apoptosis was evaluated by cytology. Results are means \pm SEM (n=4). *, $p < 0.05$ by ANOVA.

Figure 9. *Involvement of de novo protein synthesis in IL-15-induced suppression of neutrophil apoptosis.* Neutrophils (10×10^6 cells/ml) were treated with buffer (Ctrl), 65 ng/ml GM-CSF or 250 ng/ml IL-15 in the presence (+) or absence (-) of 10 μ g/ml cycloheximide (CHX) and apoptosis was assessed by cytology as described in Materials and Methods. Results are mean \pm SEM (n=3). *, $p < 0.05$ by ANOVA.

Figure 10. *IL-15 induces de novo neutrophil protein synthesis of Mcl-1 and vimentin, but not vinculin.* Neutrophils (10×10^6 cells/ml) were treated (as described in **Figure 9**) in the presence (+) or absence (-) of 10 μ g/ml cycloheximide (CHX) and the protein expression of Mcl-1, vimentin and vinculin was studied by Western blot as described in Materials and Methods. A, the same membrane was initially probed with anti-Mcl-1 antibody, stripped and re-probed with anti-vinculin antibody. B, the same experiment was performed with the anti-vimentin antibody. Bottom panels, the corresponding Coomassie blue-stained

membrane at the end of the experiment. Results are from one representative experiment out of 3.

FIGURE 1

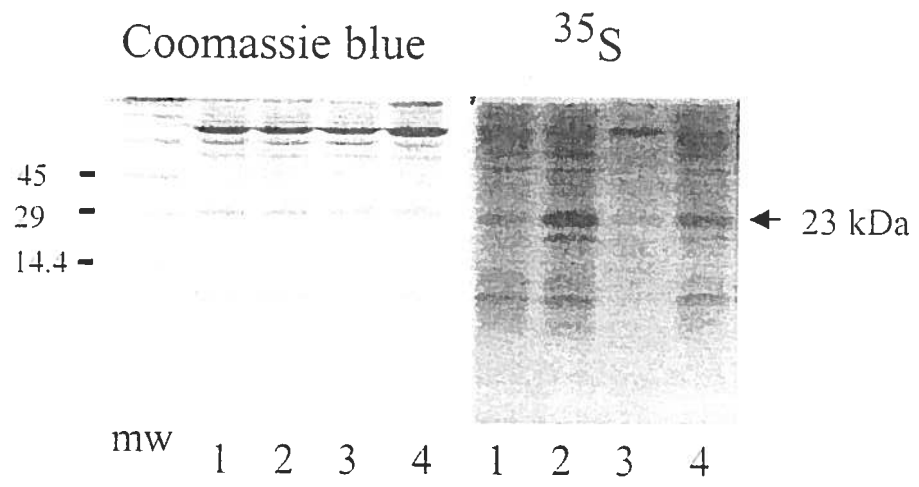


FIGURE 2

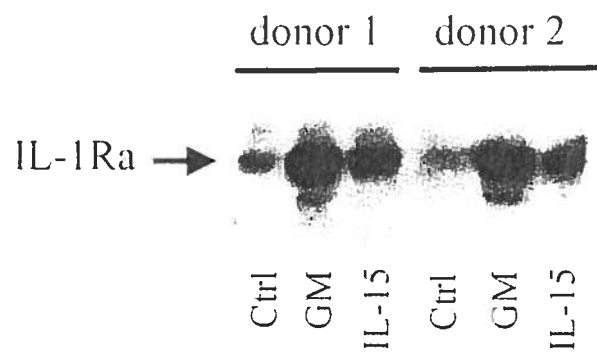


FIGURE 3

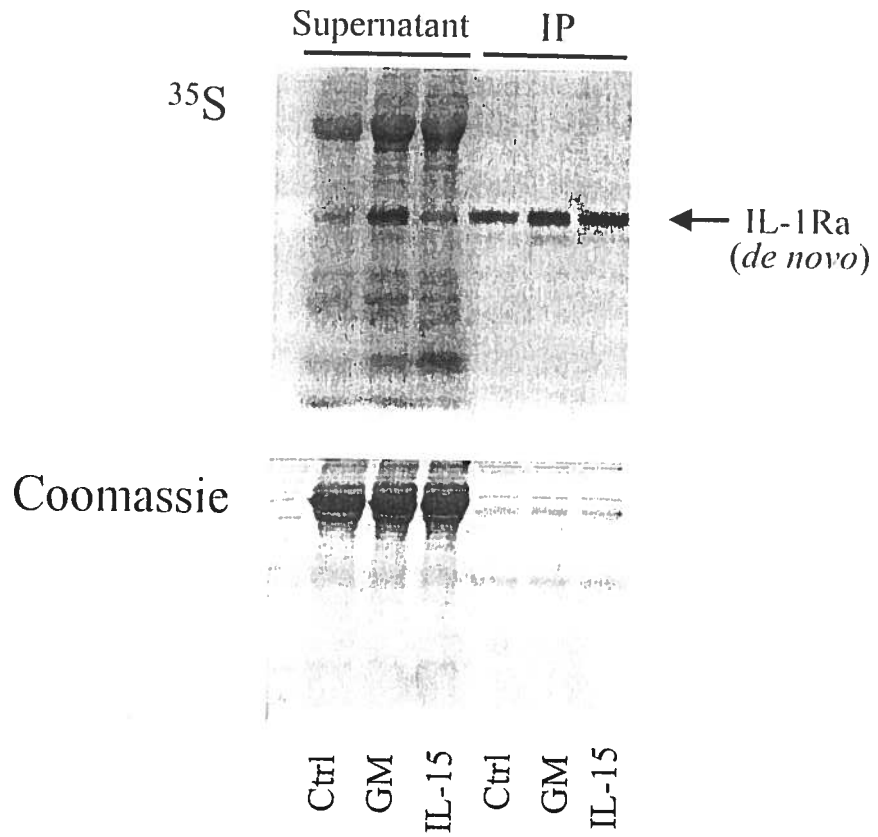


FIGURE 4

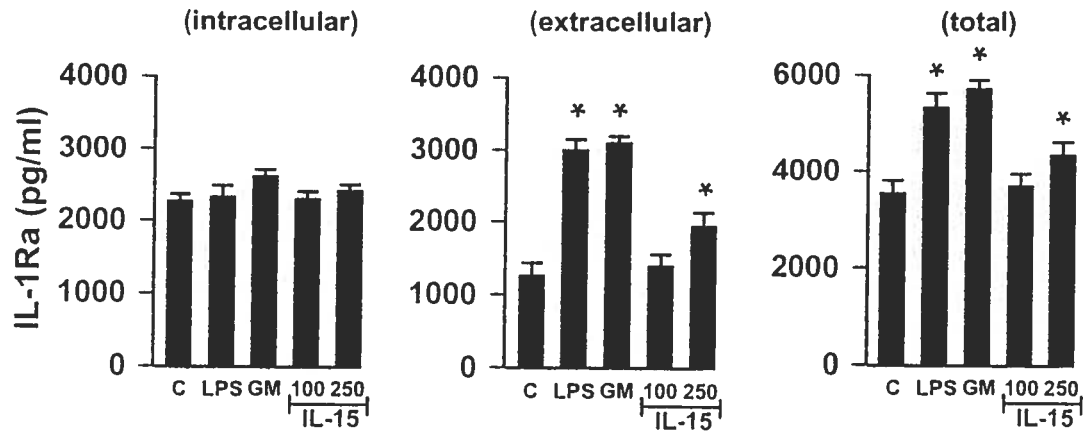


FIGURE 5

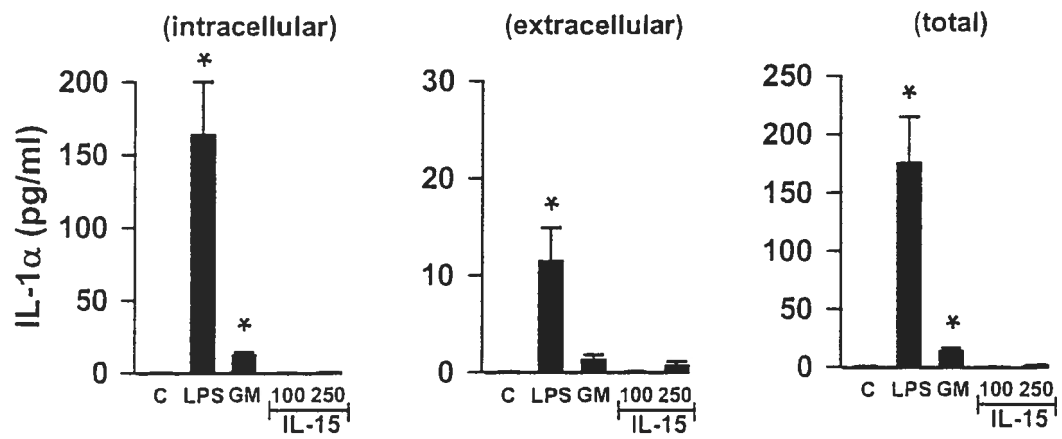


FIGURE 6

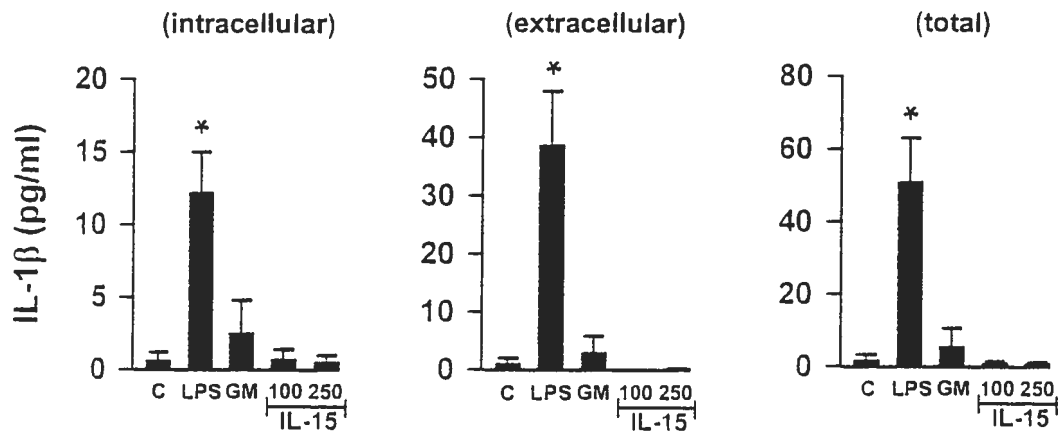


FIGURE 7

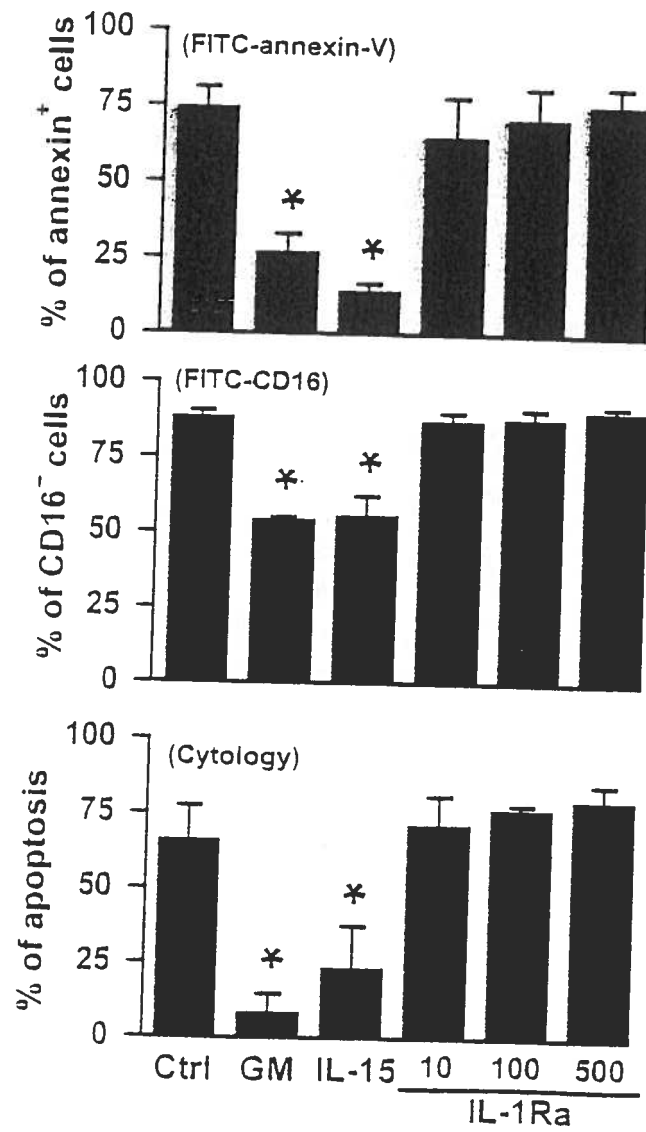


FIGURE 8

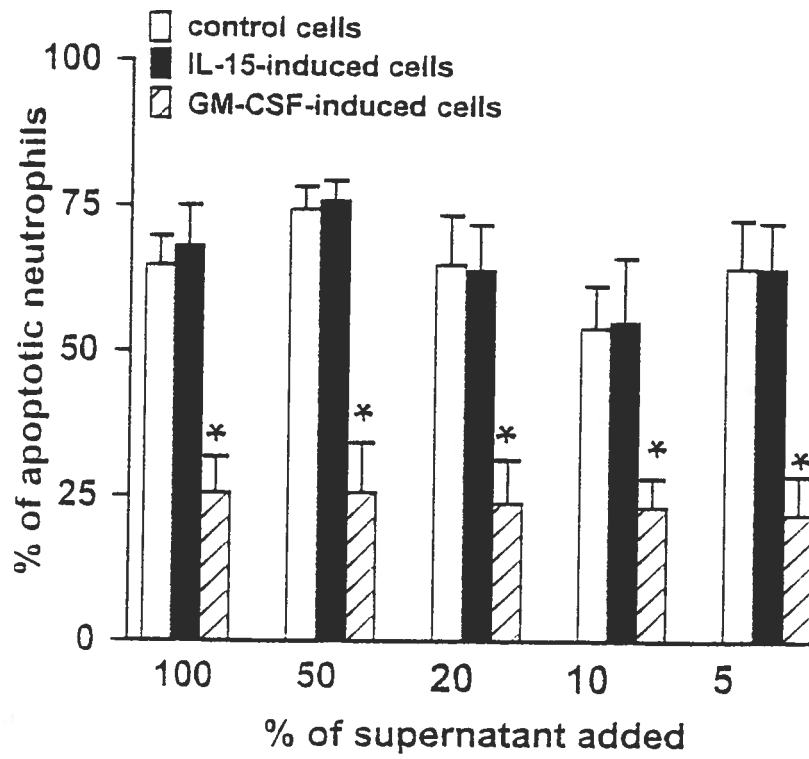


FIGURE 9

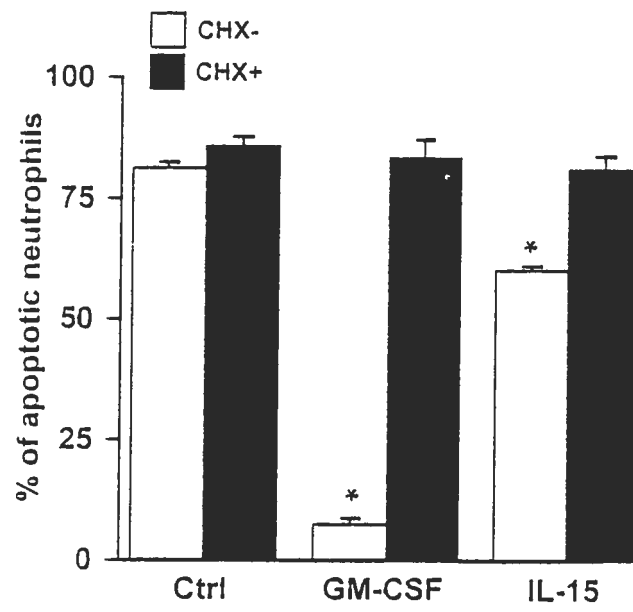
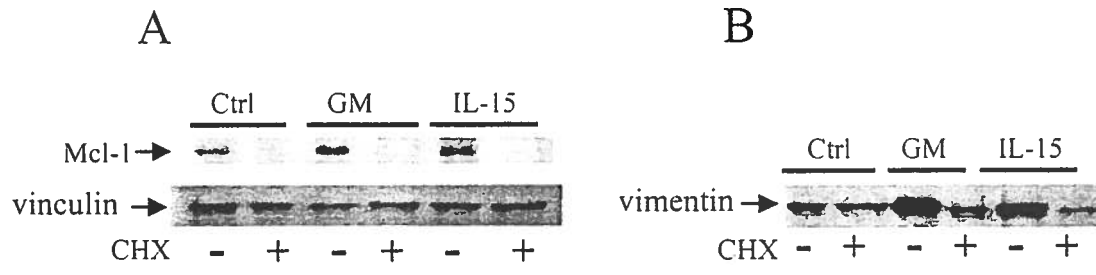


FIGURE 10



REFERENCES

1. Al-Mohanna, F., S. Saleh, R. S. Parhar, and K. Collison. 2002. IL-12-dependent nuclear factor-kappaB activation leads to de novo synthesis and release of IL-8 and TNF-alpha in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 72:995.
2. Wagner, C., M. Pioch, C. Meyer, C. Iking-Konert, K. Andrassy, and G. M. Hansch. 2000. Differentiation of polymorphonuclear neutrophils in patients with systemic infections and chronic inflammatory diseases: evidence of prolonged life span and de novo synthesis of fibronectin. *J. Mol. Med.* 78:337.
3. Crepaldi, L., L. Silveri, F. Calzetti, C. Pinaridi, and M. A. Cassatella. 2002. Molecular basis of the synergistic production of IL-1 receptor antagonist by human neutrophils stimulated with IL-4 and IL-10. *Int. Immunol.* 14:1145.
4. Zhou, Z., C. Richard, and H. A. Menard. 2000. De novo synthesis of proteinase 3 by cytokine primed circulating human polymorphonuclear neutrophils and mononuclear cells. *J. Rheumatol.* 27:2406.
5. Savill, J. 1997. Apoptosis in resolution of inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 1:375.
6. Ward, C., I. Dransfield, E. R. Chilvers, C. Haslett, and A. G. Rossi. 1999. Pharmacological manipulation of Granulocyte apoptosis: potential therapeutic targets. *Trends Pharmacol. Sci.* 20:503.

7. Akgul, C., D. A. Moulding, and S. W. Edwards. 2001. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett.* 487:318.
8. Fehniger, T. A. and M. A. Caligiuri. 2001. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 97:14.
9. McInnes, I. B. and F. Y. Liew. 1998. Interleukin 15: a proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis. *Immunol. Today* 19:75.
10. McInnes, I. B., B. P. Leung, R. D. Sturrock, M. Field, and F. Y. Liew. 1997. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 3:189.
11. McInnes, I. B., J. al-Mughales, M. Field, B. P. Leung, F. P. Huang, R. Dixon, R. D. Sturrock, P. C. Wilkinson, and F. Y. Liew. 1996. The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat Med.* 2:175.
12. Thurkow, E. W., I. M. van der Heijden, F. C. Breedveld, T. J. Smeets, M. R. Daha, P. M. Kluin, A. E. Meinders, and P. P. Tak. 1997. Increased expression of IL-15 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis compared with patients with Yersinia-induced arthritis and osteoarthritis. *J. Pathol.* 181:444.

13. Girard, D., N. Boiani, and A. D. Beaulieu. 1998. Human neutrophils express the interleukin-15 receptor alpha chain (IL-15Ralpha) but not the IL-9Ralpha component. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 88:232.

14. Musso, T., L. Calosso, M. Zucca, M. Millesimo, M. Puliti, S. Bulfone-Paus, C. Merlino, D. Savoia, R. Cavallo, A. N. Ponzi, and R. Badolato. 1998. Interleukin-15 activates proinflammatory and antimicrobial functions in polymorphonuclear cells. *Infect. Immun.* 66:2640.

15. Girard, D., M. E. Paquet, R. Paquin, and A. D. Beaulieu. 1996. Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood* 88:3176.

16. McDonald, P.P., M. P. Russo, S. Ferrini, and M. A. Cassatella. 1998. Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils. *Blood* 92:4828.

17. Pelletier, M., V. Lavastre, A. Savoie, C. Ratthé, R. Saller, K. Hostanska, and D. Girard. 2001. Modulation of interleukin-15-induced human neutrophil responses by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I. *Clin. Immunol.* 101:229.

18. Pelletier, M., C. Ratthé, and D. Girard. 2002. Mechanisms involved in interleukin-15-induced suppression of human neutrophil apoptosis: role of the antiapoptotic Mcl-1 protein and several kinases including Janus kinase-2, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases-1/2. *FEBS Letters* 532:164.
19. Jablonska, E., L. Piotrowski, M. Kiluk, J. Jablonski, Z. Grabowska, and W. Markiewicz. Effect of IL-15 on the secretion of IL-1beta, IL-1Ra and sIL-1RII by PMN from cancer patients. *Cytokine* 16:173.
20. Lavastre, V., M. Pelletier, R. Saller, K. Hostanska, and D. Girard. 2002. Mechanisms involved in spontaneous and Viscum album agglutinin-I-induced human neutrophil apoptosis: Viscum album agglutinin-I accelerates the loss of antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of cytoskeletal paxillin and vimentin proteins via caspases. *J. Immunol.* 168:1419.
21. Ratthé, C., M. Pelletier, C. J. Roberge, and D. Girard. 2002. Activation of human neutrophils by the pollutant sodium sulfite: effect on cytokine production, chemotaxis, and cell surface expression of cell adhesion molecules. *Clin. Immunol.* 2002 105:169.

22. Pelletier, M., A. Savoie, and D. Girard. 2000. Activation of human neutrophils by the air pollutant sodium sulfite (Na₂SO₃): comparison with immature promyelocytic HL-60 and DMSO-differentiated HL-60 cells reveals that Na₂SO₃ is a neutrophil but not a HL-60 cell agonist. *Clin. Immunol.* 96:131.
23. Dransfield, I., A. M. Buckle, J. S. Savill, A. McDowall, C. Haslett, and N. Hogg. 1994. Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression. *J. Immunol.* 153:1254.
24. McColl, S. R., R. Paquin, C. Menard, and A. D. Beaulieu. 1992. Human neutrophils produce high levels of the interleukin 1 receptor antagonist in response to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 176:593.
25. Arend, W. P. 2002. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13:323.
26. Anderson, D. M., S. Kumaki, M. Ahdieh, J. Bertles, M. Tometsko, A. Loomis, J. Giri, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, V. Valentine, D. N. Shapiro, S. W. Morris, L. S. Park, and D. Cosman. 1995. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J. Biol. Chem.* 270: 29862.

27. Pereno, R., J. Giron-Michel, A. Gaggero, E. Cazes, R. Meazza, M. Monetti, E. Monaco, Z. Mishal, C. Jasmin, F. Indiveri, S. Ferrini, and B. Azzarone. 2000. IL-15/IL-15R α intracellular trafficking in human melanoma cells and signal transduction through the IL-15R α . *Oncogene* 19:5153.
28. Pereno, R., A. Gaggero, M. Scudeletti, L. Lanza, R. Meazza, Z. Mishal, C. Jasmin, F. Indiveri, S. Ferrini, and B. Azzarone. 1999. IL-15/IL-15R α intracellular trafficking in human cells and protection from apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 876:236.
29. Cox, G. and R. C. Austin. 1997. Dexamethasone-induced suppression of apoptosis in human neutrophils requires continuous stimulation of new protein synthesis. *J. Leukoc. Biol.* 61: 224.
30. Maianski, N. A., F. P. Mul, J. D. van Buul, D. Roos, and T. W. Kuijpers. 2002. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits the mitochondria-dependent activation of caspase-3 in neutrophils. *Blood* 99:672.
31. Sakamoto, C., K. Suzuki, F. Hato, M. Akahori, T. Hasegawa, M. Hino, and S. Kitagawa. 2003. Antiapoptotic effect of granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and cyclic AMP on human neutrophils: protein synthesis-dependent and protein synthesis-independent mechanisms and the role of the Janus kinase-STAT pathway. *Int. J. Hematol.* 77:60.

32. Kilpatrick, L. E., J. Y. Lee, K. M. Haines, D. E. Campbell, K. E. Sullivan, and H. M. Korchak. 2002. A role for PKC-delta and PI 3-kinase in TNF-alpha-mediated antiapoptotic signaling in the human neutrophil. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283:C48.
33. Kato, T., Y. Takeda, T. Nakada, and F. Sendo. 1995. Inhibition by dexamethasone of human neutrophil apoptosis in vitro. *Nat. Immun.* 14: 198.
34. Brach, M. A., S. deVos, H. J. Gruss, and F. Herrmann. 1992. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood* 80: 2920.
35. Mikami, M., M. Yamazaki, and S. Yui. 1998. Kinetic analysis of tumor cell death-inducing mechanism by polymorphonuclear leukocyte-derived calprotectin: involvement of protein synthesis and generation of reactive oxygen species in target cells. *Microbiol Immunol.* 4: 211.
36. Watson, R. W., O. D. Rotstein, J. Parodo, R. Bitar, and J. C. Marshall. 1998. The IL-1 beta-converting enzyme (caspase-1) inhibits apoptosis of inflammatory neutrophils through activation of IL-1 beta. *J. Immunol.* 161: 957.

37. Moulding, D. A., C. Akgul, M. Derouet, M. R. White, and S. W. Edwards. 2001. BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 70:783.
38. Epling-Burnette, P. K., B. Zhong, F. Bai, K. Jiang, R. D. Bailey, R. Garcia, R. Jove, J. Y. Djeu, T. P. Loughran Jr, and S. Wei. 2001. Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils. *J. Immunol.* 166:7486.
39. Mor-Vaknin, N., A. Punturieri, K. Sitwala, and D. M. Markovitz. 2003. Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nat. Cell Biol.* 5:59.
40. Kothakota, S., T. Azuma, C. Reinhard, A. Klippel, J. Tang, K. Chu, T. J. McGarry, M. W. Kirschner, K. Kohts, D. J. Kwiatkowski, and L. T. Williams. 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278:294.
41. Girard, D., R. Paquin, and A. D. Beaulieu. 1997. Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem. J.* 325:147.

42. Grenier, A., M. Dehoux, A. Boutten, M. Arce-Vicioso, G. Durand, M. A. Gougerot-Pocidallo, and S. Chollet-Martin. 1999. Oncostatin M production and regulation by human polymorphonuclear neutrophils. *Blood* 93:1413.
43. McCain, R.W., E. P. Holden, T. R. Blackwell, and J. W. Christman. 1994. Leukotriene B4 stimulates human polymorphonuclear leukocytes to synthesize and release interleukin-8 in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 10:651.
44. Scapini, P., C. Laudanna, C. Pinardi, P. Allavena, A. Mantovani, S. Sozzani, and M. A. Cassatella. 2001. Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19. *Eur. J. Immunol.* 31:1981.
45. Cassatella, M. A. 1995. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol. Today* 16:21.
46. Mosser, D. M. 2003. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 73:209.
47. Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3:23.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les neutrophiles ont un processus apoptotique bien particulier. Contrairement à la plupart des cellules du système immunitaire, ces leucocytes meurent de façon spontanée en moins de 24 heures et démontrent une dépendance à la synthèse protéique *de novo* pour le maintien de leur survie. L'IL-15 est une cytokine pro-inflammatoire reconnue pour empêcher l'apoptose spontanée des neutrophiles, mais son mode d'action reste toujours obscur. On sait que cette cytokine a certains points en commun avec d'autres agents capable de retarder l'apoptose des neutrophiles. Entre autres, l'IL-15 induit la synthèse protéique *de novo* (Girard et al., 1996 : 3176) et son activité semble être dépendante de cet événement, puisque la VAA-I et la cycloheximide, deux inhibiteurs de l'activité ribosomale, peuvent toutes les deux bloquer l'action de cette cytokine (Pelletier et al., 2001 : 229 ; le présent article). C'est aussi le cas du G-CSF, du GM-CSF, de l'IL-1 β , du LPS, du TNF- α et de la dexaméthasone dont les effets anti-apoptotique sont aussi annulés par des inhibiteurs de traduction ou de transcription (Hachiya et al., 1995 : 715 ; Kato et al., 1995 : 198 ; Cox et Austin, 1997 : 224 ; Watson et al., 1998 : 957 ; Ward et al., 1999 : 4309 ; Maiani et al., 2002 : 672 ; Sakamoto et al., 2003 : 60). Cependant, la nature des protéines nouvellement synthétisées par ces agonistes reste encore à déterminer.

Dans notre étude du mécanisme causant le retard d'apoptose des neutrophiles par l'IL-15, nous avons d'abord voulu savoir si cette cytokine pouvait induire la synthèse et la sécrétion d'un facteur soluble. Cette hypothèse découlait du fait que certains agents pro-inflammatoires induisent la sécrétion dans le milieu extracellulaire de molécules qui, à leur tour, retardent l'apoptose des neutrophiles de façon autocrine ou paracrine. En outre, le LPS et le GM-CSF induisent la production d'IL-1 β (Watson et al., 1998 : 957) et l'IL-6 fait produire le facteur PAF (Biffi et al., 1996 : 575) par les neutrophiles, ce qui a pour conséquence de retarder davantage l'apoptose de ces derniers. Nous avons démontré que l'IL-15 induisait non seulement la sécrétion de l'IL-1Ra par les neutrophiles, mais aussi que cet antagoniste était synthétisé *de novo* avant d'être relâché dans le milieu extracellulaire. Ces résultats confirment les observations de Malyak et collaborateurs, ainsi que ceux de McColl *et al.* qui ont démontré la synthèse de l'IL-1Ra par marquage

métabolique au ^{35}S suite à une incubation des neutrophiles en présence de LPS, de TNF- α ou de GM-CSF (Malyak et al., 1994 : 20). L'IL-15 s'ajoute donc à la liste d'agents pouvant induire l'expression et la sécrétion de l'IL-1Ra *in vitro* par les neutrophiles, dont faisaient déjà partie le LPS, le fMLP, le GM-CSF, le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-4 et l'IL-13 (Cassatella, 1999 : 369).

Jusqu'à présent, seulement trois formes de l'IL-1Ra ont été identifiées, soit deux formes intracellulaires (icIL-1RaI et icIL-1RaII), dont les fonctions ne sont pas encore bien définies, et une forme soluble (sIL-1Ra) (Malyak et al., 1998 : 2004). Cependant, lorsque nous avons effectué un immunobuvardage de type western en deux dimensions, six polypeptides différents ont été reconnus par l'anticorps anti-IL-1Ra (voir la **figure 5**, en annexe). Cinq de ces polypeptides migrent à la même hauteur (poids moléculaire) mais ont des points isoélectriques différents, alors que deux autres se sont immobilisés vis-à-vis le même pH mais ont poids moléculaires différents. Ce même patron a été observé lorsque nous avons migré sur gel SDS-PAGE 2D le surnageant de neutrophiles radiomarqués au ^{35}S dont on sait maintenant que le principal élément est l'IL-1Ra (voir la **figure 6**, en annexe). Nous ignorons si ces différents points correspondent à des isoformes d'IL-1Ra, des modifications post-transcriptionnelles de la protéine ou sont simplement des artéfacts de manipulation en laboratoire. Il faudra donc élucider cette constatation en microséquençant les différents polypeptides observés. Il nous sera alors possible d'affirmer s'il existe ou non plus d'un isoforme de l'IL-1Ra soluble. Pour l'instant, les quantités d'IL-1Ra obtenues sont trop petites pour que nous puissions les microséquencer, puisque l'on doit colorer nos gels au nitrate d'argent pour visualiser la protéine (voir la **figure 7**, en annexe), la coloration au bleu de Coomassie n'étant pas assez sensible.

N'ayant observé aucune modulation directe de l'apoptose des neutrophiles par l'IL-1Ra ni aucune production d'IL-1 α ou d'IL-1 β par l'IL-15, nous en avons conclu que la sécrétion d'IL-1Ra par les neutrophiles n'était pas liée à la modulation de leur apoptose, soit directement ou via la voie de l'IL-1. Il serait donc probable que cette production d'IL-1Ra affecte d'autres cellules impliquées dans l'inflammation *in vivo*. Il est à noter

que nos résultats sont en contradiction avec l'équipe de Jablonska *et al.* qui a observé une production d'IL-1 β par les neutrophiles stimulés à l'IL-15 *in vitro* (Jablonska et al., 2001 : 173). Nous croyons que la différence entre les deux études réside dans les différentes conditions expérimentales utilisées. Tout d'abord, l'équipe polonaise a isolé ses neutrophiles par gradient de Gradisol G, une méthode plus rapide que le Ficoll-Paque, mais qui pourrait influencer le niveau d'activation des cellules. De plus, nous avons utilisé du sérum de veau fœtal dans nos incubations, contrairement au sérum autologue utilisés par nos homologues. Nous croyons ainsi avoir limité l'ajout d'éléments solubles provenant du sérum autologue qui pourraient influencer les résultats quant à la quantification des cytokines par ELISA. Il serait aussi possible que la densité cellulaire ait influencé les résultats respectifs, quoique Jablonska et ses collègues aient incubé leurs neutrophiles à une concentration deux fois moindre que la nôtre. Une confirmation des données obtenues dans ces études en contrôlant les différents paramètres mentionnés ici mériterait donc d'être effectuée. Nous avons cependant vérifié si un excès d'IL-1Ra dans le milieu pouvait influencer le taux d'apoptose des neutrophiles en bloquant l'effet de toute IL-1 pouvant s'y retrouver. L'ajout de fortes concentrations d'IL-1Ra recombinant n'a pas modulé l'apoptose des neutrophiles (voir la **figure 8**, en annexe), contrairement à ce qui avait été fait auparavant chez des neutrophiles stimulés au LPS et au GM-CSF, deux agents connus pour induire la production d'IL-1 β (Watson et al., 1998 : 957). De plus, puisque l'IL-1 β augmente elle aussi la production d'IL-1Ra par les neutrophiles, cela expliquerait pourquoi nous avons observé une plus forte sécrétion de l'IL-1Ra par le GM-CSF que par l'IL-15. Nous pouvons donc conclure qu'aux conditions expérimentales utilisées dans notre laboratoire l'IL-15 n'induit pas la sécrétion d'IL-1 par les neutrophiles humains.

Mis à part la sécrétion de l'IL-1Ra, il est pratiquement certain que l'IL-15 induit la sécrétion d'autres molécules par les neutrophiles. Cependant, puisque le surnageant provenant de cellules stimulées à l'IL-15 ne semble pas avoir d'activité anti-apoptotique sur les neutrophiles, nous pouvons en déduire que l'IL-15 ne génère pas une boucle d'amplification positive de son signal comme le font d'autres cytokines. Ce mode d'action de l'IL-15 sur les neutrophiles se distingue également de l'effet qu'a cette même

cytokine sur les éosinophiles. En effet, il a été démontré que l'IL-15 induisait la sécrétion de GM-CSF par les éosinophiles *in vitro*, facteur qui serait à l'origine du retard d'apoptose observé chez ces cellules (Hoontrakoon et al., 2002 : 404). L'IL-15 agirait donc chez les neutrophiles de la même manière que la dexaméthasone, soit uniquement via la modulation des protéines intracellulaires (Cox et Austin, 1997 : 224). Cette conclusion serait toutefois en désaccord avec les affirmations de McDonald et collègues, ainsi que celles de Musso et collaborateurs, puisque ces deux équipes ont rapporté que les neutrophiles stimulés à l'IL-15 produisaient de l'IL-8 *in vitro*, cytokine pouvant elle aussi retarder l'apoptose de ces cellules (Kettritz et al., 1998 : 84 ; McDonald et al., 1998 : 4828 ; Musso et al., 1998 : 2640). Cependant, cette observation n'a jamais été reproduite dans notre laboratoire. Si toutefois il y a bel et bien production d'IL-8 par les neutrophiles suite à une stimulation à l'IL-15, cette production est soit insuffisante soit ineffective pour moduler l'apoptose des neutrophiles. Néanmoins, nous n'excluons pas la possibilité que certains facteurs solubles sécrétés par les neutrophiles en présence d'IL-15 aient un effet pro-inflammatoire *in vivo*. Par exemple, il a été spéculé que l'IL-15 pourrait être à l'origine de la production d'IL-17 par les neutrophiles (Ferretti et al., 2003 : 2106). Cette dernière est, entre autres, connue pour induire la production de chimioattractants par les cellules endothéliales et ainsi recruter des neutrophiles et amplifier l'inflammation, en particulier dans les voies respiratoires (Laan et al., 1999 : 2347).

La synthèse de protéines intracellulaires par les neutrophiles suite à la liaison de l'IL-15 à son récepteur est établie depuis déjà quelques années (Girard et al., 1996 : 3176). Cependant, seule l'actine avait été identifiée comme étant une des protéines nouvellement produite. Suite à notre étude, nous pouvons maintenant affirmer que l'IL-1Ra, Mcl-1 et la vimentine sont aussi synthétisées *de novo* par l'IL-15. Il avait déjà été établi dans notre laboratoire que les niveaux de la protéine Mcl-1 étaient maintenus par l'IL-15 (Pelletier, Rathé et Girard, 2002 : 164). De plus, la corrélation entre les niveaux de Mcl-1 et l'apoptose a été bien établie (Moulding et al., 1998 : 2495). Étant donné la courte durée de vie de cette protéine et de son ARNm, le maintien de son expression pourrait s'effectuer soit en augmentant sa synthèse *de novo*, soit en prévenant sa dégradation. Il avait déjà été démontré que Mcl-1 devait être constamment resynthétisée pour que son

expression intracellulaire soit maintenue, puisque sa suppression par des oligonucléotides antisenses ou par un blocage de la transcription ou de la traduction diminuent de façon significative les niveaux d'ARNm et de protéines chez les neutrophiles (Leuenroth et al., 2000 : 158 ; Moulding et al., 2001 : 783). Il a aussi été suggéré que les agents pro-inflammatoires tel le GM-CSF induisait l'expression *de novo* de Mcl-1 étant donné que les niveaux de son ARNm et de sa protéine augmentent avec le temps en présence de ce facteur de croissance (Epling-Burnette et al., 2001 : 7486). La même étude a également démontré une liaison directe entre Bax et Mcl-1 pouvant expliquer sa régulation. Cependant, il n'a pas été prouvé hors de tout doute que les agents pro-inflammatoires induisent une augmentation de la synthèse *de novo* de Mcl-1 étant donné que son expression est constitutive et que la stabilisation de la protéine empêchant sa dégradation pourrait expliquer son accumulation intracellulaire suite à une stimulation des neutrophiles. Notre étude démontre que les niveaux de Mcl-1 suite à un blocage de la synthèse protéique sont presque nuls, peu importe la stimulation des cellules (**figure 10** de l'article). Malgré que cette preuve ne soit pas aussi éloquente qu'une immunoprécipitation radioactive de la protéine, elle laisse entendre que le niveau de base de Mcl-1 présent dans les neutrophiles a été réduit suite à une dégradation de la protéine. En effet, si le GM-CSF et l'IL-15 avaient simplement empêché la protéolyse de Mcl-1, les niveaux de cette protéine observés suite au blocage de la synthèse *de novo* seraient plutôt semblables à ceux des cellules témoins, puisqu'un niveau minimal de Mcl-1 aurait été maintenu. Ce n'est donc pas le cas, puisque après 24 heures de culture, il ne reste pratiquement plus de Mcl-1 lorsque les neutrophiles ont été cultivés en présence de cycloheximide. Ceci est cohérent étant donné que sa demi-vie est d'environ 30 minutes (Akgul et al., 2000 : 684). En conséquence, nos résultats sont les premiers à démontrer que le GM-CSF et l'IL-15 augmentent la synthèse *de novo* de Mcl-1. Nous en déduisons également que cette augmentation serait directement liée à la capacité de ces deux cytokines à empêcher l'apoptose spontanée des neutrophiles.

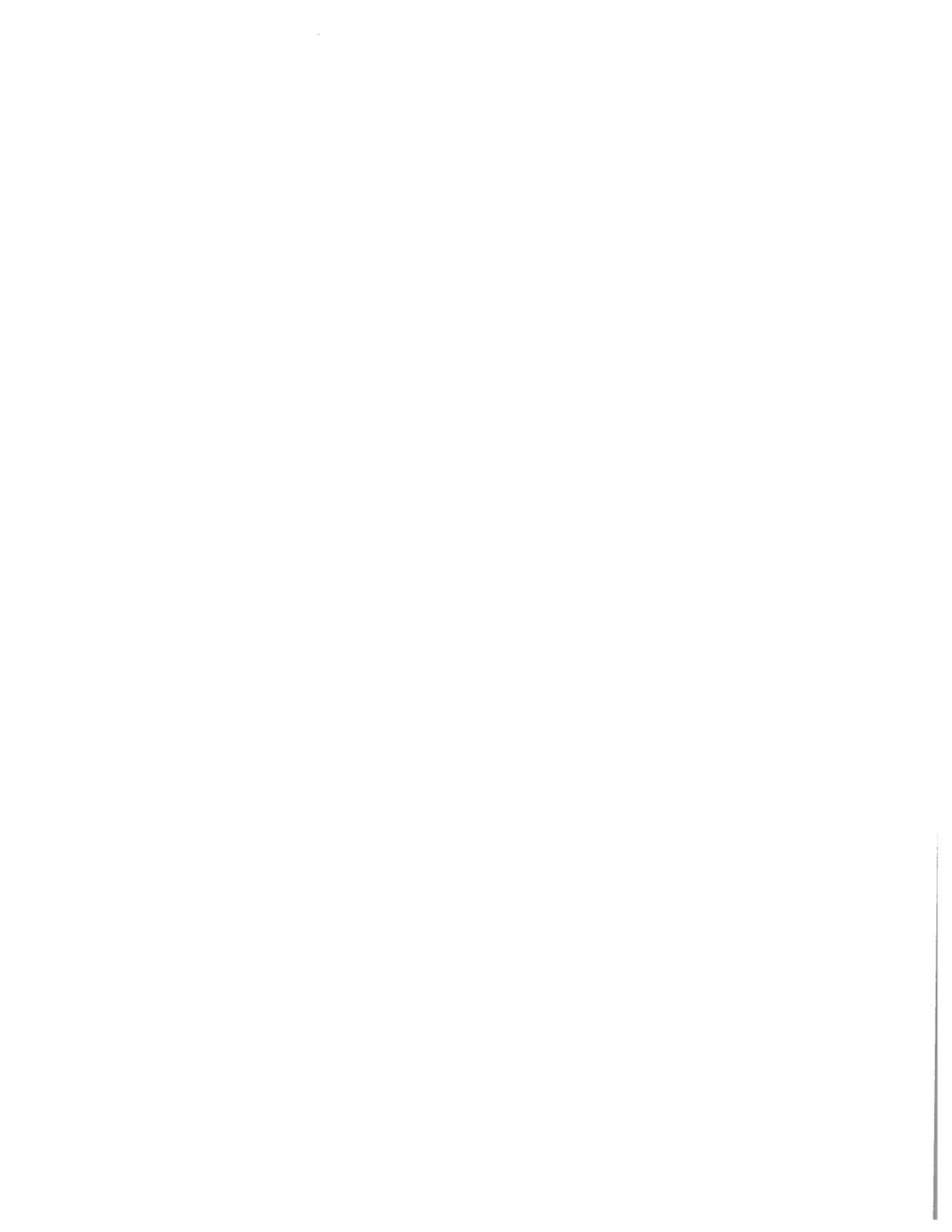
Le rôle de l'IL-1Ra et de Mcl-1 dans l'apoptose des neutrophiles sont maintenant établis, mais ceux de l'actine et de la vimentine restent encore à élucider. La place du cytosquelette dans le processus apoptotique n'est pas encore bien définie. En effet, on ne

sait toujours pas si les changements observés au niveau des différentes composantes du cytosquelette sont le résultat direct de l'activation des protéases impliquées dans l'apoptose ou si la réorganisation du cytosquelette ne serait pas plutôt un événement essentiel à l'exécution de la mort cellulaire programmée. Quelques études récentes tendent vers le deuxième scénario, suggérant un rôle plus actif du cytosquelette dans certains modèles apoptotiques. Par exemple, il a été démontré que les monomères d'actine bloquent l'activité endonucléase de la DNase I (Hall, 1994 : 125) et que la désagrégation de l'actine par les caspases permettrait la libération de la DNase I du cytosquelette permettant sa translocation et son action dans le noyau (Kayalar et al., 1996 : 2234). De plus, la gelsoline, une protéine associée à l'actine, a été identifiée comme ayant des propriétés anti-apoptotiques via le blocage des canaux anioniques des mitochondries (Kusano et al., 2000 : 4807). La vimentine pourrait elle aussi être impliquée dans l'apoptose puisque des cellules Jurkat transfectées avec une vimentine recombinante dont les sites de clivages des caspases avaient été mutés étaient réfractaires à l'apoptose (Belichenko, Morishima et Separovic, 2001 : 57). Ainsi, la dégradation des protéines du cytosquelette n'est probablement pas une simple conséquence des différents événements de l'apoptose, mais plutôt un élément essentiel dans l'exécution de ce phénomène. Il reste cependant encore à découvrir le rôle de la synthèse *de novo* de ces protéines lors de la mort cellulaire. Toutefois, d'après nos observations, l'expression de la vinculine serait très peu impliquée dans l'apoptose puisque son niveau d'expression tend à rester constant selon l'état apoptotique des neutrophiles. Ceci indique donc que les protéines du cytosquelette auraient des fonctions différentes et sont probablement régulées de façon sélective lors de l'apoptose.

En conclusion, l'IL-15 peut maintenant être considérée non seulement comme une cytokine pro-inflammatoire, mais aussi comme un élément déclencheur d'une régulation négative de l'inflammation via la synthèse de l'IL-1Ra par les neutrophiles. Cette régulation pourrait s'effectuer par le blocage des récepteurs à l'IL-1 sur les cellules impliquées dans l'inflammation en réponse à une surproduction d'IL-1 par d'autres types cellulaires que les neutrophiles eux-mêmes. La balance locale entre l'IL-1 α/β et l'IL-1Ra dans les tissus semble être un bon indicateur de l'état de l'inflammation aiguë ou

chronique. Par exemple, dans l'arthrite rhumatoïde, la concentration d'IL-1Ra présente dans le liquide synovial des patients est insuffisante pour contrer la forte quantité d'IL-1 aussi présente au même endroit (Arend, 2001 : 1). Il est à noter que l'IL-15 est aussi impliquée dans la pathologie de cette maladie (McInnes et Liew, 1998 : 75). Une forme d'IL-1Ra recombinante est également utilisée dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde (Garces, 2001 : 1).

Il reste encore beaucoup de travail à faire concernant les protéines intracellulaires dont la synthèse est induite par l'IL-15 avant de dresser une liste complète de celles-ci. Certaines protéines anti-apoptotiques présentes chez les neutrophiles telles que cIAP2 et A1 pourraient être impliquées (Moulding et al., 2001 : 783 ; Hasegawa et al., 2003 : 1164). Les mêmes méthodes que celles ayant servi à l'identification de la protéine Mcl-1 comme étant un facteur important de survie chez les neutrophiles pourraient être utilisées pour ces protéines connues. Par la suite, il serait possible de retirer les protéines ciblées à l'aide d'oligonucléotides antisenses ou d'ADN d'interférence pour confirmer leur rôle dans le retard d'apoptose induit par l'IL-15. Pour l'identification de facteurs de survie potentiels qui n'auraient pas été répertoriés à ce jour, l'utilisation de la méthode de gels d'électrophorèse en deux dimensions est présentement en utilisation dans notre laboratoire.



BIBLIOGRAPHIE

- AKGUL, C., D. A. Moulding et S. W. Edwards. 2001. « Molecular control of neutrophil apoptosis ». FEBS Letters, vol. 487, p. 318-322.
- AKGUL, C., P. C. Turner, M. R. White et S. W. Edwards. 2000. « Functional analysis of the human MCL-1 gene ». Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 57, p. 684-691.
- ALDERSON, M. R., T. W. Tough, T. Davis-Smith, S. Braddy, B. Falk, K. A. Schooley, R. G. Goodwin, C. A. Smith, F. Ramsdell et D. H. Lynch. 1995. « Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes ». Journal of Experimental Medicine, vol. 181, p. 71-77.
- ALNEMRI, E. S. et G. Litwack. 1989. « Glucocorticoid-induced lymphocytolysis is not mediated by an induced endonuclease ». Journal of Biological Chemistry, vol. 264, p. 4104-4111.
- AREND, W. P. 2001. « Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of interleukin-1 receptor antagonist ». Seminars in Arthritis and Rheumatism, vol. 30, p. 1-6.
- ASHANY, D., A. Savir, N. Bhardwaj et K. B. Elkon. 1999. « Dendritic cells are resistant to apoptosis through the Fas (CD95/APO-1) pathway ». Journal of Immunology, vol. 163, p. 5303-5311.
- ASHANY, D., X. Song, E. Lacy, J. Nikolic-Zugic, S. M. Friedman et K. B. Elkon. 1995. « Th1 CD4+ lymphocytes delete activated macrophages through the Fas/APO-1 antigen pathway ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 92, p. 11225-11229.
- BARNES, N. C., G. Marone, G. U. Di Maria, S. Visser, I. Utama et S. L. Payne. 1993. « A comparison of fluticasone propionate, 1 mg daily, with beclomethasone dipropionate, 2 mg daily, in the treatment of severe asthma. International Study Group ». European Respiratory Journal, vol. 6, p. 877-885.
- BAZAR, L. S. et H. J. Deeg. 1992. « Ultraviolet B-induced DNA fragmentation (apoptosis) in activated T- lymphocytes and Jurkat cells is augmented by inhibition of RNA and protein synthesis ». Experimental Hematology, vol. 20, p. 80-86.
- BELICHENKO, I., N. Morishima et D. Separovic. 2001. « Caspase-resistant vimentin suppresses apoptosis after photodynamic treatment with a silicon phthalocyanine in Jurkat cells ». Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 390, p. 57-63.
- BIFFL, W. L., E. E. Moore, F. A. Moore et C. C. Barnett Jr. 1996. « Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis via a mechanism involving platelet-activating factor ». Journal of Trauma, vol. 40, p. 575-578.

- BJORCK, P., J. Banchereau et L. Flores-Romo. 1997. « CD40 ligation counteracts Fas-induced apoptosis of human dendritic cells ». International Immunology, vol. 9, p. 365-372.
- BRACH, M. A., S. deVos, H. J. Gruss et F. Herrmann. 1992. « Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death ». Blood, vol. 80, p. 2920-2924.
- BROMBERG, J. F., M. H. Wrzeszczynska, G. Devgan, Y. Zhao, R. G. Pestell, C. Albanese et J. E. Darnell Jr. 1999. « Stat3 as an oncogene ». Cell, vol. 98, p. 295-303.
- BROWN, S. B., K. Bailey et J. Savill. 1997. « Actin is cleaved during constitutive apoptosis ». Biochemical Journal, vol. 323 (Pt 1), p. 233-237.
- BROWN, S. B. et J. Savill. 1999. « Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes ». Journal of Immunology, vol. 162, p. 480-485.
- CASSATELLA, M. A. 1998. « The neutrophil: one of the cellular targets of interleukin-10 ». International Journal of Clinical and Laboratory Research, vol. 28, p. 148-161.
- CASSATELLA, M. A. 1999. « Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound ». Advances in Immunology, vol. 73, p. 369-509.
- CHEN, C., L. C. Edelstein et C. Gelinas. 2000. « The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L) ». Molecular and Cellular Biology, vol. 20, p. 2687-2695.
- CHEN, R. M., H. C. Liu, Y. L. Lin, W. C. Jean, J. S. Chen et J. H. Wang. 2002. « Nitric oxide induces osteoblast apoptosis through the de novo synthesis of Bax protein ». Journal of Orthopaedic Research, vol. 20, p. 295-302.
- CHITNIS, D., C. Dickerson, A. M. Munster et R. A. Winchurch. 1996. « Inhibition of apoptosis in polymorphonuclear neutrophils from burn patients ». Journal of Leukocyte Biology, vol. 59, p. 835-839.
- CHU, Z. L., T. A. McKinsey, L. Liu, J. J. Gentry, M. H. Malim et D. W. Ballard. 1997. « Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 94, p. 10057-10062.
- CHUANG, P. I., E. Yee, A. Karsan, R. K. Winn et J. M. Harlan. 1998. « A1 is a constitutive and inducible Bcl-2 homologue in mature human neutrophils ». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 249, p. 361-365.
- COHEN, J. J. 1991. « Programmed cell death in the immune system ». Advances in Immunology, vol. 50, p. 55-85.

- COLLINS, R. J., B. V. Harmon, T. Souvlis, J. H. Pope et J. F. Kerr. 1991. « Effects of cycloheximide on B-chronic lymphocytic leukaemic and normal lymphocytes in vitro: induction of apoptosis ». British Journal of Cancer, vol. 64, p. 518-522.
- COLOTTA, F., F. Re, N. Polentarutti, S. Sozzani et A. Mantovani. 1992. « Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products ». Blood, vol. 80, p. 2012-2020.
- COX, G. 1995. « Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes ». Journal of Immunology , vol. 154, p. 4719-4725.
- COX, G. 1996. « IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils ». American Journal of Physiology, vol. 271, p. L566-L571.
- COX, G. et R. C. Austin. 1997. « Dexamethasone-induced suppression of apoptosis in human neutrophils requires continuous stimulation of new protein synthesis ». Journal of Leukocyte Biology, vol. 61, p. 224-230.
- CROMPTON, M. 2000. « Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis ». Current Opinion in Cell Biology, vol. 12, p. 414-419.
- DAIGLE, I. et H. U. Simon. 2001. « Critical role for caspases 3 and 8 in neutrophil but not eosinophil apoptosis ». International Archives of Allergy and Immunology, vol. 126, p. 147-156.
- DIBBERT, B., M. Weber, W. H. Nikolaizik, P. Vogt, M. H. Schoni, K. Blaser et H. U. Simon. 1999. « Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis: a general mechanism to accumulate effector cells in inflammation ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 96, p. 13330-13335.
- DUNICAN, A. L., S. J. Leuenroth, P. Grutkoski, A. Ayala et H. H. Simms. 2000. « TNF α -induced suppression of PMN apoptosis is mediated through interleukin-8 production ». Shock, vol. 14, p. 284-288.
- EDWARDS, S. W. 1994. Biochemistry and physiology of the neutrophil. Cambridge England, New York : Cambridge University Press, 299 p.
- EISCHEN, C. M., J. D. Schilling, D. H. Lynch, P. H. Krammer et P. J. Leibson. 1996. « Fc receptor-induced expression of Fas ligand on activated NK cells facilitates cell-mediated cytotoxicity and subsequent autocrine NK cell apoptosis ». Journal of Immunology, vol. 156, p. 2693-2699.

- EPLING-BURNETTE, P. K., J. H. Liu, R. Catlett-Falcone, J. Turkson, M. Oshiro, R. Kothapalli, Y. Li, J. M. Wang, H. F. Yang-Yen, J. Karras, R. Jove et T. P. Loughran Jr. 2001. « Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression ». Journal of Clinical Investigation, vol. 107, p. 351-62.
- EPLING-BURNETTE, P. K., B. Zhong, F. Bai, K. Jiang, R. D. Bailey, R. Garcia, R. Jove, J. Y. Djeu, T. P. Loughran Jr et S. Wei. 2001. « Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils ». Journal of Immunology, vol. 166, p. 7486-7495.
- FADEEL, B., A. Ahlin, J. I. Henter, S. Orrenius et M. B. Hampton. 1998. « Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species ». Blood, vol. 92, p. 4808-4818.
- FECHO, K., S. A. Bentley et P. L. Cohen. 1998. « Mice deficient in fas ligand (gld) or fas (lpr) show few alterations in granulopoiesis ». Cellular Immunology, vol. 188, p. 19-32.
- FECHO, K. et P. L. Cohen. 1998. « Fas ligand (gld)- and Fas (lpr)-deficient mice do not show alterations in the extravasation or apoptosis of inflammatory neutrophils ». Journal of Leukocyte Biology, vol. 64, p. 373-383.
- FERRETTI, S., O. Bonneau, G. R. Dubois, C. E. Jones et A. Trifilieff. 2003. « IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger ». Journal of Immunology, vol. 170, p. 2106-2112.
- FOSSATI, G., D. A. Moulding, D. G. Spiller, R. J. Moots, M. R. White et S. W. Edwards. 2003. « The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis ». Journal of Immunology, vol. 170, p. 1964-1972.
- GARCES, K. 2001. « Anakinra: interleukin-1 receptor antagonist therapy for rheumatoid arthritis ». Issues Emerg Health Technol, vol. 1-4.
- GAUTHIER, M., C. J. Roberge, M. Pelletier, P. A. Tessier et D. Girard. 2001. « Activation of human neutrophils by technical toxaphene ». Clinical Immunology, vol. 98, p. 46-53.
- GIRARD, D., M. E. Paquet, R. Paquin et A. D. Beaulieu. 1996. « Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15 ». Blood, vol. 88, p. 3176-3184.
- GIRARD, D., R. Paquin et A. D. Beaulieu. 1997. « Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis ». Biochemical Journal, vol. 325 (Pt 1), p. 147-153.

- GOTTLIEB, R. A., H. A. Giesing, R. L. Engler et B. M. Babior. 1995. « The acid deoxyribonuclease of neutrophils: a possible participant in apoptosis-associated genome destruction ». Blood, vol. 86, p. 2414-2418.
- GRUTKOSKI, P. S., R. D'Amico, A. Ayala et H. H. Simms. 1999. « IL-1beta stimulation induces paracrine regulation of PMN function and apoptosis ». Shock, vol. 12, p. 373-381.
- GRUTKOSKI, P. S., C. T. Graeber, A. Ayala et H. H. Simms. 2002. « Paracrine suppression of apoptosis by cytokine-stimulated neutrophils involves divergent regulation of NF-kappaB, Bcl-X(L), and Bak ». Shock, vol. 17, p. 47-54.
- HACHIYA, O., Y. Takeda, H. Miyata, H. Watanabe, T. Yamashita et F. Sendo. 1995. « Inhibition by bacterial lipopolysaccharide of spontaneous and TNF-alpha-induced human neutrophil apoptosis in vitro ». Microbiology and Immunology, vol. 39, p. 715-723.
- HALL, A. K. 1994. « Molecular interactions between G-actin, DNase I and the beta-thymosins in apoptosis: a hypothesis ». Medical Hypotheses, vol. 43, p. 125-131.
- HAMASAKI, A., F. Sendo, K. Nakayama, N. Ishida, I. Negishi, K. Nakayama et S. Hatakeyama. 1998. « Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene ». Journal of Experimental Medicine, vol. 188, p. 1985-1992.
- HART, S. P., J. A. Ross, K. Ross, C. Haslett et I. Dransfield. 2000. « Molecular characterization of the surface of apoptotic neutrophils: implications for functional downregulation and recognition by phagocytes ». Cell Death and Differentiation, vol. 7, p. 493-503.
- HASEGAWA, T., K. Suzuki, C. Sakamoto, K. Ohta, S. Nishiki, M. Hino, N. Tatsumi et S. Kitagawa. 2003. « Expression of the inhibitor of apoptosis (IAP) family members in human neutrophils: up-regulation of cIAP2 by granulocyte colony-stimulating factor and overexpression of cIAP2 in chronic neutrophilic leukemia ». Blood, vol. 101, p. 1164-71.
- HOCKENBERY, D. M., Z. N. Oltvai, X. M. Yin, C. L. Milliman et S. J. Korsmeyer. 1993. « Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis ». Cell, vol. 75, p. 241-251.
- HOONTRAKOON, R., H. W. Chu, S. J. Gardai, S. E. Wenzel, P. McDonald, V. A. Fadok, P. M. Henson et D. L. Bratton. 2002. « Interleukin-15 inhibits spontaneous apoptosis in human eosinophils via autocrine production of granulocyte macrophage-colony stimulating factor and nuclear factor-kappaB activation ». American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, vol. 26, p. 404-412.
- IACOBINI, M., A. Menichelli, G. Palumbo, G. Multari, B. Werner et D. Del Principe. 2001. « Involvement of oxygen radicals in cytarabine-induced apoptosis in human polymorphonuclear cells ». Biochemical Pharmacology, vol. 61, p. 1033-40.

- IDA, H. et P. Anderson . 1998. « Activation-induced NK cell death triggered by CD2 stimulation ». European Journal of Immunology, vol. 28, p. 1292-1300.
- IWAI, K., T. Miyawaki, T. Takizawa, A. Konno, K. Ohta, A. Yachie, H. Seki et N. Taniguchi. 1994. « Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils ». Blood, vol. 84, p. 1201-1208.
- JAATTELA, M. 1999. « Escaping cell death: survival proteins in cancer ». Experimental Cell Research, vol. 248, p. 30-43.
- JABLONSKA, E., L. Piotrowski, M. Kiluk, J. Jablonski, Z. Grabowska et W. Markiewicz. 2001. « Effect of IL-15 on the secretion of IL-1beta, IL-1Ra and sIL-1RII by PMN from cancer patients ». Cytokine, vol. 16 , p. 173-177.
- JANEWAY, C., P. Travers, M. Walport et J. D. Capra. 1999. Immunobiology the immune system in health and disease. London, New York : Current Biology Publications. Garland Pub, 635 p.
- JEWETT, A., M. Cavalcanti et B. Bonavida. 1997. « Pivotal role of endogenous TNF-alpha in the induction of functional inactivation and apoptosis in NK cells ». Journal of Immunology, vol. 159, p. 4815-4822.
- KASAHARA, Y., K. Iwai, A. Yachie, K. Ohta, A. Konno, H. Seki, T. Miyawaki et N. Taniguchi. 1997. « Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils ». Blood, vol. 89, p. 1748-1753.
- KATO, T., Y. Takeda, T. Nakada et F. Sendo. 1995. « Inhibition by dexamethasone of human neutrophil apoptosis in vitro ». Natural Immunity, vol. 14, p. 198-208.
- KAYALAR, C., T. Ord, M. P. Testa, L. T. Zhong et D. E. Bredesen. 1996. « Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 93, p. 2234-2238.
- KEEL, M., U. Ungethum, U. Steckholzer, E. Niederer, T. Hartung, O. Trentz et W. Ertel. 1997. « Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis ». Blood, vol. 90, p. 3356-3363.
- KETTRITZ, R., M. L. Gaido, H. Haller, F. C. Luft, C. J. Jennette et R. J. Falk. 1998. « Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis of human neutrophils ». Kidney International, vol. 53, p. 84-91.
- KLEBANOFF, S. J., S. Olszowski, W. C. Van Voorhis, J. A. Ledbetter, A. M. Waltersdorff et K. G. Schlechte. 1992. « Effects of gamma-interferon on human neutrophils: protection from deterioration on storage ». Blood, vol. 80, p. 225-234.

- KLUCK, R. M., E. Bossy-Wetzel, D. R. Green et D. D. Newmeyer. 1997. « The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis ». Science, vol. 275, p. 1132-1136.
- KNEPPER-NICOLAI, B., J. Savill et S. B. Brown. 1998. « Constitutive apoptosis in human neutrophils requires synergy between calpains and the proteasome downstream of caspases ». Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 30530-30536.
- KOCHI, S. K. et R. J. Collier. 1993. « DNA fragmentation and cytolysis in U937 cells treated with diphtheria toxin or other inhibitors of protein synthesis ». Experimental Cell Research, vol. 208, p. 296-302.
- KOTHAKOTA, S., T. Azuma, C. Reinhard, A. Klippel, J. Tang, K. Chu, T. J. McGarry, M. W. Kirschner, K. Kohts, D. J. Kwiatkowski et L. T. Williams. 1997. « Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis ». Science, vol. 278, p. 294-298.
- KUSANO, H., S. Shimizu, R. C. Koya, H. Fujita, S. Kamada, N. Kuzumaki et Y. Tsujimoto. 2000. « Human gelsolin prevents apoptosis by inhibiting apoptotic mitochondrial changes via closing VDAC ». Oncogene, vol. 19, p. 4807-4814.
- LAAN, M., Z. H. Cui, H. Hoshino, J. Lotvall, M. Sjostrand, D. C. Gruenert, B. E. Skoogh et A. Linden. 1999. « Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways ». Journal of Immunology, vol. 162, p. 2347-2352.
- LAGASSE, E. et I. L. Weissman. 1994. « bcl-2 inhibits apoptosis of neutrophils but not their engulfment by macrophages ». Journal of Experimental Medicine, vol. 179, p. 1047-1052.
- LEDDA-COLUMBANO, G. M., P. Coni, G. Faa, G. Manenti et A. Columbano. 1992. « Rapid induction of apoptosis in rat liver by cycloheximide ». American Journal of Pathology, vol. 140, p. 545-549.
- LEE, A., M. K. Whyte et C. Haslett. 1993. « Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators ». Journal of Leukocyte Biology, vol. 54, p. 283-288.
- LEE, H. H., H. Dadgostar, Q. Cheng, J. Shu et G. Cheng. 1999. « NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 96, p. 9136-9141.
- LEUENROTH, S. J., P. S. Grutkoski, A. Ayala et H. H. Simms. 2000. « The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes apoptosis ». Journal of Leukocyte Biology, vol. 68, p. 158-166.

- LEWIS, J. G., D. O. Adams et S. Fan. 1995. « Selective sensitivity of macrophages to cytotoxicity by inhibitors of macromolecular synthesis: induction of apoptosis ». Journal of Leukocyte Biology, vol. 57, p. 635-642.
- LI, L. Y., X. Luo et X. Wang. 2001. « Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria ». Nature, vol. 412, p. 95-99.
- LI, X. C., G. Demirci, S. Ferrari-Lacraz, C. Groves, A. Coyle, T. R. Malek et T. B. Strom. 2001. « IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo ». Nature Medicine, vol. 7, p. 114-118.
- LILES, W. C., D. C. Dale et S. J. Klebanoff. 1995. « Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils ». Blood, vol. 86, p. 3181-3188.
- LILES, W. C., P. A. Kiener, J. A. Ledbetter, A. Aruffo et S. J. Klebanoff. 1996. « Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils ». Journal of Experimental Medicine, vol. 184, p. 429-440.
- LILES, W. C. et S. J. Klebanoff. 1995. « Regulation of apoptosis in neutrophils--Fas track to death? ». Journal of Immunology, vol. 155, p. 3289-3291.
- LIU, C. Y., A. Takemasa, W. C. Liles, R. B. Goodman, M. Jonas, H. Rosen, E. Chi, R. K. Winn, J. M. Harlan et P. I. Chuang. 2003. « Broad-spectrum caspase inhibition paradoxically augments cell death in TNF-alpha -stimulated neutrophils ». Blood, vol. 101, p. 295-304.
- LIU, Y., J. M. Cousin, J. Hughes, J. Van Damme, J. R. Seckl, C. Haslett, I. Dransfield, J. Savill et A. G. Rossi. 1999. « Glucocorticoids promote nonphlogistic phagocytosis of apoptotic leukocytes ». Journal of Immunology, vol. 162, p. 3639-3646.
- MAIANSKI, N. A., F. P. Mul, J. D. van Buul, D. Roos et T. W. Kuijpers. 2002. « Granulocyte colony-stimulating factor inhibits the mitochondria- dependent activation of caspase-3 in neutrophils ». Blood, vol. 99, p. 672-679.
- MALYAK, M., M. F. Smith Jr, A. A. Abel et W. P. Arend. 1994. « Peripheral blood neutrophil production of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta ». Journal of Clinical Immunology, vol. 14, p. 20-30.
- MALYAK, M., M. F. Smith Jr, A. A. Abel, K. R. Hance et W. P. Arend. 1998. « The differential production of three forms of IL-1 receptor antagonist by human neutrophils and monocytes ». Journal of Immunology, vol. 161, p. 2004-2010.
- MARSDEN, V. S. et A. Strasser. 2003. « CONTROL OF APOPTOSIS IN THE IMMUNE SYSTEM: Bcl-2, BH3-Only Proteins and More ». Annual Review of Immunology, vol. 21, p. 71-105.

MARTIN, D. P., R. E. Schmidt, P. S. DiStefano, O. H. Lowry, J. G. Carter et E. M. Johnson Jr. 1988. « Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation ». Journal of Cell Biology, vol. 106, p. 829-844.

MARTIN, S. J. 1993. « Protein or RNA synthesis inhibition induces apoptosis of mature human CD4+ T cell blasts ». Immunology Letters, vol. 35, p. 125-134.

MARTIN, S. J., S. V. Lennon, A. M. Bonham et T. G. Cotter. 1990. « Induction of apoptosis (programmed cell death) in human leukemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis ». Journal of Immunology, vol. 145, p. 1859-1867.

MATSUKAWA, A., T. Yoshimura, K. Miyamoto, S. Ohkawara et M. Yoshinaga. 1997. « Analysis of the inflammatory cytokine network among TNF alpha, IL-1 beta, IL-1 receptor antagonist, and IL-8 in LPS-induced rabbit arthritis ». Laboratory Investigation, vol. 76, p. 629-638.

MATSUKAWA, A. et M. Yoshinaga. 1999. « Neutrophils as a source of cytokines in inflammation ». Histology and Histopathology, vol. 14, p. 511-516.

MCDONALD, P. P., M. P. Russo, S. Ferrini et M. A. Cassatella. 1998. « Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils ». Blood, vol. 92, p. 4828-4835.

MCINNES, I. B. et F. Y. Liew. 1998. « Interleukin 15: a proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis ». Immunology Today, vol. 19, p. 75-79.

MORAND, E. F. et N. J. Goulding. 1993. « Glucocorticoids in rheumatoid arthritis--mediators and mechanisms ». British Journal of Rheumatology, vol. 32, p. 816-819.

MOULDING, D. A., C. Akgul, M. Derouet, M. R. White et S. W. Edwards. 2001. « BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis ». Journal of Leukocyte Biology, vol. 70, p. 783-792.

MOULDING, D. A., J. A. Quayle, C. A. Hart et S. W. Edwards. 1998. « Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival ». Blood, vol. 92, p. 2495-2502.

MURPHY, B. M., A. J. O'Neill, C. Adrain, R. W. Watson et S. J. Martin. 2003. « The apoptosome pathway to caspase activation in primary human neutrophils exhibits dramatically reduced requirements for cytochrome C ». Journal of Experimental Medicine, vol. 197, p. 625-632.

MURRAY, J., J. A. Barbara, S. A. Dunkley, A. F. Lopez, X. Van Ostade, A. M. Condliffe, I. Dransfield, C. Haslett et E. R. Chilvers. 1997. « Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro ». Blood, vol. 90, p. 2772-2783.

MUSSO, T., L. Calosso, M. Zucca, M. Millesimo, M. Puliti, S. Bulfone-Paus, C. Merlino, D. Savoia, R. Cavallo, A. N. Ponzi et R. Badolato. 1998. « Interleukin-15 activates proinflammatory and antimicrobial functions in polymorphonuclear cells ». Infection and Immunity, vol. 66, p. 2640-2647.

NARAYANAN, P. K., K. Ragheb, G. Lawler et J. P. Robinson. 1997. « Defects in intracellular oxidative metabolism of neutrophils undergoing apoptosis ». Journal of Leukocyte Biology, vol. 61, p. 481-488.

NOLAN, B., A. Duffy, L. Paquin, M. De, H. Collette, C. M. Graziano et P. Bankey. 1999. « Mitogen-activated protein kinases signal inhibition of apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils ». Surgery, vol. 126, p. 406-412.

NOSSAL, G. J. 1994. « Negative selection of lymphocytes ». Cell, vol. 76, p. 229-239.

ORTALDO, J. R., R. T. Winkler-Pickett, S. Nagata et C. F. Ware. 1997. « Fas involvement in human NK cell apoptosis: lack of a requirement for CD16-mediated events ». Journal of Leukocyte Biology, vol. 61, p. 209-215.

OTTONELLO, L., G. Frumento, N. Arduino, M. Bertolotto, P. Dapino, M. Mancini et F. Dallegri. 2002. « Differential regulation of spontaneous and immune complex-induced neutrophil apoptosis by proinflammatory cytokines. Role of oxidants, Bax and caspase-3 ». Journal of Leukocyte Biology, vol. 72, p. 125-132.

PARK, Y., S. W. Lee et Y. C. Sung. 2002. « Cutting Edge: CpG DNA inhibits dendritic cell apoptosis by up-regulating cellular inhibitor of apoptosis proteins through the phosphatidylinositol-3'-OH kinase pathway ». Journal of Immunology, vol. 168, p. 5-8.

PELCZAR, M. J., E. C. S. Chan et N. R. Krieg. 1993. Microbiology--concepts and applications. New York : McGraw-Hill, 896 p.

PELLETIER, M., V. Lavastre, A. Savoie, C. Ratthé, R. Saller, K. Hostanska et D. Girard. 2001. « Modulation of interleukin-15-induced human neutrophil responses by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I ». Clinical Immunology, vol. 101, p. 229-236.

PELLETIER, M., C. Ratthé et D. Girard. 2002. « 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 Letters, vol. 532, p. 164-170.

PERLMAN, H., L. J. Pagliari, C. Georganas, T. Mano, K. Walsh et R. M. Pope. 1999. « FLICE-inhibitory protein expression during macrophage differentiation confers resistance to fas-mediated apoptosis ». Journal of Experimental Medicine, vol. 190, p. 1679-1688.

PIEDRAFITA, F. J. et M. Pfahl. 1997. « Retinoid-induced apoptosis and Sp1 cleavage occur independently of transcription and require caspase activation ». Molecular and Cellular Biology, vol. 17, p. 6348-6358.

POE, B. S. et K. L. O'Neill. 1997. Inhibition of protein synthesis sensitizes thermotolerant cells to heat shock induced apoptosis. Apoptosis, vol. 510-517.

PONGRACZ, J., P. Webb, K. Wang, E. Deacon, O. J. Lunn et J. M. Lord. 1999. « Spontaneous neutrophil apoptosis involves caspase 3-mediated activation of protein kinase C-delta ». Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 37329-37334.

PRYDE, J. G., A. Walker, A. G. Rossi, S. Hannah et C. Haslett. 2000. « Temperature-dependent arrest of neutrophil apoptosis. Failure of Bax insertion into mitochondria at 15 degrees C prevents the release of cytochrome c ». Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 33574-33584.

REBOLLO, A., L. Dumoutier, J. C. Renaud, A. Zaballos, V. Ayllon et C. Martinez-A. 2000. « Bcl-3 expression promotes cell survival following interleukin-4 deprivation and is controlled by AP1 and AP1-like transcription factors ». Molecular and Cellular Biology, vol. 20, p. 3407-3416.

REHEN, S. K., M. H. Varella, F. G. Freitas, M. O. Moraes et R. Linden. 1996. « Contrasting effects of protein synthesis inhibition and of cyclic AMP on apoptosis in the developing retina ». Development, vol. 122, p. 1439-1448.

RENSHAW, S. A., S. J. Timmons, V. Eaton, L. R. Usher, M. Akil, C. D. Bingle et M. K. Whyte. 2000. « Inflammatory neutrophils retain susceptibility to apoptosis mediated via the Fas death receptor ». Journal of Leukocyte Biology, vol. 67, p. 662-628.

ROTHSTEIN, T. L., J. K. Wang, D. J. Panka, L. C. Foote, Z. Wang, B. Stanger, H. Cui, S. T. Ju et A. Marshak-Rothstein. 1995. « Protection against Fas-dependent Th1-mediated apoptosis by antigen receptor engagement in B cells ». Nature, vol. 374, p. 163-165.

ROWE, S. J., L. Allen, V. C. Ridger, P. G. Hellewell et M. K. Whyte. 2002. « Caspase-1-deficient mice have delayed neutrophil apoptosis and a prolonged inflammatory response to lipopolysaccharide-induced acute lung injury ». Journal of Immunology, vol. 169, p. 6401-6407.

SAKAMOTO, C., K. Suzuki, F. Hato, M. Akahori, T. Hasegawa, M. Hino et S. Kitagawa. 2003. « Antiapoptotic effect of granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and cyclic AMP on human neutrophils: protein synthesis-dependent and protein synthesis-independent mechanisms and the role of the Janus kinase-STAT pathway ». International Journal of Hematology, vol. 77, p. 60-70.

- SANTOS-BENEIT, A. M. et F. Mollinedo. 2000. « Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells ». Journal of Leukocyte Biology, vol. 67, p. 712-724.
- SAVILL, J. et C. Haslett. 1999. « Granulocytes ». Chap. *in* Winkler, J. D. (éd.) Apoptosis and inflammation, p. 53-84. Basel, Boston : Birkhäuser.
- SAVOIE, A., V. Lavastre, M. Pelletier, T. Hajto, K. Hostanska et D. Girard. 2000. « Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I: modulation of de novo protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis ». Journal of Leukocyte Biology, vol. 68, p. 845-853.
- SCHULZE-OSTHOFF, K., D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg et M. E. Peter. 1998. « Apoptosis signaling by death receptors ». European Journal of Biochemistry, vol. 254, p. 439-459.
- SENDO, F., T. Kato et H. Yazawa. 1997. « Modulation of neutrophil apoptosis by psychological stress and glucocorticoid ». International Journal of Immunopharmacology, vol. 19, p. 511-516.
- SENTMAN, C. L., J. R. Shutter, D. Hockenbery, O. Kanagawa et S. J. Korsmeyer. 1991. « bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes ». Cell, vol. 67, p. 879-888.
- SHAULIAN, E. et M. Karin. 2001. « AP-1 in cell proliferation and survival ». Oncogene, vol. 20, p. 2390-2400.
- SHAULIAN, E. et M. Karin. 2002. « AP-1 as a regulator of cell life and death ». Nature Cell Biology, vol. 4, p. E131-E136.
- SHI, Y. F., M. G. Szalay, L. Paskar, B. M. Sahai, M. Boyer, B. Singh et D. R. Green. 1990. « Activation-induced cell death in T cell hybridomas is due to apoptosis. Morphologic aspects and DNA fragmentation ». Journal of Immunology, vol. 144, p. 3326-3333.
- SHORTMAN, K., M. Egerton, G. J. Spangrude et R. Scollay. 1990. « The generation and fate of thymocytes ». Seminars in Immunology, vol. 2, p. 3-12.
- SINGHAL, P. C., P. Patel, N. Nahar, N. Franki, A. Kapasi, K. Reddy, N. Shah, I. E. Nwakoby et B. Mehrotra. 1999. « Ethanol-induced neutrophil apoptosis is mediated through nitric oxide ». Journal of Leukocyte Biology, vol. 66, p. 930-936.
- STRASSER, A. 1995. « Apoptosis. Death of a T cell ». Nature, vol. 373, p. 385-386.

- SUSIN, S. A., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B. E. Snow, G. M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D. R. Goodlett, R. Aebersold, D. P. Siderovski, J. M. Penninger et G. Kroemer. 1999. « Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor ». Nature, vol. 397, p. 441-446.
- SWEENEY, J. F., P. K. Nguyen, G. M. Omann et D. B. Hinshaw. 1997. « Ultraviolet irradiation accelerates apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes: protection by LPS and GM-CSF ». Journal of Leukocyte Biology, vol. 62, p. 517-23.
- SWEENEY, J. F., P. K. Nguyen, G. M. Omann et D. B. Hinshaw. 1998. « Lipopolysaccharide protects polymorphonuclear leukocytes from apoptosis via tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways ». Journal of Surgical Research, vol. 74, p. 64-70.
- TAURIN, S., G. G. Ryazhsky, N. V. Maximova, A. G. Chuchalin, P. Hamet, A. V. Pshezhetsky et S. N. Orlov. 2002. « Suppression of programmed cell death by intracellular cAMP is not mediated by expression of genes encoding an inhibitor of apoptosis ». Biochemistry, vol. 67, p. 254-259.
- VAN DEN BERG, J. M., S. Weyer, J. J. Weening, D. Roos et T. W. Kuijpers. 2001. « Divergent effects of tumor necrosis factor alpha on apoptosis of human neutrophils ». Journal of Leukocyte Biology, vol. 69, p. 467-473.
- VAN DER VLIET, H. J., P. C. Wever, F. N. Van Diepen, S. L. Yong et I. J. Ten Berge. 1997. « Quantification of Bax/Bcl-2 ratios in peripheral blood lymphocytes, monocytes and granulocytes and their relation to susceptibility to anti- Fas (anti-CD95)-induced apoptosis ». Clinical and Experimental Immunology, vol. 110, p. 324-328.
- VELLA, A. T., S. Dow, T. A. Potter, J. Kappler et P. Marrack. 1998. « Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, p. 3810-3815.
- WANG, C. Y., M. W. Mayo, R. G. Korneluk, D. V. Goeddel et A. S. Baldwin Jr. 1998. « NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation ». Science, vol. 281, p. 1680-1683.
- WARD, C., E. R. Chilvers, M. F. Lawson, J. G. Pryde, S. Fujihara, S. N. Farrow, C. Haslett et A. G. Rossi. 1999. « NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro ». Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 4309-4318.
- WARD, I., I. Dransfield, E. R. Chilvers, I. Haslett et A. G. Rossi. 1999. « Pharmacological manipulation of granulocyte apoptosis: potential therapeutic targets ». Trends in Pharmacological Sciences, vol. 20, p. 503-509.
- WARREN, H. S. et M. J. Smyth. 1999. « NK cells and apoptosis ». Immunology and Cell Biology, vol. 77, p. 64-75.

WATSON, R. W., A. O'Neill, A. E. Brannigen, R. Coffey, J. C. Marshall, H. R. Brady et J. M. Fitzpatrick. 1999. « Regulation of Fas antibody induced neutrophil apoptosis is both caspase and mitochondrial dependent ». FEBS Letters, vol. 453, p. 67-71.

WATSON, R. W., H. P. Redmond, J. H. Wang, C. Condron et D. Bouchier-Hayes. 1996. « Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of Escherichia coli ». Journal of Immunology, vol. 156, p. 3986-3992.

WATSON, R. W., O. D. Rotstein, A. B. Nathens, J. Parodo et J. C. Marshall. 1997. « Neutrophil apoptosis is modulated by endothelial transmigration and adhesion molecule engagement ». Journal of Immunology, vol. 158, p. 945-953.

WATSON, R. W., O. D. Rotstein, J. Parodo, R. Bitar, J. C. Marshall, R. William et G. Watson. 1998. « The IL-1 beta-converting enzyme (caspase-1) inhibits apoptosis of inflammatory neutrophils through activation of IL-1 beta ». Journal of Immunology, vol. 161, p. 957-962.

WEINMANN, P., P. Gaegtgens et B. Walzog. 1999. « Bcl-Xl- and Bax-alpha-mediated regulation of apoptosis of human neutrophils via caspase-3 ». Blood, vol. 93, p. 3106-3115.

WHYTE, M. K., L. C. Meagher, J. MacDermot et C. Haslett. 1993. « Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis ». Journal of Immunology, vol. 150, p. 5124-5134.

WITKO-SARSAT, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre et L. Halbwachs-Mecarelli. 2000. « Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects ». Laboratory Investigation, vol. 80, p. 617-653.

WOLTER, K. G., Y. T. Hsu, C. L. Smith, A. Nechushtan, X. G. Xi et R. J. Youle. 1997. « Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis ». Journal of Cell Biology, vol. 139, p. 1281-1292.

WONG, B. R., R. Josien, S. Y. Lee, B. Sauter, H. L. Li, R. M. Steinman et Y. Choi. 1997. « TRANCE (tumor necrosis factor) ». Journal of Experimental Medicine, vol. 186, p. 2075-2080.

WYLLIE, A. H., R. G. Morris, A. L. Smith et D. Dunlop. 1984. « Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis ». Journal of Pathology, vol. 142, p. 67-77.

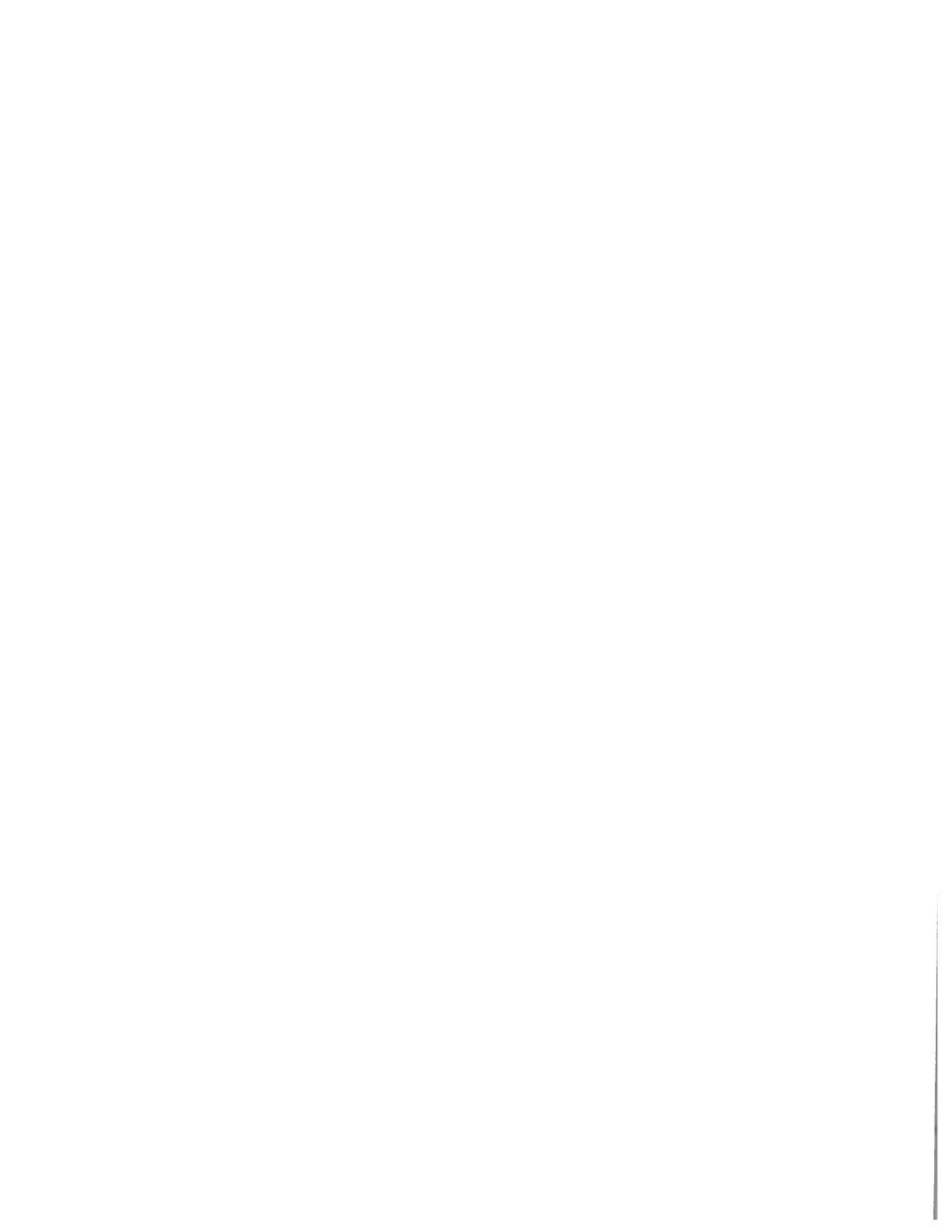
XIANG, J., D. T. Chao et S. J. Korsmeyer. 1996. « BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 93, p. 14559-14563.

XIANG, Z., A. A. Ahmed, C. Moller, K. Nakayama, S. Hatakeyama et G. Nilsson. 2001. « Essential role of the prosurvival bcl-2 homologue A1 in mast cell survival after allergic activation ». Journal of Experimental Medicine, vol. 194, p. 1561-1569.

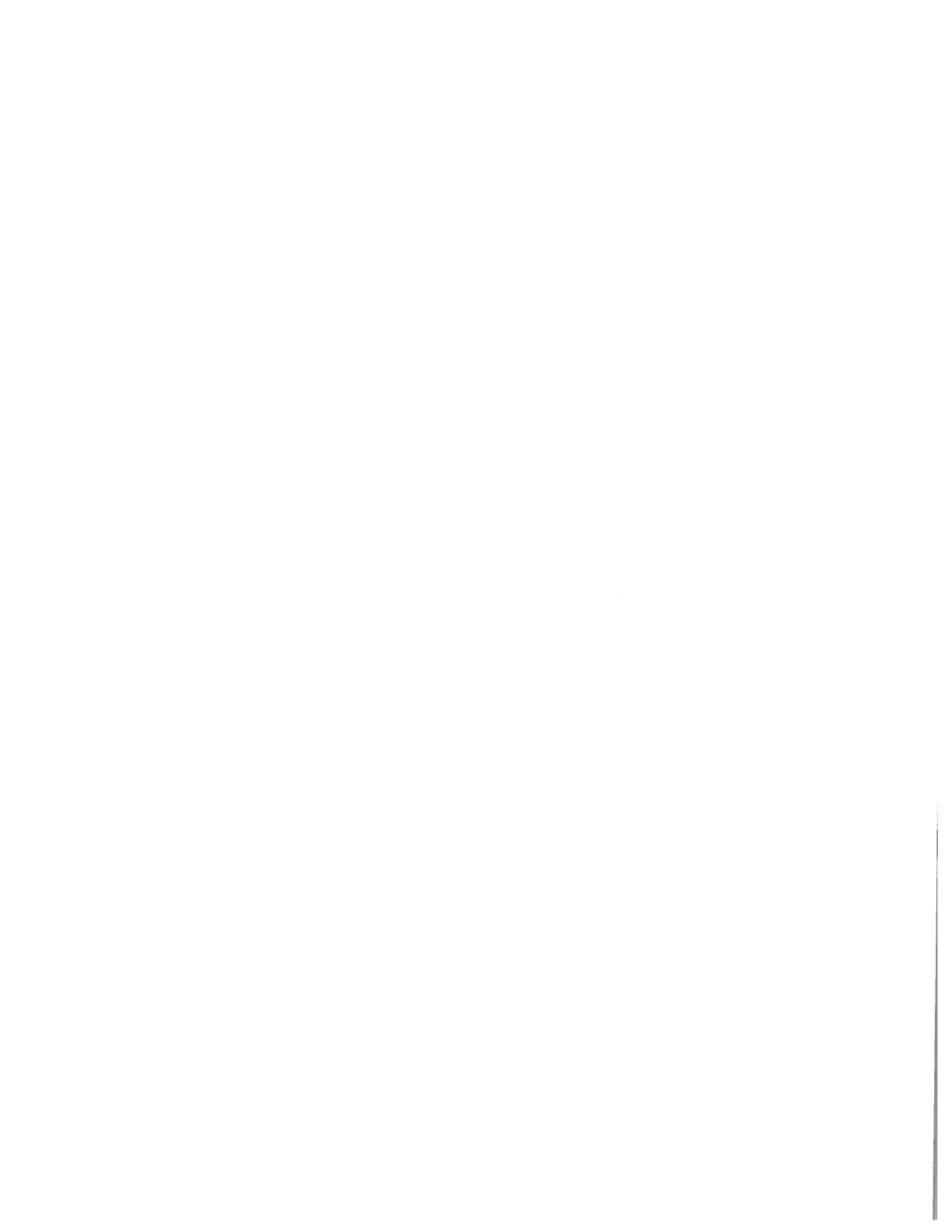
YOSHINAGA, M., F. Goto et S. Ohkaha. 1987. « [Biological production of interleukin 1 induced by stress] ». Nippon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine, vol. 45, p. 931-938.

YOSHINAGA, M., S. Nakamura et H. Hayashi. 1975. « Interaction between lymphocytes and inflammatory exudate cells. I. Enhancement of thymocyte response to PHA by product(s) of polymorphonuclear leukocytes and macrophages ». Journal of Immunology, vol. 115, p. 533-538.

ZHANG, X., E. Moilanen , I. M. Adcock, M. A. Lindsay et H. Kankaanranta. 2002. « Divergent effect of mometasone on human eosinophil and neutrophil apoptosis ». Life Sciences, vol. 71, p. 1523-1534.



ANNEXE



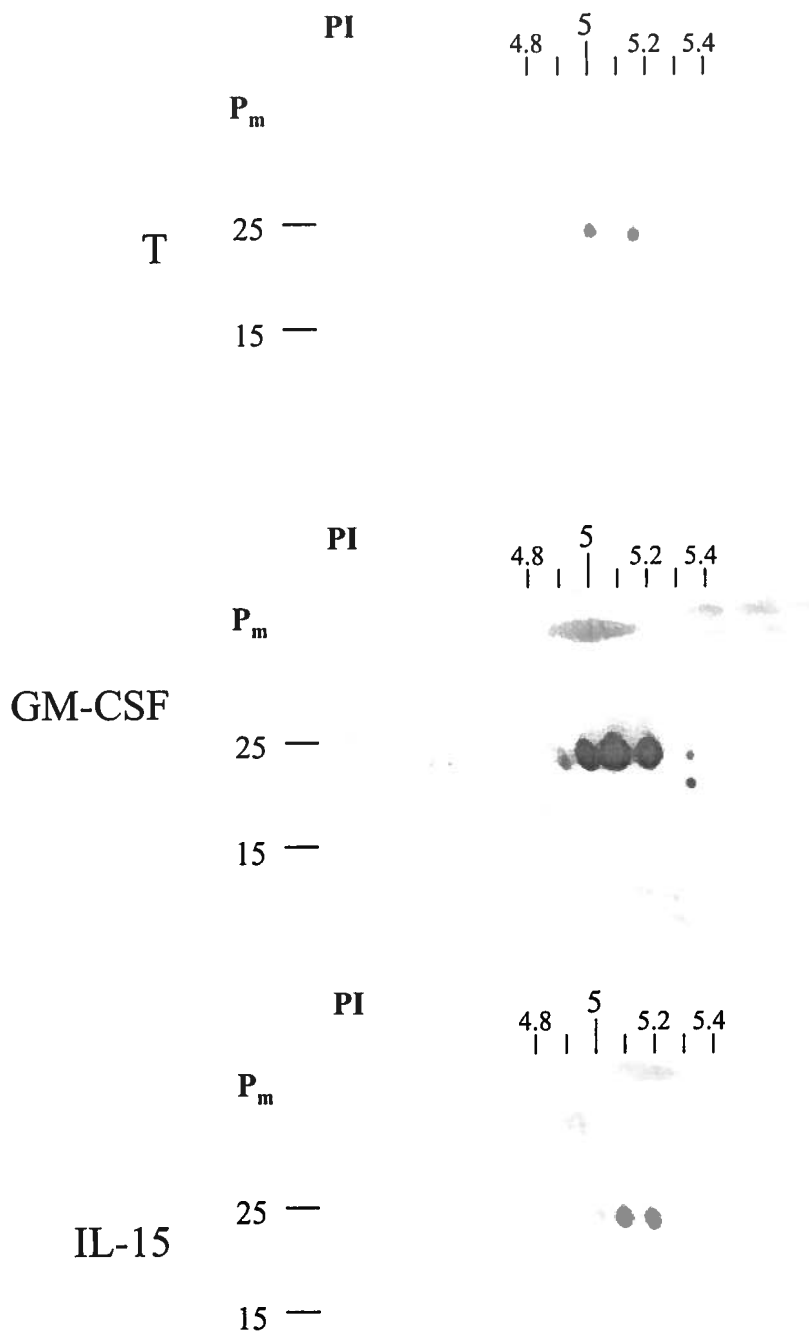
AUTRES TRAVAUX NON INCLUS DANS L'ARTICLE

Figure 5 : Immunobuvardage de type western en deux dimensions de l'IL-1Ra retrouvé dans le surnageant de neutrophiles cultivés en présence de tampon (T), de GM-CSF (65 ng/ml) ou d'IL-15 (250 ng/ml).

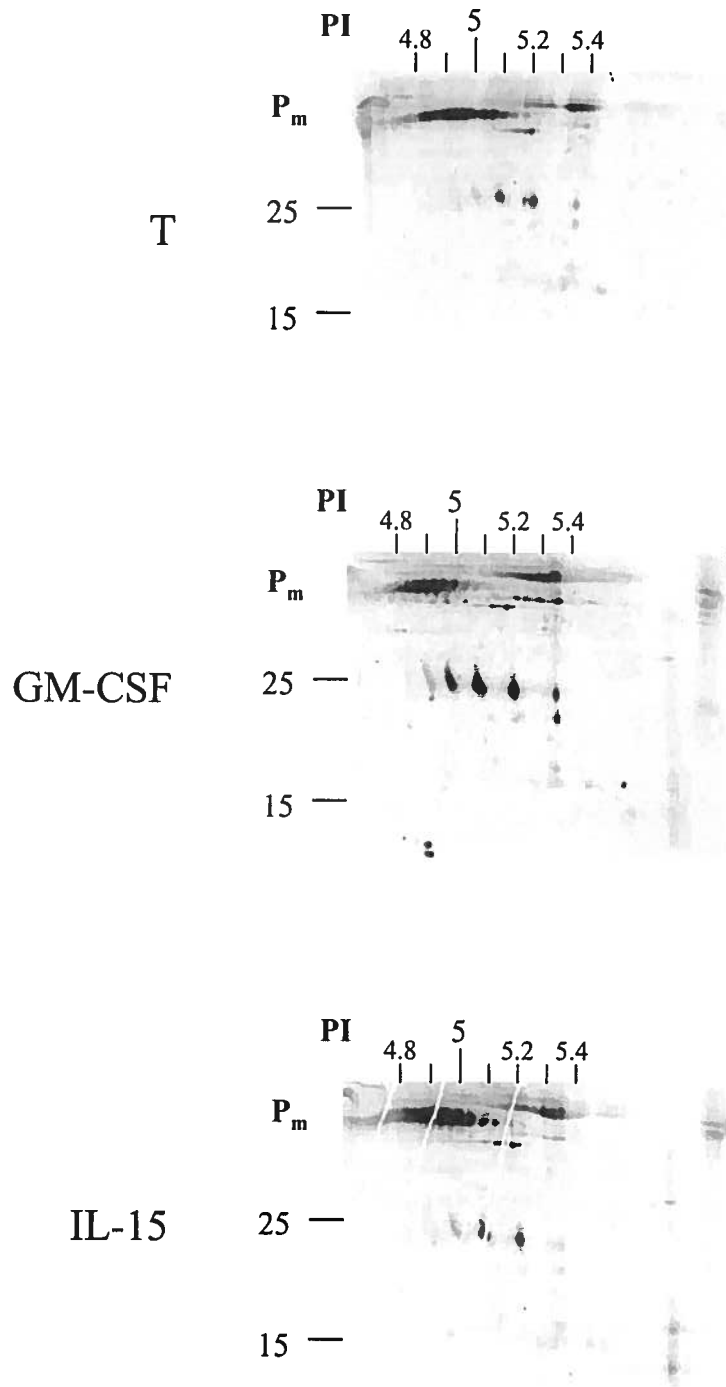


Figure 6 : Migration sur gel SDS-PAGE 2D de surnageants de neutrophiles marqués au ^{35}S obtenus après 24 heures d'incubation en présence de tampon (T), de GM-CSF (65 ng/ml) ou d'IL-15 (250 ng/ml).

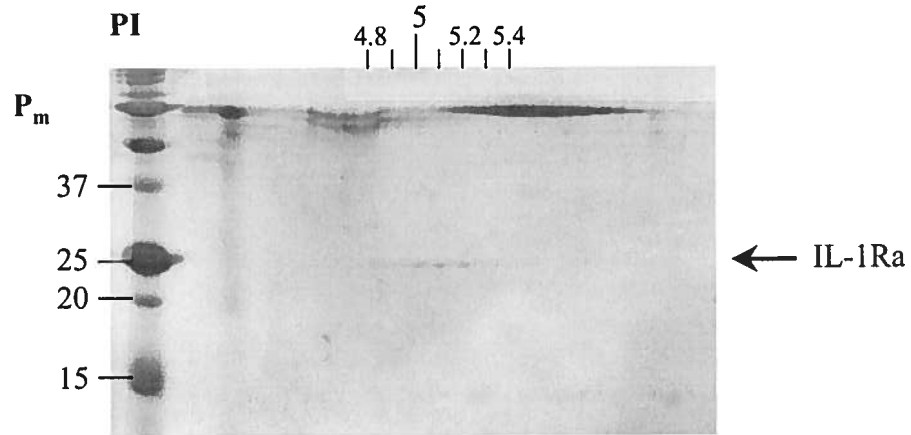


Figure 7 : Immunoprécipitation de l'IL-1Ra produit par des neutrophiles stimulés à l'IL-15 (65 ng/ml) durant 24 h migrée sur gel SDS-PAGE 2D et colorée au nitrate d'argent.

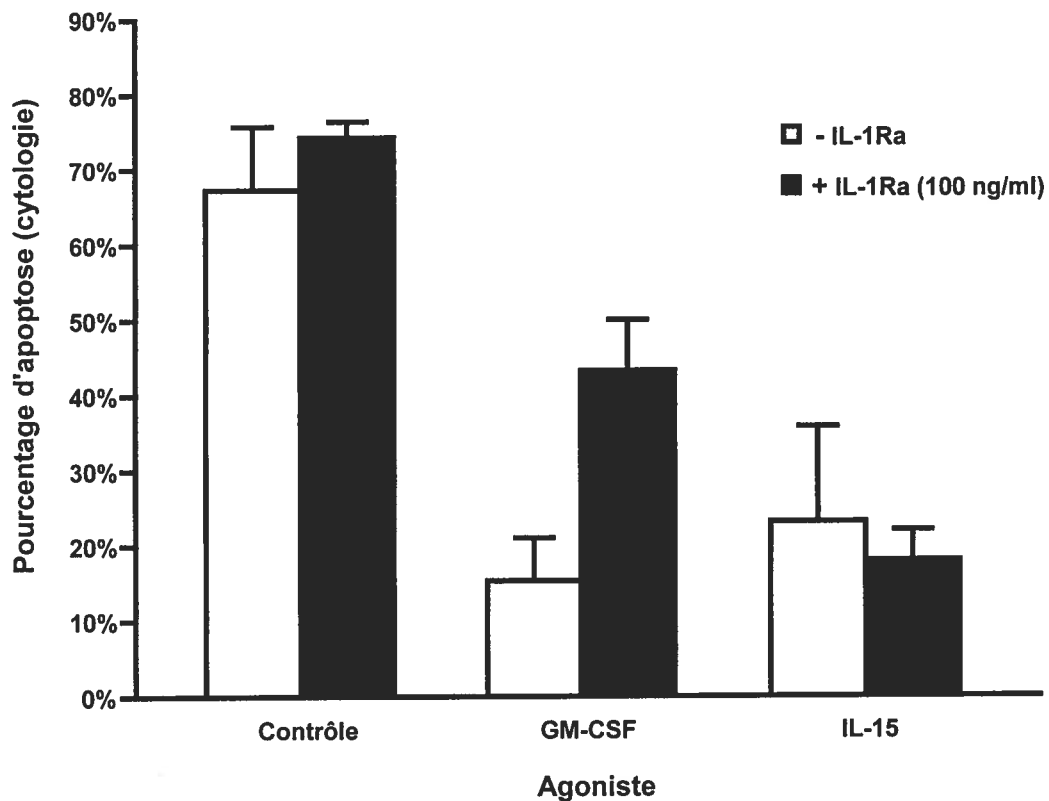


Figure 8 : Pourcentage de neutrophiles apoptotiques après une incubation de 24 h en présence de différents agonistes avec ou sans un excès d'IL-1Ra dans le milieu.

