

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**RÔLE DES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES DANS LA
PHYSIOLOGIE DES NEUTROPHILES**

Par
Eliane Moisan

Thèse présentée
pour l'obtention
du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)
en Biologie

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

M. Jacques Bernier, Ph.D.
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Mme Sachiko Sato, Ph.D.
Centre de recherche en infectiologie du
CHUL
Université Laval

Examineur externe

M. Tamás Fülöp, Ph.D.
Département de médecine, service de
gériatrie
Université de Sherbrooke

Directeur de recherche

M. Denis Girard, Ph.D.
INRS-Institut Armand-Frappier

Remerciements

Cette thèse de doctorat a été réalisée grâce au soutien de plusieurs personnes que je tiens à remercier.

Tout d'abord à mon directeur de recherche, le professeur Denis Girard, un gros merci pour tout le soutien durant ces années, pour les fréquentes discussions scientifiques toujours utiles et agréables. Merci pour avoir cru en mes capacités et m'avoir encouragée à donner le meilleur de moi-même.

Je tiens également à remercier notre assistante de recherche, Sonia Chiasson, pour son précieux soutien dans l'établissement de la colonie de souris et lors des longues journées d'expériences effectuées sur celles-ci. Merci pour toutes les agréables discussions sur une multitude de sujets philosophiques. Je tiens également à exprimer ma gratitude à tous mes collègues de laboratoire qui ont fait partie de mon quotidien pendant plusieurs années : Martin Pelletier, Valérie Lavastre, Claude Rathé, Amélie Bouchard, Hélène Cavalli, François Binet. Merci pour tous les sourires et l'enthousiasme au laboratoire qui ont rendu l'atmosphère si agréable. Merci aussi pour tous les petits coups de main très appréciés, pour les nombreuses discussions scientifiques et générales. Je suis heureuse et fière de vous compter parmi mes amis.

Ces quelques années passées à l'INRS-Institut Armand-Frappier m'ont permis de côtoyer d'autres personnes intéressantes dont certaines sont devenues de très bonnes amies : entre autres, Julie Vézina, Isabelle Plante et Guylaine Lassonde. Votre présence m'apporte toujours beaucoup de bonheur. De plus, plusieurs autres personnes ont fait du centre de Pointe-Claire un endroit chaleureux et convivial : notamment, Geneviève, Michele, Julie P., Lorenza, Fanny, Julie D., Benjamin, Johanna B., Kathy, Myriam, Steve, Stéphane, Sophie, Chantal, Mahmood, Johanna P., Marlène...

Je ne peux pas passer sous silence mon père, ma mère et mon frère, Frédéric, pour leur amour et leur soutien inconditionnels. Ils m'ont beaucoup aidée à croire en mes capacités, à me surpasser et je crois bien que je ne serais pas arrivée à ce point sans eux.

Merci également aux membres du soutien administratif : Francine Leclerc, Josée Labonne, Joceline Hash, Louis Sénécal, Jacques Lussier et Daniel Venne. Sans leur travail important, la recherche serait difficile, voire impossible à réaliser.

Enfin, je tiens également à remercier les responsables du Fonds de la Recherche en Santé du Québec et de la Fondation Armand-Frappier pour le soutien financier tout au long de mon doctorat.

Table des matières

| | |
|---|-----|
| REMERCIEMENTS | iii |
| TABLE DES MATIÈRES | v |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | vii |
| LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX | ix |
| RÉSUMÉ | x |
| INTRODUCTION..... | xi |
| SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE | 1 |
| 1. LE NEUTROPHILE ET L'INFLAMMATION | 2 |
| 1.1. LA RÉACTION INFLAMMATOIRE..... | 2 |
| 1.1.1. <i>L'inflammation aiguë</i> | 2 |
| 1.1.2. <i>L'inflammation chronique</i> | 2 |
| 1.2. RÔLE DU NEUTROPHILE DANS L'INFLAMMATION..... | 3 |
| 1.2.1. <i>Adhésion</i> | 4 |
| 1.2.2. <i>Diapédèse</i> | 6 |
| 1.2.3. <i>Chimioattraction</i> | 10 |
| 1.2.4. <i>Phagocytose</i> | 11 |
| 1.2.5. <i>Dégranulation et flambée oxydative</i> | 13 |
| 1.2.6. <i>Apoptose, reconnaissance par les phagocytes et résolution de l'inflammation</i> | 18 |
| 1.3. DÉSORDRES INFLAMMATOIRES..... | 23 |
| 1.3.1. <i>Les ANCA</i> | 26 |
| 1.4. LE MODÈLE DE LA POCHE D'AIR | 27 |
| 2. LE CYTOSQUELETTE | 28 |
| 2.1. LES MICROFILAMENTS | 28 |
| 2.2. LES MICROTUBULES | 30 |
| 2.3. LES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES | 31 |
| 2.3.1. <i>Les lamines</i> | 31 |
| 2.3.2. <i>La vimentine</i> | 34 |
| 2.4. RÔLE DU CYTOSQUELETTE DANS LES MALADIES AUTO-IMMUNES..... | 36 |
| 2.4.1. <i>Expression à la surface de cellules</i> | 37 |
| 2.4.2. <i>Citrullination des protéines</i> | 39 |

| | |
|--|-----|
| 2.5. RÔLE DU CYTOSQUELETTE DANS L' APOPTOSE | 40 |
| 2.5.1. <i>Les microfilaments</i> | 41 |
| 2.5.2. <i>Les microtubules</i> | 43 |
| 2.5.3. <i>Les filaments intermédiaires</i> | 43 |
| 2.6. ÉTUDE DES FONCTIONS DU CYTOSQUELETTE PAR L'UTILISATION DE SOURIS KNOCKOUT | 46 |
| 2.6.1. <i>Souris déficientes en gelsoline</i> | 46 |
| 2.6.2. <i>Souris déficientes en kératines</i> | 47 |
| 2.6.3. <i>Souris déficientes en GFAP</i> | 47 |
| 2.6.4. <i>Souris déficientes en desmine</i> | 48 |
| 2.6.5. <i>Souris déficientes en lamines A/C</i> | 48 |
| 2.6.6. <i>Souris déficientes en lamine B₁</i> | 49 |
| 2.6.7. <i>Souris déficientes en vimentine</i> | 50 |
| OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES | 52 |
| SECTION 2 : ARTICLES | 52 |
| CELL SURFACE EXPRESSION OF INTERMEDIATE FILAMENT PROTEINS VIMENTIN AND LAMIN B₁ IN HUMAN NEUTROPHIL SPONTANEOUS APOPTOSIS | 55 |
| <i>Résumé en français de l'article</i> | 56 |
| <i>Texte original de l'article</i> | 57 |
| THE INTRIGUING NORMAL ACUTE INFLAMMATORY RESPONSE IN MICE LACKING VIMENTIN | 67 |
| <i>Résumé en français de l'article</i> | 68 |
| <i>Texte original de l'article</i> | 69 |
| DISCUSSION ET CONCLUSION | 80 |
| CONTRIBUTION À L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES | 96 |
| APPENDICE A | 94 |
| VISCUM ALBUM AGGLUTININ-I INDUCES DEGRADATION OF CYTOSKELETAL PROTEINS IN LEUKAEMIA PLB-985 CELLS DIFFERENTIATED TOWARD NEUTROPHILS: CLEAVAGE OF NON-MUSCLE MYOSIN HEAVY CHAIN-IIA BY CASPASES. | 98 |
| <i>Résumé en français de l'article</i> | 100 |
| <i>Texte original de l'article</i> | 101 |
| RÉFÉRENCES | 111 |

Liste des abréviations

| | |
|--------------------------------|--|
| ADN | acide désoxyribonucléique |
| ANCA | « antineutrophil cytoplasmic antibodies » |
| As ₂ O ₃ | trioxyde d'arsenic |
| ATP | adenosine triphosphate |
| C-ANCA | ANCA cytoplasmiques |
| CH ₃ HgCl | chlorure de méthylmercure |
| CR | « complement receptor » |
| CRT | calréticuline |
| D | résidu aspartate |
| DHR123 | dihydrorhodamine 123 |
| ERK | « extracellular signal regulated kinase » |
| FasL | Fas ligand |
| FI | filaments intermédiaires |
| fMLP | n-formyl-met-leu-phe |
| G-CSF | « granulocyte-colony stimulating factor » |
| GFAP | « glial fibrillary acidic protein » |
| GM-CSF | « granulocyte macrophage-colony stimulating factor » |
| <i>Gsn</i> ^{-/-} | souris déficientes en gelsoline |
| GTP | guanosyl triphosphate |
| H ₂ O ₂ | peroxyde d'hydrogène |
| HOCl | acide hypochlorique |
| ICAM | « intercellular adhesion molecule » |
| IFN-γ | interferon-γ |
| IL | interleukine |
| ITAMS | « immunoreceptor tyrosine-based activation motifs » |
| LAP | « lamina-associated polypeptide » |
| LBR | « lamin-B receptor » |
| LPS | lipopolysaccharides |
| <i>Lmnb1</i> ^{-/-} | souris déficientes en lamine B ₁ |

| | |
|-----------------------------|--|
| MAPK | « mitogen activating protein kinase » |
| MF | microfilaments |
| MFAP | « microfilament associated proteins » |
| MPO | myéloperoxydase |
| MT | microtubules |
| NADPH | « nicotinamide adenine dinucleotide phosphate » |
| NET | « neutrophil extracellular traps » |
| NMHC-IIA | chaîne lourde IIA de la myosine non musculaire |
| NO | oxyde nitrique |
| NO ₂ | dioxyde d'azote |
| O ₂ ⁻ | superoxyde |
| OH ⁻ | radical hydroxyle |
| ONOO ⁻ | peroxynitrite |
| PAD | peptidylarginine déiminase |
| PAF | « platelet-activating factor » |
| P-ANCA | ANCA périnucléaires |
| PECAM | « platelet-endothelial cell adhesion molecule » |
| PI3K | phosphatidyl-inositol-3 kinase |
| PKC | protéine kinase C |
| PMA | phorbol 12-myristate 13-acetate |
| PR | polyarthrite rhumatoïde |
| PS | phosphatidylsérines |
| PS-R | récepteur aux phosphatidylsérines |
| SNARE | « SNAP receptor » |
| TGF-β1 | « transforming growth factor-β1 » |
| TNF-α | « tumor necrosis factor-α » |
| VAA-I | <i>Viscum album</i> agglutinine-I |
| VCAM | « vascular cell adhesion molecule » |
| VE | « vascular-endothelial » |
| <i>Vim</i> ^{-/-} | souris déficientes en vimentine |
| z-VAD-fmk | « N-benzyloxy-carbonyl-V-A-D-O-methylfluoromethyl ketone » |

Liste des figures et des tableaux

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Rôle du neutrophile dans l'inflammation..... | 4 |
| Figure 2 : Voies de transmigration des leucocytes. | 7 |
| Figure 3 : Structure et activation de la NADPH oxydase. | 17 |
| Figure 4 : Reconnaissance des cellules apoptotiques par les phagocytes. | 21 |
| Figure 5 : Types de filaments formant le cytosquelette. | 28 |
| | |
| Tableau 1 : Contenu des granules cytoplasmiques et vésicules sécrétoires des neutrophiles..... | 15 |
| Tableau 2 : Études in vivo démontrant l'importance de certaines molécules dans l'élimination des cellules apoptotiques et débris cellulaires. | 22 |
| Tableau 3 : Modulation de l'expression de certaines molécules à la surface des neutrophiles apoptotiques | 25 |
| Tableau 4 : Classification des filaments intermédiaires | 32 |

Résumé

Des auto-anticorps dirigés contre les protéines du cytosquelette sont retrouvés dans plusieurs cas de maladies auto-immunes. Il a été démontré que deux protéines du cytosquelette, la vinculine et la vimentine, peuvent être exposées à la surface des macrophages, des plaquettes et des lymphocytes. Ceci pourrait expliquer en partie la production d'auto-anticorps anti-cytosquelette. Sachant que le neutrophile circule en grandes quantités dans le sang et qu'il meurt spontanément par apoptose, il est important de comprendre les modifications encourues au niveau du cytosquelette lors de la modulation de l'apoptose. Nous avons tout d'abord vérifié l'expression de différentes protéines du cytosquelette à la surface des neutrophiles humains. Nous avons découvert que seules les protéines des filaments intermédiaires (FI) – la vimentine et la lamine B₁ – sont exposées à la surface des neutrophiles apoptotiques. L'étude de l'expression intracellulaire de ces deux protéines nous a indiqué que celles-ci sont clivées par les caspases durant l'apoptose spontanée des neutrophiles. À l'inverse, le retard de l'apoptose a pour effet de diminuer la dégradation intracellulaire et l'expression à la surface des FI. Afin de comprendre davantage le rôle des FI dans la physiologie des neutrophiles, nous avons utilisé une colonie de souris déficientes en vimentine (*Vim*^{-/-}), qui se développent et se reproduisent normalement, contrairement aux souris déficientes en lamine B₁. En utilisant le modèle de la poche d'air murine, nous avons étudié pour la première fois le rôle de la vimentine dans les mécanismes d'inflammation *in vivo* et dans les fonctions des neutrophiles *ex vivo*. Nous avons découvert que la réponse inflammatoire induite par différents agents est la même chez les souris *Vim*^{+/+} et *Vim*^{-/-} et que les fonctions des neutrophiles dépourvus de vimentine ne sont pas altérées. Ces observations suggèrent que la vimentine n'est pas essentielle à l'établissement d'une réponse inflammatoire aiguë *in vivo* et qu'il existerait un mécanisme compensatoire complexe qui expliquerait la réponse inflammatoire normale des souris *Vim*^{-/-}.



Eliane Moisan, M.Sc.
Étudiante



Denis Girard, Ph.D.
Directeur de recherche

Introduction

Le cytosquelette est une structure dynamique composé de nombreuses protéines formant des réseaux. Celui-ci pourrait être impliqué dans de nombreux désordres auto-immuns, puisqu'on retrouve des anticorps anti-cytosquelette chez des patients souffrant de ce type de maladies. Cependant, l'origine de ces auto-anticorps demeure encore incertaine. Il a été démontré jusqu'ici que deux protéines du cytosquelette, la vinculine et la vimentine, peuvent être exposées à la surface des macrophages activés, des plaquettes sanguines et des lymphocytes T apoptotiques. Une telle relocalisation des protéines pourrait partiellement expliquer la présence d'auto-anticorps anti-cytosquelette.

Le neutrophile, leucocyte le plus abondant du sang, est une cellule grandement impliquée dans les processus inflammatoires. Cette cellule meurt spontanément par apoptose après environ 24 heures et représente une source importante d'auto-antigènes. Plusieurs fonctions des neutrophiles requièrent un réarrangement du cytosquelette. Il est donc important d'étudier l'implication de ces protéines dans les fonctions des neutrophiles.

Dans le cadre de ce projet, nous avons démontré que parmi plusieurs protéines du cytosquelette étudiées, les protéines des filaments intermédiaires (FI) -vimentine et lamine B₁- sont exposées à la surface des neutrophiles durant l'apoptose spontanée, alors que les protéines associées aux microfilaments (vinculine, paxilline et gelsoline) et des microtubules (α - et β -tubuline) ne sont pas présentes à la surface. Nous avons démontré que la vimentine et la lamine B₁ sont clivées durant l'apoptose spontanée des neutrophiles et que ce clivage est inhibé par l'ajout de l'inhibiteur de caspases z-VAD-fmk. Cet inhibiteur a également diminué de façon significative l'expression des FI à la surface des neutrophiles. De plus, le clivage de la vimentine et de la lamine B₁ a été partiellement inhibé lorsque les neutrophiles furent incubés en présence de différents agents retardant l'apoptose (LPS, G-CSF, GM-CSF, IL-4). Ces agents ont également inhibé l'expression des FI à la surface cellulaire.

Les neutrophiles expriment seulement deux protéines des FI, la vimentine et la lamine B. Alors que les souris déficientes en lamine B₁ meurent à la naissance, les souris déficientes en vimentine (*Vim*^{-/-}) se développent et se reproduisent normalement. Différentes études

effectuées auprès des souris *Vim*^{-/-} ont démontré que la vimentine joue un rôle dans certains processus biologiques, entre autres, au niveau de l'adhésion et la transmigration des lymphocytes. Nous avons donc utilisé une colonie de souris *Vim*^{-/-} afin d'étudier le rôle de la vimentine durant une réponse inflammatoire *in vivo* et dans certaines fonctions des neutrophiles *in vitro*, une facette jamais étudiée. Nous démontrons que l'infiltration des leucocytes est identique chez les souris *Vim*^{+/+} et *Vim*^{-/-} en termes de quantités et types de cellules attirées *in vivo* en utilisant trois agonistes différents (lipopolysaccharides, interleukine-21 et carraghénine). La quantité de leucocytes dans le sang et la morphologie des neutrophiles et de leurs noyaux étaient les mêmes chez les souris *Vim*^{+/+} et *Vim*^{-/-}. Nous avons par la suite utilisé les neutrophiles attirés *in vivo* afin de les utiliser pour déterminer l'implication de la vimentine dans différentes fonctions *in vitro*. Nous démontrons que l'apoptose (spontanée, induite et retardée) n'est pas altérée en absence de vimentine et que plusieurs fonctions cellulaires ne sont pas affectées chez les neutrophiles déficients en vimentine.

Les résultats présentés dans cette thèse de doctorat décrivent pour la première fois l'expression de certaines protéines du cytosquelette à la surface des neutrophiles apoptotiques, démontrant que ces cellules pourraient jouer un rôle dans l'apparition d'auto-anticorps dirigés contre des protéines du cytosquelette. L'utilisation des souris *Vim*^{-/-} nous indique que l'absence de vimentine n'influence en rien la capacité d'établir une réponse inflammatoire normale *in vivo*, ainsi que plusieurs fonctions des neutrophiles *ex vivo*.

La première section de cette thèse consiste en une revue de la littérature, divisée en deux parties. La première partie relate les principales connaissances sur les mécanismes de l'inflammation, le rôle des neutrophiles dans le processus, ainsi que le développement de désordres inflammatoires. La seconde partie porte sur les différents types de filaments composant le cytosquelette. Nous évoquerons quelques connaissances sur le rôle des différentes protéines du cytosquelette dans l'inflammation et lors de l'apoptose des cellules. Nous exposerons ensuite quelques études démontrant certaines des fonctions du cytosquelette par l'utilisation de souris knockout.

SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. LE NEUTROPHILE ET L'INFLAMMATION

1.1. La réaction inflammatoire

Le rôle principal du système immunitaire est de défendre l'organisme contre toute attaque susceptible de compromettre son intégrité. Pour ce faire, le système immunitaire se compose de nombreux types cellulaires, notamment les différents types de leucocytes et composantes moléculaires (cytokines, complément, anticorps, etc.). L'inflammation, qui se manifeste cliniquement par l'apparition locale de douleur, chaleur, rougeur et enflure, est la première réponse protectrice du système immunitaire, à une infection ou une irritation. Les éléments clés de l'inflammation consistent en une augmentation du flux sanguin local, une accumulation et activation des cellules inflammatoires d'origine hématopoïétique, suivies de l'élimination des particules étrangères, des débris cellulaires et des cellules inflammatoires elles-mêmes. Ce mécanisme se termine par la réparation et le rétablissement des fonctions des tissus endommagés, contribuant au maintien de l'homéostasie (Henson, 2005).

1.1.1. L'inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est souvent caractérisée par un influx rapide de granulocytes circulant dans le sang, typiquement les neutrophiles, suivi de la venue de monocytes se différenciant en macrophages inflammatoires qui affectent les fonctions des macrophages résidant dans les tissus environnants. La résolution de l'inflammation ne se produit que lorsque les neutrophiles apoptotiques sont éliminés par les phagocytes environnants et que la population de cellules mononucléées (macrophages et lymphocytes) retourne à des niveaux et phénotypes normaux (Serhan et Savill, 2005).

1.1.2. L'inflammation chronique

L'inflammation chronique peut avoir lieu en réponse à une exposition prolongée à un agent toxique ou infectieux, suite à une infection virale ou bactérienne, lorsqu'il y a absence de résolution de la réponse inflammatoire aiguë ou bien dans le cas de maladies auto-immunes. Ce processus, caractérisé par une inflammation qui dure pendant des jours, des mois, voire des années, peut mener à la formation de dommages permanents

aux tissus de l'organisme. L'inflammation chronique est caractérisée par la présence dominante de cellules mononucléées, notamment les macrophages dans les tissus. Ces cellules sont de puissants défenseurs de l'organisme, mais elles peuvent également libérer de nombreux facteurs puissants et dommageables aux tissus de l'organisme. De plus, elles ont la capacité de produire de nombreux médiateurs moléculaires pouvant recruter davantage de cellules inflammatoires. C'est pourquoi l'inflammation chronique est toujours accompagnée d'une destruction des tissus environnants (Luster, Alon et von Andrian, 2005).

1.2. Rôle du neutrophile dans l'inflammation

Les neutrophiles sont des cellules phagocytaires qui participent à l'inflammation en tant que première ligne de défense contre les bactéries, les champignons et les levures. Le noyau des neutrophiles est multilobé de formes variables et comporte de deux à quatre lobes reliés par des filaments de chromatine. Les neutrophiles sont produits à un rythme d'environ $1-2 \times 10^{11}$ cellules par jour et comptent pour 40 à 65 % des leucocytes. Ce sont les leucocytes les plus abondants du sang chez l'humain et sont retrouvés à des concentrations d'environ $3-5 \times 10^6$ cellules/ml de sang. Ce nombre peut augmenter de façon dramatique lors de l'infection car ces cellules s'accumulent en quelques heures au site d'inflammation. Ce sont également les cellules qui ont la plus courte durée de vie parmi tous les leucocytes (jusqu'à 24 à 36 heures dans la circulation sanguine), mais elles peuvent survivre pendant plusieurs jours dans les tissus en conditions inflammatoires (Edwards, 1994; Seely, Pascual et Christou, 2003; Luster, Alon et von Andrian, 2005).

La migration des neutrophiles vers le site inflammatoire constitue une séquence d'événements ordonnés et interdépendants (figure 1, page 4). L'inflammation due à un dommage aux tissus ou à une infection induit une libération de cytokines et de molécules chimioattractantes par les cellules en détresse. Les signaux inflammatoires provoquent une augmentation d'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales. Des molécules chimioattractantes sont produites et relâchées dans le lumen pour attirer les leucocytes circulants. Les leucocytes exprimant les récepteurs aux chimiokines appropriées (neutrophiles) adhèrent à l'endothélium, se polarisent et traversent

l'endothélium par diapédèse. Les neutrophiles se dirigent vers le site inflammatoire en suivant le gradient de molécules chimioattractantes. Il y a alors phagocytose et destruction du micro-organisme via la flambée oxydative et la dégranulation. Une fois l'agent pathogène maîtrisé, les neutrophiles meurent par apoptose et sont phagocytés par les phagocytes environnants (Luster, Seely, Pascual et Christou, 2003).

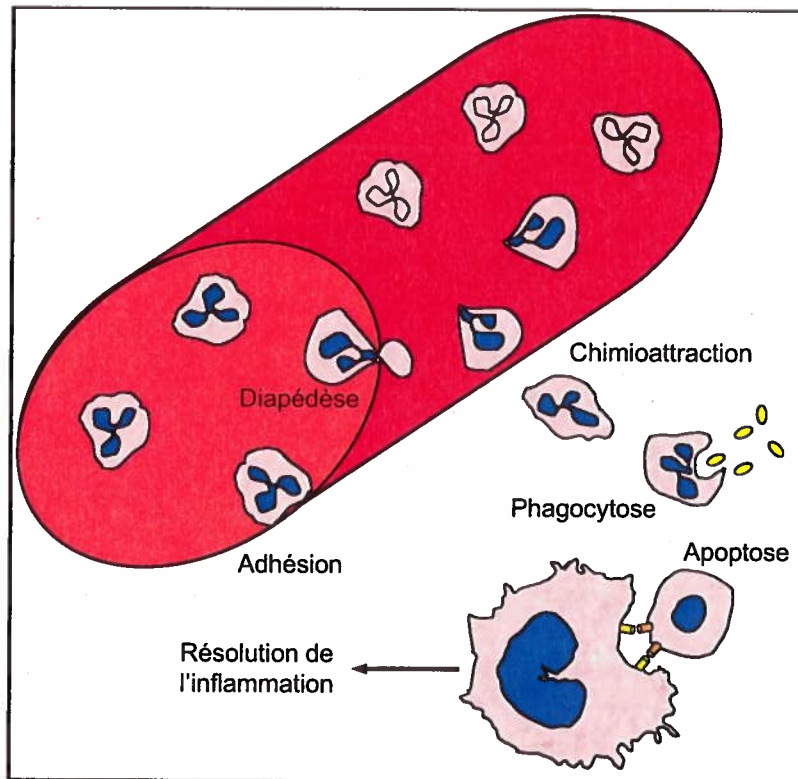


Figure 1 : Rôle du neutrophile dans l'inflammation. Les neutrophiles sont attirés au site inflammatoire, quittent la circulation sanguine (diapédèse), migrent vers le site inflammatoire (chimioattraction), phagocytent et détruisent les micro-organismes. L'inflammation se résorbe lorsque les neutrophiles meurent par apoptose et sont ingérés par des phagocytes. (Inspirée de Edwards, 1994).

1.2.1. Adhésion

Les neutrophiles circulent dans le sang sous un état de cellules non adhérentes. En présence d'un dommage aux tissus, les cellules environnantes libèrent des médiateurs inflammatoires qui provoquent l'expression de molécules d'adhésion sur l'endothélium situé près du site inflammatoire. Les neutrophiles expriment une quantité abondante de molécules d'adhésion afin de se fixer rapidement aux récepteurs situés sur la surface des cellules endothéliales lors d'une inflammation (Luster, Seely, Pascual et Christou, 2003).

L'endothélium situé à proximité du site inflammatoire produit des molécules chimioattractantes comme le « platelet-activating factor » (PAF), le leucotriène B₄, des peptides formylés comme le n-formyl-met-leu-phe (fMLP), des produits de la cascade du complément (C5a) et différentes chimiokines comme l'interleukine-8 (IL-8). Ces chimioattractants sont transportés du site inflammatoire, internalisés par les cellules endothéliales, transcytosés vers le milieu luminal via les cavéoles (vésicules plasmiques) et présentés, au bout de microvilli via une molécule de présentation (protéoglycan), sur la surface luminale des cellules endothéliales. Parmi les chimiokines, l'IL-8 attire spécifiquement les neutrophiles, sans avoir aucun effet sur la transmigration des leucocytes mononucléés (Witko-Sarsat *et al*, 2000; Cicchetti, Allen et Glogauer, 2002; Ley, 2002).

La dilatation des vaisseaux sanguins au site inflammatoire diminue le flux de circulation des leucocytes, permettant aux neutrophiles de rouler sur la paroi de l'endothélium. Durant cette étape de roulement, les neutrophiles réagissent aux chimiokines présentes à la surface de l'endothélium. L'étape de roulement est réalisée par l'intermédiaire des sélectines, soit des molécules de L-sélectine à la surface des neutrophiles et des molécules de E- et P-sélectines exprimées à la surface des cellules endothéliales activées. Contrairement aux E- et P-sélectines, la L-sélectine est exprimée constitutivement à la surface des leucocytes. Sa capacité d'adhésion est augmentée rapidement et transitoirement suite à l'activation du leucocyte, possiblement via une oligomérisation du récepteur. Le roulement gouverné par des interactions moléculaires faibles constitue un prérequis à une interaction moléculaire beaucoup plus ferme, soit l'adhésion (Witko-Sarsat *et al*, 2000; Wagner et Roth, 2000; Ley, 2002; Seely, Pascual et Christou, 2003).

L'adhésion du neutrophile aux cellules endothéliales semble impliquer exclusivement l'interaction des intégrines de la sous-famille $\beta 2$ (CD11a, CD11b, CD11c/CD18) chez le neutrophile et les molécules d'ICAM-1 (« intercellular adhesion molecule-1 ») et de VCAM-1 (« vascular cell adhesion molecule-1 ») à la surface des cellules endothéliales. Les intégrines composent une famille de protéines hétérodimériques constituées de deux sous-unités différentes (la sous-unité α et la sous-unité β). Les $\beta 2$ -intégrines, ayant toutes le CD18 comme sous-unité β , sont incapables d'interagir avec leurs ligands

physiologiques lorsque le neutrophile est au repos, constituant ainsi un mécanisme de protection contrôlant les réponses inflammatoires. Des signaux d'activation perçus par le neutrophile, comme les chimiokines présentes à la surface des cellules endothéliales et l'engagement des L-sélectines à la surface des neutrophiles, ont pour effet de permettre aux β 2-intégrines de se lier à leurs ligands, menant à l'adhésion ferme du neutrophile et à l'activation d'un mouvement directionnel spécifique. La membrane du neutrophile et la cellule endothéliale doivent absolument réaliser une adhésion ferme entre elles afin de permettre la transmigration du granulocyte (Witko-Sarsat *et al*, 2000; Wagner et Roth, 2000; Seely, Pascual et Christou, 2003).

Dès qu'une molécule chimioattractante se lie à son récepteur à la surface du neutrophile, une série d'événements cytoplasmiques sont engendrés, ce qui résulte en une activation de la machinerie du cytosquelette. Cette activation permet au neutrophile d'acquérir une morphologie polarisée, caractérisée par une portion cellulaire riche en actine à l'avant de la cellule et un uropode à l'arrière. Cet assemblage des filaments d'actine à l'avant de la cellule est nécessaire à la migration rapide du neutrophile. Les filaments d'actine dans cette région cellulaire sont assemblés en une structure hautement organisée et solide servant à pousser la membrane dans la direction requise (Cicchetti, Allen et Glogauer, 2002).

1.2.2. Diapédèse

Suivant l'adhésion du neutrophile aux cellules endothéliales, celui-ci doit passer au travers de la couche endothéliale pour se rendre vers le site inflammatoire. Les connaissances sur les mécanismes de la diapédèse du neutrophile sont peu détaillées jusqu'ici. Il existe toujours une controverse concernant les mécanismes moléculaires régulant la transmigration des leucocytes et la voie prise par ces cellules alors qu'elles migrent au travers de l'endothélium (Kvietys et Sandig, 2001; Petri et Bixel, 2006; Ley *et al*, 2007). Initialement, il était conçu que les leucocytes traversaient l'endothélium par une seule voie, soit en s'insérant entre les cellules endothéliales (voie paracellulaire). Or il a été démontré, depuis, que les leucocytes peuvent parfois traverser la barrière endothéliale via une voie transcellulaire, c'est-à-dire en passant à l'intérieur d'une cellule

endothéliale individuelle (figure 2) (Kvietys et Sandig, 2001; Dejana, 2006; Petri et Bixel, 2006; Ley *et al*, 2007).

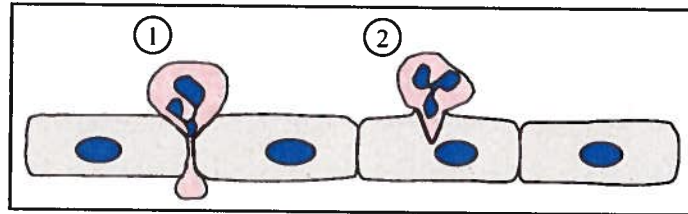


Figure 2 : Voies de transmigration des leucocytes. Il existe deux voies de transmigration, soit la voie paracellulaire (1) par laquelle le leucocyte traverse entre les cellules endothéliales, et la voie transcellulaire (2) où le leucocyte passe au travers d'une cellule endothéliale individuelle. (Inspirée de Dejana, 2006; Petri et Bixel, 2006).

Bien qu'il y aurait co-existence des deux voies de transmigration (Carman et Springer, 2004; Engelhardt et Wolburg, 2004; Dejana, 2006), la vision la plus admise est que les leucocytes trouvent leur chemin à travers les jonctions entre les cellules endothéliales (voie paracellulaire). Seule une faible proportion (environ 5-20%) des leucocytes emprunte la voie transcellulaire (Kvietys et Sandig, 2001; Carman et Springer, 2004; Dejana, 2006; Phillipson *et al*, 2006). La prévalence de la voie paracellulaire est toutefois contestée par certains. Par exemple, une étude a observé que, après avoir injecté du fMLP chez des cobayes, la grande majorité des neutrophiles quittait les vaisseaux sanguins par la voie transcellulaire (Feng *et al*, 1998). Il faut noter que cette étude a été faite en utilisant seulement un modèle inflammatoire, chez un type spécifique d'animal (cobaye), au niveau d'un tissu unique (peau), avec un seul type de leucocyte (neutrophile) en réponse à un agent inflammatoire particulier (fMLP), ce qui pourrait varier avec d'autres conditions expérimentales.

Le neutrophile emprunte toujours la voie offrant le moins de résistance à la transmigration. Lorsque la transmigration est retardée pour une raison quelconque, celle-ci se produit préférentiellement par la voie transcellulaire (Ley *et al*, 2007). Ceci a été démontré par exemple avec des neutrophiles provenant de souris déficientes en intégrines CD11b/CD18 (MAC-1). Ces neutrophiles n'arrivaient pas à se diriger vers les jonctions entre les cellules endothéliales, où la transmigration peut se faire de façon optimale. Parmi les quelques neutrophiles *MAC-1*^{-/-} qui parvenaient tant bien que mal à traverser l'endothélium, la majorité empruntait la voie transcellulaire, contrairement à la majorité

des neutrophiles provenant de souris normales qui traversaient rapidement par la voie paracellulaire (Phillipson *et al*, 2006).

Il semblerait que différents facteurs, comme la localisation dans le système vasculaire et le type d'endothélium, ont une influence majeure sur la voie empruntée par le leucocyte pour traverser l'endothélium. *In vivo*, la diapédèse transcellulaire des neutrophiles est associée aux sites où les cellules endothéliales sont amincies (Feng *et al*, 1998). De plus, dans certaines régions vasculaires comme dans le cerveau ou certaines artères, les jonctions entre les cellules endothéliales sont très solides, ce qui fait que les leucocytes seront plus enclins à emprunter la voie transcellulaire, maintenant intactes les jonctions serrées (Engelhardt et Wolburg, 2004; Petri et Bixel, 2006). Il faut toutefois noter que la diapédèse transcellulaire au travers de la barrière hémato-encéphalique n'a été observée que dans des modèles pathologiques (Engelhardt et Wolburg, 2004). En revanche, au niveau de certaines veinules (où les jonctions sont plus faiblement organisées), la voie paracellulaire est favorisée (Dejana, 2006).

La voie de transmigration pourrait être également spécifique au type cellulaire. Ceci serait, entre autres, relié aux niveaux d'expression et d'activation des ligands des leucocytes qui sont impliqués dans la diapédèse (Ley *et al*, 2007). L'équipe de Nieminen (2006) a récemment observé que les neutrophiles et les lymphocytes humains préfèrent différentes routes pour traverser des cellules endothéliales stimulées avec du « tumor necrosis factor- α » (TNF- α) *in vitro*. Contrairement aux lymphocytes qui empruntaient davantage la voie transcellulaire, les neutrophiles traversaient plutôt par la voie paracellulaire. De plus, ces chercheurs ont observé que le niveau d'activation des cellules endothéliales, principalement le niveau d'expression de la molécule ICAM-1, pouvait influencer la voie de transmigration empruntée par les leucocytes (Nieminen *et al*, 2006). Cette observation est contestable, puisqu'une autre étude *in vitro* a démontré que trois types de leucocytes, (monocytes, neutrophiles et lymphocytes), utilisent tous préférentiellement, la voie paracellulaire. Seulement environ 7% des monocytes, 5% des neutrophiles et 11% des lymphocytes empruntaient la voie transcellulaire (Carman et Springer, 2004).

Mécanisme de la diapédèse paracellulaire

La transmigration des neutrophiles par la voie paracellulaire requiert des modifications au niveau des jonctions entre les cellules endothéliales. La liaison des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales (ICAM-1 et VCAM-1) mènerait à une réduction des contacts entre les cellules de l'endothélium (Ley *et al*, 2007). Il y a désorganisation transitoire des composantes jonctionnelles telles que les β -cathénines et les « vascular-endothelial »-cadhérines (VE-cadhérines) (Kvietys et Sandig, 2001; Petri et Bixel, 2006). Il semblerait que les neutrophiles aident à détacher les jonctions entre les cellules endothéliales avec de l'élastase. Durant la diapédèse, l'élastase n'est pas sécrétée dans le milieu extracellulaire, mais serait plutôt exposée à la membrane du pseudopode pénétrant entre les cellules endothéliales adjacentes (Kvietys et Sandig, 2001; Ley *et al*, 2007). Les molécules d'adhésion présentes à la surface des cellules endothéliales sont également essentielles au processus. La première protéine transmembranaire, découverte pour jouer un rôle dans l'extravasation des leucocytes, est la « platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 » (PECAM-1), une molécule d'adhésion présente à la surface des cellules endothéliales, des leucocytes (incluant les neutrophiles) et des plaquettes. Chez les cellules endothéliales, PECAM-1 est concentrée principalement aux jonctions intercellulaires (Petri et Bixel, 2006; Ley *et al*, 2007). Cette protéine permet aux neutrophiles de quitter l'adhésion dépendante des β 2-intégrines pour se rendre aux jonctions intercellulaires et effectuer la transmigration (Witko-Sarsat *et al*, 2000; Seely, Pascual et Christou, 2003). Il semblerait que ICAM-2, molécule exprimée constitutivement à la surface des cellules endothéliales, est également impliquée dans l'extravasation des neutrophiles. La plupart des molécules d'adhésion cellulaire impliquées dans la diapédèse sont localisées au niveau des jonctions entre les cellules endothéliales. Cependant, les leucocytes qui entrent en contact avec ces molécules peuvent tout de même emprunter la voie transcellulaire (Petri et Bixel, 2006).

Mécanisme de la diapédèse transcellulaire

Jusqu'ici, on connaît peu de choses sur les mécanismes et les molécules impliquées dans la diapédèse des neutrophiles par la voie transcellulaire. Il semblerait que le neutrophile utilise des cavéoles ou des vésicules de la cellule endothéliale et insère un pseudopode à

l'intérieur de la cavité pour traverser (Kvietys et Sandig, 2001; Carman et Springer, 2004; Millan *et al*, 2006; Ley *et al*, 2007). Il a été démontré *in vitro* et *in vivo* qu'il y a une forte concentration de microfilaments d'actine dans ce pseudopode lors de la diapédèse (Wolosewick, 1984; Cepinskas, Sandig et Kvietys, 1999). Cette accumulation de protéines du cytosquelette dans le front de migration pourrait générer la force requise au leucocyte pour s'insérer à l'intérieur de la cellule endothéliale. Des réarrangements des filaments du cytosquelette permettent l'accumulation d'ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales et participent ainsi à la force motrice nécessaire à l'internalisation du leucocyte traversant par cette voie (Dejana, 2006; Millan *et al*, 2006; Petri et Bixel, 2006; Ley *et al*, 2007). L'équipe de Nieminen (2006) a suggéré que les filaments intermédiaires de vimentine sont activement réorganisés dans la région de contact entre les lymphocytes et les cellules endothéliales. Des microvilli enrichis de vimentine, présents sur les deux types cellulaires, s'allongent pour former une structure d'ancrage dynamique pour éventuellement effectuer la diapédèse par la voie transcellulaire. De plus, les auteurs ont démontré que les souris déficientes en vimentine ont un plus faible niveau d'adhésion entre les cellules endothéliales et les lymphocytes *in vitro*, démontrant l'importance de la protéine des filaments intermédiaires durant le processus (Nieminen *et al*, 2006).

1.2.3. Chimioattraction

Le neutrophile migre dans les tissus en suivant un gradient de molécules chimioattractantes. Il doit s'éloigner des chimioattractants situés près de l'endothélium pour s'approcher de sa cible finale, le foyer inflammatoire. Il existerait une certaine hiérarchisation des molécules chimioattractantes produites lors de l'inflammation. En effet, différents types de chimioattractants sont produits par les bactéries, par les cellules mortes ou par les cellules environnantes selon la distance du foyer inflammatoire. Tous les récepteurs couplés aux protéines G se désensibilisent de leurs ligands respectifs, c'est-à-dire que le récepteur est internalisé et phosphorylé en réponse à la liaison. Il y a donc désensibilisation à une molécule et attirance par une nouvelle plus puissante. Ceci aide le neutrophile à déterminer la direction à prendre afin de se rendre au site infecté (Witko-Sarsat *et al*, 2000; Ley, 2002).

La migration du neutrophile se fait par l'intermédiaire des β 2-intégrines, de concert avec les β 1- et β 3-intégrines. Ces dernières sont pour la plupart emmagasinées dans les granules intracellulaires et rapidement exprimées à la membrane plasmique suite à la stimulation de la cellule par les chimioattractants et la transmigration. La locomotion des leucocytes requiert une formation de nouvelles adhésions au substrat, au devant de la cellule, alors que le derrière de celle-ci se détache. Lorsqu'elles atteignent l'arrière de la cellule, les molécules d'adhésion sont endocytosées et recyclées au devant (Witko-Sarsat *et al*, 2000; Wagner et Roth, 2000).

Les neutrophiles possèdent de nombreux récepteurs de molécules chimioattractantes, faisant partie de la super-famille de récepteurs à sept domaines transmembranaires, associés à des protéines intracellulaires liant le guanosyl triphosphate (GTP). Ces récepteurs activent les phospholipases via les protéines G, ce qui mène à une augmentation du calcium intra-cytoplasmique et à une activation des isoformes de protéines kinases C (PKC). Les tyrosines kinases et Ras, une protéine se liant au GTP, sont aussi activées. Ras induit une activation de la cascade de kinases MAPK/ERK. De plus, l'activation des protéines se liant au GTP de familles Ras, Rac et Rho régule les processus dépendant de l'actine, comme la formation de filopodes, l'adhésion et la motilité cellulaire. Rho provoque également l'activation des intégrines. Finalement, les récepteurs de chimioattractants activent la phosphatidyl-inositol-3 kinase (PI3K) via leur attachement aux protéines G. La PI3K est impliquée dans les mécanismes de dégranulation et de flambée oxydative (Witko-Sarsat *et al*, 2000).

1.2.4. Phagocytose

Le neutrophile est le principal phagocyte envoyé vers le site inflammatoire. Son rôle est de détruire et ingérer les pathogènes dans la circulation et dans les tissus, ce qui constitue une composante de première importance de l'immunité non spécifique. Les récepteurs à la surface du neutrophile sont essentiels à la phagocytose et à l'activation simultanée des mécanismes microbicides. Utilisant des mécanismes semblables à ceux utilisés lors du mouvement cellulaire par chimioattraction, la membrane du neutrophile est capable d'étendre des pseudopodes et engouffrer le micro-organisme. Pour ce faire, le micro-

organisme doit être recouvert de molécules de reconnaissance, soit des opsonines. Les opsonines incluent principalement les fragments du complément et les anticorps (Seely, Pascual et Christou, 2003).

La phagocytose par les neutrophiles implique deux types de récepteurs, soit les récepteurs Fc γ et les récepteurs aux protéines du complément. Les neutrophiles expriment constitutivement deux types de récepteurs Fc γ de faible affinité pour les IgG, soit le Fc γ RIIa (CD32a) et le Fc γ RIIIb (CD16b). Le Fc γ RI (CD64) est pour sa part un récepteur de haute affinité et son expression à la surface est inductible suite à une incubation prolongée avec de l'interféron- γ ou du « granulocyte-colony stimulating factor » (G-CSF). Les récepteurs phagocytiques du complément comprennent le « complement receptor-1 » (CR1 ou CD35) et le CR3 (intégrine CD11b/CD18). Les récepteurs phagocytiques fonctionnels sont le Fc γ RIIa et le CR3, tandis que le Fc γ RIIIb et le CR1 semblent plutôt jouer le rôle de co-récepteurs facilitant les fonctions des récepteurs fonctionnels. Pour ce qui est du Fc γ RI, son rôle demeure incertain pour le moment (Edwards, 1994; Witko-Sarsat *et al*, 2000; Seely, Pascual et Christou, 2003).

Les signaux intracellulaires engendrés par les deux classes de récepteurs phagocytiques sont différents. L'ingestion de particules opsonisées avec des IgG est précédée d'une agrégation des récepteurs Fc γ RIIa et de la phosphorylation de leurs motifs ITAMS (« immunoreceptor tyrosine-based activation motifs ») cytoplasmiques via l'activation de tyrosines kinases de la famille Src. La phosphorylation de ces kinases active la tyrosine kinase Syk qui, à son tour, active, entre autres, la PI3K et la protéine Rho. Rho induit des changements au niveau des filaments du cytosquelette permettant des changements membranaires menant à la formation d'une coupe phagocytique entourant la particule à ingérer (Witko-Sarsat *et al*, 2000). La phagocytose de particules opsonisées avec des fragments C3bi du complément se fait via le récepteur CR3. Contrairement à la phagocytose via les récepteurs Fc, celle impliquant le complément se fait par l'invagination de la membrane et n'implique pas une augmentation du flux calcique cytosolique et une production d'inositol phosphate. De plus, bien que la phagocytose via les récepteurs Fc soit accompagnée par l'activation de la flambée oxydative et de la

production de dérivés de l'acide arachidonique et de cytokines, ceci ne se produit pas lors de la phagocytose via le complément (Witko-Sarsat *et al*, 2000).

La signalisation intracellulaire engendrée par l'ingestion de particules opsonisées mène à la libération de granules cytosoliques à l'intérieur des vacuoles. Une combinaison synergique de molécules oxydantes et d'enzymes puissantes servent à détruire les particules ingérées par le neutrophile. L'efficacité anti-microbienne du neutrophile dépend donc de deux mécanismes se produisant dans le phagolysosome du neutrophile activé : la libération de protéines enzymatiques et anti-microbiennes contenues dans les granules cytoplasmiques (dégranulation) et la flambée oxydative via l'assemblage et l'activation de la « nicotinamide adenine dinucleotide phosphate » (NADPH) oxydase (Witko-Sarsat *et al*, 2000; Seely, Pascual et Christou, 2003).

1.2.5. Dégranulation et flambée oxydative

La dégranulation

La classification des granules cytoplasmiques se base sur la séquence de formation lors des stades de différenciation du neutrophile. Ceux-ci sont divisés selon leurs constituants protéiques (tableau 1, page 15). Les granules azurophiles apparaissent au stade promyélocytaire et contiennent de la myéloperoxydase (MPO), des sérines protéases et des protéines antibiotiques. Plus tard, il y a formation au stade métamyélocyte des granules spécifiques (secondaires) contenant de la lactoferrine et de la collagénase. Puis, il y a production des granules tertiaires contenant de la gélatinase. Un quatrième type de granules, les vésicules sécrétoires, apparaissent chez le neutrophile lorsque la cellule a atteint sa pleine maturité (Edwards, 1994; Hampton, Kettle et Winterbourn, 1998; Witko-Sarsat *et al*, 2000; Faurschou et Borregaard, 2003).

Les granules du neutrophile constituent un important réservoir de protéines antimicrobiennes, de protéases et de composantes de la NADPH oxydase, nécessaires à la flambée oxydative. Mais les granules ne sont pas impliqués uniquement dans la destruction des micro-organismes. La plupart des étapes d'activation du neutrophile lors de l'inflammation demandent une participation des granules cytoplasmiques et des vésicules sécrétoires. Les granules contiennent également une variété de récepteurs

membranaires, impliqués dans l'adhésion aux cellules endothéliales, aux protéines de la matrice extracellulaire, à la reconnaissance de produits bactériens et de médiateurs inflammatoires. Par exemple, l'interaction entre les neutrophiles et les cellules endothéliales mène à une mobilisation des vésicules sécrétoires des neutrophiles. Cette mobilisation enrichit la surface membranaire du neutrophile en β 2-intégrines CD11b/CD18 et est accompagné du clivage des L-sélectines. Ces vésicules sont donc impliquées dans le changement de l'étape du roulement à celle de l'adhésion ferme des neutrophiles à la paroi endothéliale (Fauschou et Borregaard, 2003).

L'exocytose des granules tertiaires libère des métalloprotéases impliquées dans la dégradation de la membrane basale lors de la transmigration des neutrophiles. Durant la migration des neutrophiles vers le site inflammatoire, il y a exocytose partielle des granules spécifiques et azurophiles. Ceci a pour effet de mobiliser certains récepteurs de la matrice extracellulaire sur la membrane plasmique et de libérer certaines enzymes dégradant la matrice, ce qui facilite la migration. À la rencontre des pathogènes au site inflammatoire, les neutrophiles activent leurs divers systèmes antimicrobiens dépendants ou indépendants de l'oxygène en relâchant le contenu des granules spécifiques et azurophiles dans le phagosome ou dans le milieu extracellulaire (Fauschou et Borregaard, 2003).

Plusieurs molécules destructrices sont emmagasinées dans les granules sous forme latente et sont activées seulement lors de la dégranulation. Ceci prévient des dommages qui pourraient être infligés inutilement à l'organisme par de telles molécules. La diversité fonctionnelle du contenu des granules permet au neutrophile de détruire les bactéries de différentes façons. Certaines molécules agissent en détruisant les membranes des bactéries, d'autres interfèrent avec les voies métaboliques dépendantes du fer et certaines contribuent à la génération de radicaux libres (Edwards, 1994; Fauschou et Borregaard, 2003).

Tableau 1 : Contenu des granules cytoplasmiques et vésicules sécrétoires des neutrophiles (inspiré de Faurschou et Borregaard, 2003).

| | Granules azurophiles | Granules spécifiques | Granules tertiaires | Vésicules sécrétoires |
|-----------------|--|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Membrane | CD63 | CD11b/CD18 | CD11b/CD18 | Phosphatase alcaline |
| | CD68 | CD15 | Cytochrome b ₅₅₈ | CD10 |
| | Preseniline 1 | CD66 | DDE | CD11b/CD18 |
| | Stomatine | CD67 | fMLP-R | CD13 |
| | H ⁺ -ATPase type V | Cytochrome b ₅₅₈ | Leucolysine | CD14 |
| | | fMLP-R | NRAMP-1 | CD16 |
| | | Fibronectine-R | SCAMP | CD45 |
| | | sous-unité α protéine G | SNAP-23, -25 | CR1 |
| | | Laminine-R | uPA-R | C1q-R |
| | | Leucolysine | VAMP-2 | Cytochrome b ₅₅₈ |
| | | Antigène NB1 | H ⁺ -ATPase type V | DAF |
| | | Protéine 19 kDa | | fMLP-R |
| | | Protéine 155 kDa | | Leucolysine |
| | | Rap1, Rap2 | | VAMP-2 |
| | | SCAMP | | H ⁺ -ATPase type V |
| | | SNAP-23, -25 | | |
| | | Stomatine | | |
| | | Thrombospondine-R | | |
| | | TNF-R | | |
| | | uPA-R | | |
| | | VAMP-2 | | |
| | | Vitronectine-R | | |
| Matrice | Acide β -glycérophosphate | β 2-Microglobuline | Acétyltransférase | Protéines du plasma |
| | Acide mucopolysaccharide | Collagénase | β 2-Microglobuline | |
| | α 1-Antitrypsine | CRISP-3 (SGP-28) | CRISP-3 (SGP-28) | |
| | α -Mannosidase | Gélatinase | Gélatinase | |
| | Azurocidine | hCAP-18 | Lysozyme | |
| | BPI | Histaminase | | |
| | β -Glycerophosphatase | Héparanase | | |
| | β -Glucuronidase | Lactoferrine | | |
| | Cathepsines | Lysozyme | | |
| | Défensines | NGAL | | |
| | Élastase | uPA | | |
| | Lysozyme | Sialidase | | |
| | MPO | Transcobalamine | | |
| | <i>N</i> -acetyl- β -glucosaminidase | | | |
| | Protéinase-3 | | | |
| | Sialidase | | | |
| | Protéine Ubiquitine | | | |

R, récepteur; CRISP, "cystein-rich secretory protein"; SGP-28, "specific granule protein of 28kDa; uPa, urokinase-type plasminogen activator; DDE, Diacylglycerol deacetylating enzyme"; DAF, "Decay-accelerating factor"

La mobilisation des granules du cytoplasme vers le milieu extracellulaire ou le phagosome semble différer d'un type de granule à l'autre. Les vésicules sécrétoires ont la plus grande propension à la libération vers le milieu extracellulaire, suivie des granules tertiaires, des granules spécifiques et enfin des granules azurophiles. Une stimulation des neutrophiles avec de faibles quantités de médiateurs inflammatoires comme le fMLP

mène à une libération rapide des vésicules sécrétoires, tandis que les autres types de granules sont mis à contribution seulement à de plus fortes concentrations ou à l'aide de médiateurs inflammatoires plus puissants (Edwards, 1994; Faurschou et Borregaard, 2003). Les voies de signalisation intracellulaire menant à la dégranulation sont complexes et ne sont pas complètement expliquées jusqu'ici. La mobilisation hiérarchique mentionnée des granules et des vésicules sécrétoires peut être reproduite *in vitro* en augmentant graduellement les niveaux de calcium intracellulaire, suite à une activation de certaines isoformes de PKC. Il semblerait que certaines annexines et protéines SNARE (pour « SNAP receptor ») soient impliquées dans le processus (Faurschou et Borregaard, 2003).

La flambée oxydative

La flambée oxydative implique l'activation de la NADPH oxydase, un complexe enzymatique composé de protéines cytosoliques (p40phox, p47phox et p67phox) et membranaires (p22phox et gp91phox, ou cytochrome b₅₅₈). Deux petites protéines liant la guanine sont impliquées : Rac2, liée à RhoGDI au niveau du cytoplasme, et Rap1A qui est pour sa part située à la membrane (figure 3, page 17). La séparation des composantes de la NADPH oxydase en deux groupes de composantes distribués dans des compartiments subcellulaires distincts garantit le fait que le complexe enzymatique est inactif lorsque le neutrophile est au repos. Lors de l'activation du neutrophile, il y a phosphorylation de p47phox et toutes les composantes cytosoliques de la NADPH oxydase migrent vers la membrane plasmique pour assembler l'oxydase active. Ce complexe enzymatique convertit l'oxygène en anions superoxydes (O₂⁻). Ce processus se nomme la flambée oxydative (Babior, 1999; Witko-Sarsat *et al*, 2000; Seely, Pascual et Christou, 2003; Sheppard *et al*, 2005).

La majorité des anions superoxydes sont dismutés en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Cependant, le peroxyde d'hydrogène est bactéricide seulement à de fortes concentrations et les anions superoxydes chargés négativement ne parviennent pas à défaire directement les membranes des bactéries (Hampton, Kettle et Winterbourn, 1998). Il y a alors une variété de molécules oxydantes générées qui contribuent à la capacité destructrice des neutrophiles. Il existe trois molécules intermédiaires entre la réduction de l'O₂ en H₂O,

soit l' O_2^- , l' H_2O_2 et les radicaux hydroxyles (OH^\cdot), qui sont formés par des additions successives d'électrons à la molécule (Babior, 1999; Witko-Sarsat *et al*, 2000; Seely, Pascual et Christou, 2003; Sheppard *et al*, 2005).

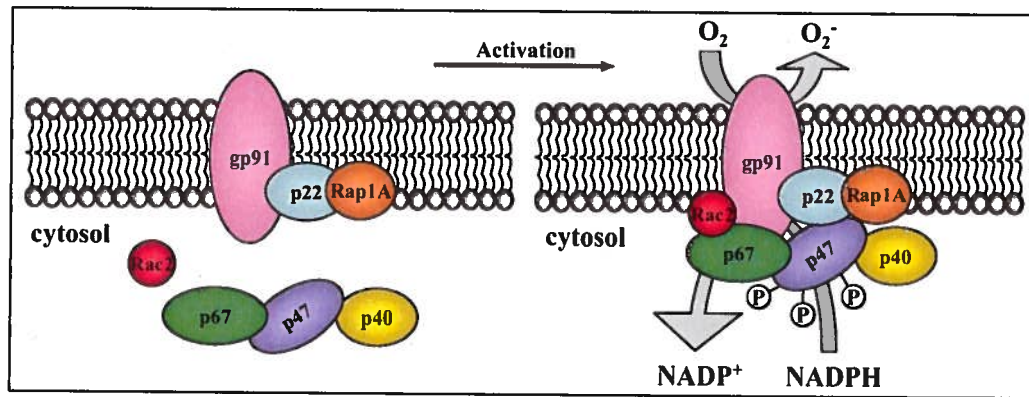


Figure 3 : Structure et activation de la NADPH oxydase. Les sous-unités sont assemblées pour former l'enzyme sous sa forme active et mener à la production d'anions superoxyde. (Inspirée de Babior, 1999; Sheppard *et al*, 2005).

La génération d'anions superoxydes, via l'activation de la NADPH oxydase, est le point de départ pour la formation d'une multitude de molécules dérivées attaquant la surface membranaire des micro-organismes, incluant les molécules oxydantes halogénées produites à l'aide de la MPO. Tel que mentionné auparavant, la MPO est une protéine présente dans les granules azurophiles des neutrophiles et des monocytes. Elle est libérée dans le phagolysosome ou le milieu extracellulaire lors de l'activation de la cellule. La MPO amplifie le pouvoir toxique du H_2O_2 en produisant des intermédiaires réactifs, principalement de l'acide hypochlorique ($HOCl$). Elle peut également mener à la production de radicaux tyrosines (Hampton, Kettle et Winterbourn, 1998; Witko-Sarsat *et al*, 2000). La « nitric oxide synthase » produit des intermédiaires réactifs, dérivés de l'azote. Ces réactifs comprennent notamment l'oxyde nitrique (NO), qui peut réagir avec l'oxygène pour former des molécules oxydantes beaucoup plus toxiques, comme le dioxyde d'azote (NO_2). La toxicité directe de l'oxyde nitrique est modeste, mais elle peut être grandement amplifiée en réagissant avec des anions superoxydes pour former de la peroxynitrite ($ONOO^-$). L'implication du NO dans les mécanismes anti-microbiens du neutrophile est toutefois discutable, du fait que cette cellule en produit très peu (Edwards, 1994; Hampton, Kettle et Winterbourn, 1998; Witko-Sarsat *et al*, 2000).

La présence de MPO dans les granules azurophiles constitue un bon exemple de la synergie qui existe entre les mécanismes de destruction des bactéries dépendants et indépendants de l'oxygène. Le cytochrome b_{558} , emmagasiné dans les vésicules sécrétoires et les granules spécifiques et tertiaires, en est un autre bon exemple. Certaines bactéries, comme *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*, peuvent être éliminées avec l'aide seulement du contenu des granules cytoplasmiques, tandis que d'autres demandent l'aide des radicaux libres, comme c'est le cas de *Staphylococcus aureus* (Edwards, 1994).

1.2.6. Apoptose, reconnaissance par les phagocytes et résolution de l'inflammation

La résolution de la réponse inflammatoire se fait principalement de trois façons : l'élimination du stimulus inflammatoire initial, la diminution de la quantité de médiateurs pro-inflammatoires et l'élimination des cellules et débris cellulaires impliquées dans le processus (Henson, 2005). Il y a alors apoptose des leucocytes impliqués dans la réponse et élimination subséquente des cellules apoptotiques par les phagocytes (Witko-Sarsat *et al*, 2000; Kobayashi et Deleo, 2004; Serhan et Savill, 2005). Il n'y a pas seulement les phagocytes professionnels, les macrophages et les cellules dendritiques, qui peuvent effectuer cette tâche. Les cellules des tissus environnants ont également la capacité de phagocyter les cellules apoptotiques. Cette élimination des cellules apoptotiques joue un rôle-clé dans la résolution de l'inflammation, puisqu'elle élimine les cellules inflammatoires et stimule la production de médiateurs anti-inflammatoires par les phagocytes (Henson, 2005; Majai, Petrovski et Fesus, 2006).

La baisse du taux de recrutement de neutrophiles est due, entre autres, à un changement de production de cytokines. Il y a modification de la proportion de cytokines pro-inflammatoires par rapport aux anti-inflammatoires sécrétées par les cellules des tissus et les leucocytes présents. Il y a également un retour des cellules endothéliales à l'état de repos, ce qui diminue l'expression de molécules d'adhésion à leur surface et par le fait même l'appel des leucocytes via les chimiokines (Witko-Sarsat *et al*, 2000).

Une des particularités du neutrophile est sa très courte durée de vie, qui peut se mesurer en termes d'heures (Webb *et al*, 2000; Henson, 2005). L'apoptose du neutrophile et sa

reconnaissance par les macrophages est le mécanisme-clé de la résolution de l'inflammation. Les neutrophiles perdent leurs propriétés fonctionnelles lors de l'apoptose (Whyte *et al*, 1993) et ils présentent les caractéristiques morphologiques et biochimiques d'une cellule apoptotique (Akgul, Moulding et Edwards, 2001). Durant le processus d'apoptose, le volume de la cellule diminue et devient plus dense, son ADN se fragmente et la chromatine se compacte pour former un noyau pyknotique. L'apoptose spontanée des neutrophiles implique des cascades protéolytiques, mettant en jeu des caspases, des calpaïnes et le protéasome. Les caspases représentent la principale machinerie de mort cellulaire, impliquée autant au niveau de l'apoptose induite via les récepteurs membranaires, que de celle induite via les mitochondries (Seely, Pascual et Christou, 2003; O'Neill *et al*, 2004). Elles inactivent notamment les protéines de protection contre l'apoptose et elles participent dans le désassemblage des structures cellulaires, incluant la réorganisation du cytosquelette et la désorganisation du noyau (Kothakota *et al*, 1997; Sanghavi *et al*, 1998; Seely, Pascual et Christou, 2003; Simon, 2003).

Les voies de signalisation apoptotiques du neutrophile entraînent l'activation de nombreuses kinases comme la PKC- δ , qui provoque une dissociation des protéines liées aux filaments d'actine et entraîne des modifications, entre autres, au niveau de la surface cellulaire. De plus, elle se rend au noyau où elle phosphoryle la lamine B, ce qui contribue au désassemblage de la lamina nucléaire et aux changements morphologiques du noyau (Webb *et al*, 2000). L'apoptose des neutrophiles peut être modulée par différentes molécules. Les médiateurs pro-inflammatoires, tels que les lipopolysaccharides (LPS) ou le « granulocyte macrophage-colony stimulating factor » (GM-CSF), retardent l'apoptose du neutrophile en augmentant la stabilité mitochondriale, en réduisant l'activation des caspases (principalement la caspase-3) et en augmentant l'expression de gènes anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (comme Mcl-1 et A1). L'inhibition de l'apoptose des neutrophiles est associée à un maintien de ses fonctions. À l'inverse, des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 accélèrent l'apoptose du neutrophile (Whyte *et al*, 1999; Witko-Sarsat *et al*, 2000; Seely, Pascual et Christou, 2003; Simon, 2003; O'Neill *et al*, 2004).

La phagocytose de neutrophiles apoptotiques induit une baisse de sécrétion de molécules pro-inflammatoires par les macrophages et la production de cytokines anti-inflammatoires telles que le « transforming growth factor- β 1 » (TGF- β 1) et l'IL-10 (Savill *et al*, 2002). De plus, les macrophages expriment à leur surface des molécules Fas ligand (FasL) et sécrètent des molécules de FasL solubles dans le milieu environnant. FasL réagit avec les récepteurs Fas à la surface des neutrophiles, ce qui induit leur apoptose (Witko-Sarsat, 2000; Albert, 2004). Les cellules apoptotiques participent également à la baisse de la réponse inflammatoire en produisant elles-mêmes des molécules anti-inflammatoires comme le TGF- β 1 et l'IL-10 (Savill *et al*, 2002; Majai, Petrovski et Fesus, 2006).

La reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques est un phénomène complexe impliquant une multitude de récepteurs à la surface du phagocyte, différentes molécules servant de pont entre le phagocyte et sa cible et de nombreux signaux à la surface de la cellule apoptotique (« eat-me signals ») (Fadok et Chimini, 2001; Savill *et al*, 2002; Majai, Petrovski et Fesus, 2006). Les « eat-me signals » présentés à la surface des cellules apoptotiques servent à être reconnus et éliminés par les phagocytes environnants (figure 4, page 21). Curieusement, bien que plusieurs récepteurs de reconnaissance des cellules apoptotiques aient été identifiés à la surface des phagocytes, peu de molécules de reconnaissance à la surface des cellules apoptotiques ont été découvertes jusqu'ici (Fadok et Chimini, 2001; Savill *et al*, 2002; Gardai *et al*, 2006). Certaines sont exprimées à la surface de la cellule seulement lorsque celle-ci est en apoptose. Par exemple, lors de l'apoptose, il y a perte d'asymétrie membranaire et exposition de phosphatidylsérines (PS) à la surface extracellulaire de la membrane plasmique. Cette exposition des PS serait une conséquence de l'inactivation de l'aminophospholipide translocase (Homburg *et al*, 1995; Gardai *et al*, 2006). Les « eat-me signals » peuvent également provenir de molécules présentes en tout temps à la surface cellulaire, mais qui subissent une légère modification dans leur structure, comme c'est le cas de ICAM-3/CD50 qui est modifié durant l'apoptose des leucocytes (Moffatt *et al*, 1999). D'autres molécules, comme le C1q, opsonisent la cellule apoptotique et servent de pont entre cette cellule et le phagocyte (Taylor *et al*, 2000). De plus, il existe des molécules, comme PECAM-1/CD31 (« don't eat-me signals »), qui agissent à la surface

de la cellule viable comme signal anti-phagocytaire, protégeant celle-ci d'une ingestion inopportune par les phagocytes environnants. Lors de l'apoptose, les signaux intracellulaires engendrés par la liaison du CD31 sont interrompus, ce qui permet à la cellule d'être phagocytée (Brown *et al*, 2002).

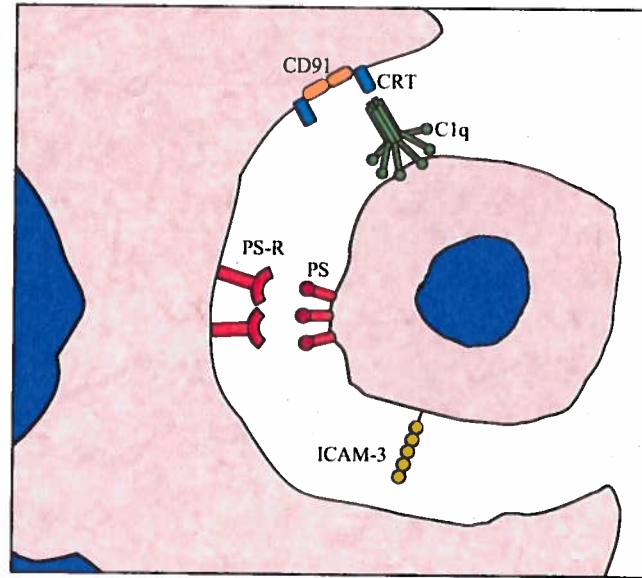


Figure 4 : Reconnaissance des cellules apoptotiques par les phagocytes. Certaines molécules à la surface de la cellule apoptotique (« eat-me signals ») sont reconnues par des récepteurs situés à la surface des phagocytes. CRT, calréticuline; PS, phosphatidylsérine; PS-R, récepteurs aux PS. (Inspirée de Savill *et al*, 2002).

Puisque la phagocytose efficace des cellules apoptotiques est essentielle au bon fonctionnement de l'organisme, il existe une redondance dans les molécules de reconnaissance impliquées. Cette redondance pourrait expliquer en partie la raison pour laquelle il existe peu d'études qui ont démontré un défaut au niveau de la phagocytose des cellules apoptotiques *in vivo* qui corroborent avec des études *in vitro* (Manfredi *et al*, 2002; Roos *et al*, 2004). Le C1q, premier élément de la cascade du complément, opsonise les cellules apoptotiques et interagit avec un complexe formé de la calréticuline (CRT) et du CD91 à la surface des phagocytes (Savill *et al*, 2002; Gardai *et al*, 2006). Il a été démontré que les souris déficientes en C1q ont de la difficulté à éliminer les cellules apoptotiques dans les reins, mais pas au niveau de la peau (Taylor *et al*, 2000; Pickering *et al*, 2001). Les souris déficientes en récepteur aux PS (PS-R) présentent une accumulation de cellules mortes dans les poumons et le cerveau, causant un développement anormal des animaux. Ces souris meurent de détresse respiratoire

quelques minutes après leur naissance. De plus, il a été démontré que le taux de phagocytose de cellules apoptotiques par les macrophages déficients en PS-R était diminué de moitié par rapport à des phagocytes normaux (Li *et al*, 2003; Kunisaki *et al*, 2004). Le rôle du PS-R dans la reconnaissance des cellules apoptotiques est toutefois contesté (Bose *et al*, 2004; Williamson et Schlegel, 2004).

Ces différences spécifiques à certains tissus et molécules nous indiquent la variabilité qu'il existe dans les mécanismes de phagocytose des cellules apoptotiques. Conséquemment, il est nécessaire d'effectuer des études approfondies sur les souris déficientes en diverses molécules impliquées dans les mécanismes de reconnaissance des cellules apoptotiques et dans l'élimination des auto-antigènes, au niveau de plusieurs tissus (Manfredi *et al*, 2002; Savill *et al*, 2002; Majai, Petrovski et Fesus, 2006). Le tableau 2 présente quelques études démontrant l'importance de l'élimination des cellules apoptotiques *in vivo*. Notons que l'élimination inappropriée des cellules apoptotiques peut mener à l'émergence de symptômes auto-immuns.

Tableau 2 : Études *in vivo* démontrant l'importance de certaines molécules dans l'élimination des cellules apoptotiques et débris cellulaires (inspiré de Roos *et al*, 2004).

| Molécules | Phénotypes des souris knockout | Références |
|-----------|---|--|
| Clq | Auto-immunité systémique avec auto-anticorps et glomérulonéphrite Quantité accrue de cellules apoptotiques dans les glomérules Diminution de l'élimination des cellules apoptotiques dans la cavité péritonéale | (Botto <i>et al</i> , 1998; Taylor <i>et al</i> , 2000) |
| SP-D | Diminution de l'élimination des cellules apoptotiques dans les poumons | (Vandivier <i>et al</i> , 2002) |
| C4 | Auto-immunité systémique avec auto-anticorps et glomérulonéphrite Diminution de l'élimination des cellules apoptotiques dans la cavité péritonéale | (Chen <i>et al</i> , 2000; Taylor <i>et al</i> , 2000) |
| SAP | Auto-immunité systémique avec auto-anticorps et glomérulonéphrite Accélération de la dégradation de la chromatine, réponse immune contre la chromatine | (Bickerstaff <i>et al</i> , 1999) |
| IgM | Auto-immunité contre des auto-antigènes nucléaires; dépôt d'IgG et de composantes du complément dans les reins | (Boes <i>et al</i> , 2000; Ehrenstein, Cook et Neuberger, 2000) |
| c-Mer | Auto-immunité contre des auto-antigènes nucléaires; dépôt d'IgG et de composantes du complément dans les reins Défaut dans l'élimination des cellules apoptotiques dans le thymus et la rate | (Scott <i>et al</i> , 2001; Cohen <i>et al</i> , 2002) |
| PS-R | Accumulation de cellules apoptotiques dans le cerveau et les reins Développement anormal et mort néonatale | (Li <i>et al</i> , 2003) |
| PECAM-1 | Auto-immunité systémique avec auto-anticorps et glomérulonéphrite | (Wilkinson <i>et al</i> , 2002) |

SP-D, Surfactant protein D; SAP, Serum amyloid P-component

Les neutrophiles apoptotiques montrent des altérations moléculaires à leur surface, qui donnent lieu à une modulation d'expression, une modification structurale ou à l'apparition de nouvelles molécules à la surface des cellules. Le tableau 3 (page 25)

présente quelques études identifiant la modulation d'expression de certaines molécules à la surface des neutrophiles apoptotiques. Il est à noter que certaines de ces études se contredisent, entre autres, au niveau de la modulation d'expression du CD11b (Dransfield, Stocks et Haslett, 1995; Jones et Morgan, 1995; Beinert *et al*, 2000) et du CD63 (Dransfield, Stocks et Haslett, 1995; Jones et Morgan, 1995; Hart *et al*, 2000). Ces différences pourraient découler de résultats obtenus selon des protocoles expérimentaux différents. Le rôle de ces changements membranaires n'est pas complètement défini, mais nous pouvons croire que certains offrent un mécanisme sécuritaire pour l'élimination des débris cellulaires, incluant la diminution de la réponse aux stimuli inflammatoires exogènes, la modification et la détoxification de certains constituants cellulaires (Dransfield, Stocks et Haslett, 1995; Jones et Morgan, 1995; Hart *et al*, 2000; Nusbaum *et al*, 2004). Il est difficile de déterminer si tous les changements encourus à la surface du neutrophile apoptotique servent à sa reconnaissance par les phagocytes environnants. Il semblerait que ce soit le cas d'ICAM-3/CD50 (Moffatt *et al*, 1999; Hart *et al*, 2000) et du FcγRII/CD32 (Vivers *et al*, 2004). Ce dernier acquiert, une fois l'apoptose initiée, la capacité de se lier aux complexes immuns, ce qui aide à la reconnaissance par les macrophages. Il a récemment été démontré que les neutrophiles apoptotiques sécrètent de l'annexine-1 dans le milieu extracellulaire, qui se fixe ensuite à la surface des cellules apoptotiques et qui est impliquée dans la reconnaissance par les macrophages (Scannell *et al*, 2007). Il est également intéressant de noter que l'expression des « don't eat-me signals », comme le CD31 et le CD47, est diminuée lors de l'apoptose des neutrophiles (Hart *et al*, 2000; Gardai *et al*, 2005; Guzik *et al*, 2007).

1.3. Désordres inflammatoires

L'intérêt de la recherche sur les mécanismes de l'inflammation vient du fait que ce processus est impliqué non seulement dans la protection de l'organisme contre les infections, mais aussi dans de nombreuses situations pathologiques. En effet, il existe un paradoxe dans la réponse inflammatoire : malgré le fait qu'elle soit essentielle au maintien de l'homéostasie, protégeant l'organisme contre les infections, elle peut également contribuer à endommager les tissus environnants durant le processus. L'inflammation prolongée est associée à de nombreuses maladies chroniques et à l'auto-

immunité (Henson, 2005). Les maladies auto-immunes représentent des désordres par lesquels le système immunitaire des patients réagit contre des auto-antigènes ou certains systèmes de l'organisme. Dans plusieurs de ces maladies, les tissus endommagés montrent des lésions indiquant la présence de réponse inflammatoire destructrice. Ces réactions se font par l'intermédiaire des cellules ou des anticorps du patient contre ses propres tissus (Williams, 2007).

Il existe une pénurie de connaissances sur la nature des événements responsables du déclenchement de maladies auto-immunes. Des auteurs proposent certaines hypothèses selon lesquelles des infections virales ou microbiennes induiraient l'auto-immunité en initiant une réponse immune croisée avec un auto-antigène de l'hôte. Des théories alternatives se basent sur le fait qu'il peut y avoir présence d'auto-immunité chez des animaux exempts de maladies antécédentes. De plus, il est possible de retrouver chez l'humain des lymphocytes B et T auto-réactifs, maintenus dans un état non pathogénique via des mécanismes régulateurs. Il se pourrait que l'apparition de l'auto-immunité soit la conséquence d'une chute de tels mécanismes de régulation (Mocci, Lafferty et Howard, 2000). Jusqu'ici, il semblerait que la prédisposition aux maladies auto-immunes dépend de plusieurs facteurs, notamment le bagage génétique (Savill *et al*, 2002). Malgré le fait que les mécanismes responsables d'une réponse immune contre des auto-antigènes ne soient pas totalement expliqués, il devient de plus en plus clair qu'il existe un lien entre l'élimination inappropriée des cellules apoptotiques et l'auto-immunité (Taylor *et al*, 2000; Manfredi *et al*, 2002; Savill *et al*, 2002). Il a été démontré que l'inoculation de cellules apoptotiques peut provoquer la production d'auto-anticorps chez la souris (Mevorach *et al*, 1998; Gensler *et al*, 2001). En outre, il semblerait que les événements protéolytiques engendrés lors de l'apoptose pourraient cliver et modifier plusieurs auto-antigènes, révélant des épitopes qui étaient auparavant dissimulés (Taylor *et al*, 2000). Chez la souris (tableau 2, page 22) et l'humain, l'élimination inefficace des cellules apoptotiques et de leur contenu est associée au développement de maladies auto-immunes comme le lupus systémique érythémateux.

Tableau 3 : Modulation de l'expression de certaines molécules à la surface des neutrophiles apoptotiques.

| Antigènes | Autres noms | Types de molécule, fonctions | Expression | Références |
|-----------|----------------------------------|--|---------------|--|
| CD11a | LFA-1 | β 2-intégrine (sous-unité α), adhésion | Baisse | (Dransfield, Stocks et Haslett, 1995; Jones et Morgan, 1995) |
| CD11b | MAC-1, CR3 | β 2-intégrine (sous-unité α), adhésion | Baisse | (Jones et Morgan, 1995; Beinert <i>et al.</i> , 2000) |
| CD11c | | β 2-intégrine (sous-unité α), adhésion | Hausse | (Dransfield, Stocks et Haslett, 1995) |
| CD13 | Aminopeptidase N | Protéine associée aux intégrines, maturation des protéines | Hausse | (Dransfield, Stocks et Haslett, 1995) |
| CD15 | Lewis | Glycoprotéine, adhésion | Baisse | (Hart <i>et al.</i> , 2000) |
| CD16 | Fc γ RIII | Récepteur phagocytaire | Baisse | (Dransfield, Stocks et Haslett, 1995; Homburg <i>et al.</i> , 1995; Hart <i>et al.</i> , 2000; Nusbaum <i>et al.</i> , 2004) |
| CD17 | Lactosylcéramide | Glycolipide | Baisse | (Hart <i>et al.</i> , 2000) |
| CD18 | β 2-intégrine | β 2-intégrine (sous-unité β), adhésion | Baisse | (Dransfield, Stocks et Haslett, 1995; Jones et Morgan, 1995) |
| CD31 | PECAM-1 | Membre de la superfamille des immunoglobulines, adhésion, " don't eat-me signal " | Baisse | (Hart <i>et al.</i> , 2000; Guzik <i>et al.</i> , 2007) |
| CD32 | Fc γ RII | Récepteur phagocytaire | Baisse | (Hart <i>et al.</i> , 2000) |
| CD35 | CR1 | Récepteur phagocytaire, régulation du complément | Baisse | (Dransfield, Stocks et Haslett, 1995; Jones et Morgan, 1995; Hart <i>et al.</i> , 2000) |
| CD43 | Leucosialine | Glycoprotéine | Baisse | (Dransfield, Stocks et Haslett, 1995; Nusbaum <i>et al.</i> , 2004; Nusbaum <i>et al.</i> , 2005) |
| CD46 | Membrane cofactor protein | Glycoprotéine, régulateur du complément, " don't eat-me signal " | Faible baisse | (Jones et Morgan, 1995; Elward <i>et al.</i> , 2005) |
| CD47 | | Protéine associée aux intégrines, " don't eat-me signal " | Baisse | (Gardai <i>et al.</i> , 2005) |
| CD50 | ICAM-3 | Membre de la superfamille des immunoglobulines, adhésion, " eat-me signal " | Baisse | (Hart <i>et al.</i> , 2000) |
| CD53 | | Glycoprotéine, signalisation intracellulaire | Hausse | (Beinert <i>et al.</i> , 2000) |
| CD55 | Decay accelerating | Glycoprotéine, régulateur du complément | Baisse | (Jones et Morgan, 1995) |
| CD59 | Protectine | Glycoprotéine, régulateur du complément | Baisse | (Jones et Morgan, 1995) |
| CD62L | L-sélectine | Glycoprotéine, adhésion | Baisse | (Dransfield, Stocks et Haslett, 1995; Beinert <i>et al.</i> , 2000) |
| CD63 | | Protéine associée aux intégrines, adhésion | Baisse | (Hart <i>et al.</i> , 2000) |
| | | | Hausse | (Beinert <i>et al.</i> , 2000) |
| CD65 | polysialyl-n-acetyllactosylamine | Glycoprotéine | Baisse | (Hart <i>et al.</i> , 2000) |
| CD66acde | | Membre de la superfamille des immunoglobulines, adhésion | Faible baisse | (Hart <i>et al.</i> , 2000) |
| CD66b | | Membre de la superfamille des immunoglobulines, adhésion | Faible baisse | (Hart <i>et al.</i> , 2000) |
| CD87 | uPAR | Protéine associée aux intégrines, interaction entre cellules, ligand à intégrines | Baisse | (Hart <i>et al.</i> , 2000) |
| CD88 | C5a-R | Récepteur de facteurs solubles, régulateur du complément | Baisse | (Hart <i>et al.</i> , 2000) |
| CD120b | TNF-R type2 | Récepteur de facteurs solubles, apoptose | Baisse | (Hart <i>et al.</i> , 2000) |

LFA-1, "Lymphocyte function-associated antigen-1"; MAC-1, "Macrophage-1 antigen"; CR3, "Complement receptor-3"; uPAR, "Urokinase plasminogen activator receptor"; CR1, "Complement receptor-1".

1.3.1. Les ANCA

Les neutrophiles peuvent constituer une importante source d'auto-antigènes. Les protéines contenues principalement dans les granules cytoplasmiques des neutrophiles sont reconnues pour être des antigènes-cibles pour les anticorps anti-cytoplasme de neutrophiles (« antineutrophil cytoplasmic antibodies » ou ANCA). Ces auto-anticorps sont présents dans plusieurs maladies auto-immunes, mais ils sont particulièrement associés à des vascularites systémiques comme la granulomatose de Wegener, la polyangéite microscopique et le syndrome de Churg-Strauss (Bartunkova, Tesar et Sediva, 2003). L'étiologie de ces types d'inflammation des vaisseaux sanguins est pour l'instant inconnue, mais il semblerait que la formation d'ANCA dépende à la fois de prédispositions génétiques et de facteurs environnementaux. À l'origine, les ANCA ont été divisés en deux groupes selon leur localisation en microscopie. Il y a les ANCA cytoplasmiques (C-ANCA) et les ANCA périmucléaires (P-ANCA). Ces deux localisations sont cependant artéfactuelles, puisqu'elles sont dues à la fixation à l'éthanol qui modifie leur positionnement intracellulaire. Les C-ANCA reconnaissent principalement la protéinase-3, tandis que l'antigène principal des P-ANCA est la MPO. Les ANCA peuvent également reconnaître d'autres protéines comme la lactoferrine, l'élastase et la cathepsine G (Witko-Sarsat *et al*, 2000; Bartunkova, Tesar et Sediva, 2003).

Les niveaux d'ANCA sont directement proportionnels au degré de sévérité de la maladie et il semblerait que ces auto-anticorps soient impliqués dans plusieurs étapes de la réponse inflammatoire. Il était à priori difficile de déterminer comment les ANCA parviennent à atteindre leur cible antigénique dans le cytoplasme. Il a été démontré, depuis, qu'il y a translocation de ces auto-antigènes vers la surface cellulaire lors de l'activation ou lors de l'apoptose du neutrophile (Gilligan *et al*, 1996; Bartunkova, Tesar et Sediva, 2003). La liaison des ANCA à leur antigène active les neutrophiles et provoque la flambée oxydative, la dégranulation et la production de cytokines pro-inflammatoires, créant des dommages à l'endothélium. Cette liaison a également pour effet d'inactiver les antigènes-cibles et, puisque ces derniers sont des enzymes impliquées dans la réponse microbicide, ceci compromet la capacité du neutrophile à éliminer les micro-organismes.

De plus, l'opsonisation des neutrophiles par les ANCA accélère leur apoptose et incite la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages qui les phagocytent via les récepteurs Fc (Bartunkova, Tesar et Sediva, 2003).

1.4. Le modèle de la poche d'air

Le modèle de la poche d'air fut décrit pour la première fois par Hans Selye (Selye, 1953). Ce modèle s'avère un bon outil pour étudier les mécanismes d'inflammation *in vivo*. Pour ce faire, de l'air stérile est injecté de manière sous-cutanée dans le dos d'un animal, typiquement un rat ou une souris, créant une cavité qui demeure stérile jusqu'à l'injection d'un stimulus pro-inflammatoire. Ce modèle permet d'effectuer des analyses de réactions inflammatoires synoviales puisqu'en aussi peu que six jours, la cavité dorsale développe une couche, composée majoritairement de macrophages et de fibroblastes, organisée de manière similaire à du tissu synovial. Cette cavité est hautement réactive aux stimuli inflammatoires, probablement grâce à sa couche cellulaire agissant comme une barrière mécanique empêchant la dispersion de l'irritant injecté et à une forte vascularisation sous les macrophages et fibroblastes tapissant la poche (Edwards, Sedgwick et Willoughby, 1981; Sedgwick *et al*, 1984; Schiltz *et al*, 2002). L'inflammation créée dans ce modèle se résorbe spontanément par un mécanisme qui demeure pour l'instant inconnu (Serhan et Savill, 2005).

Ce modèle comporte plusieurs avantages (Tessier *et al*, 1997). En effet, il est facilement reproductible, il permet de varier le type de molécule injecté dans la poche d'air et de vérifier sa capacité à induire une réaction inflammatoire. De plus, les leucocytes migrant dans la poche peuvent être facilement récoltés, quantifiés et identifiés. En outre, les médiateurs chimiques produits durant la réponse inflammatoire demeurent dans la poche et peuvent être récoltés et quantifiés. Enfin, suite à l'injection d'un puissant agent pro-inflammatoire comme le LPS, il s'agit d'une des méthodes les plus efficaces permettant d'obtenir la plus grande quantité possible de neutrophiles chez la souris. Cette technique permet donc de récolter des neutrophiles murins afin d'étudier certaines de leurs fonctions *ex vivo*.

2. LE CYTOSQUELETTE

Le cytosquelette est composé de trois types de filaments : les microfilaments (MF), les filaments intermédiaires (FI) et les microtubules (MT) (figure 5) (Alberts, 1994). Ce réseau dynamique de protéines joue un rôle important dans le maintien de la structure et l'organisation cellulaire. De plus, le cytosquelette confère à la cellule un certain degré de plasticité afin d'accomplir de nombreuses fonctions telles la diapédèse, le chimiotactisme, la phagocytose et la division cellulaire. La translocation d'organelles et de vésicules cytoplasmiques, le mouvement de protéines cytosoliques, la dégranulation et la régulation de récepteurs sont toutes des fonctions qui sont intimement associées à des changements au niveau de l'organisation du cytosquelette (Rogers, Morris et Blake, 1992; Edwards, 1994).

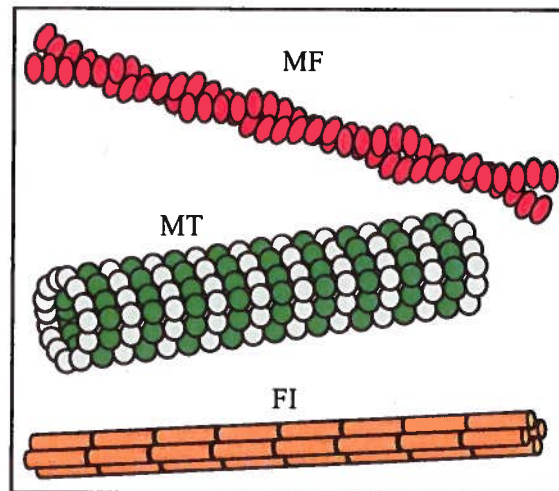


Figure 5 : Types de filaments formant le cytosquelette. Ce réseau est composé de trois types de filaments, soit les microfilaments (MF), les filaments intermédiaires (FI) et les microtubules (MT). (Inspirée de Alberts, 1994).

2.1. Les microfilaments

Les MF, dont le diamètre est d'environ 7 nm, sont probablement les composantes les plus dynamiques du cytosquelette. Ils sont directement impliqués dans toute forme de mouvement cellulaire. La morphologie cellulaire est contrôlée par des étapes de contraction et relaxation des MF, ce qui génère la force mécanique nécessaire au mouvement cellulaire. Cette force est attribuée par l'association avec des protéines motrices comme la myosine (Vicente-Manzanares et Sanchez-Madrid, 2004; Disanza *et*

al, 2005). Les MF sont retrouvés principalement sous la membrane plasmique et dans les régions de la cellule impliquées dans la phagocytose et la formation de pseudopodes (Alberts, 1994; Edwards, 1994). Les MF, qui existent sous la forme d'hélices double-brin, sont issus de l'assemblage de monomères d'actine, une des protéines les plus abondantes de nombreuses cellules eucaryotes. Les filaments d'actine (F-actine) existent en équilibre avec l'actine sous sa forme monomérique soluble (G-actine). Les filaments d'actine sont polaires, ayant des extrémités différentes quant à leur constante d'attachement aux monomères d'actine. Cette différence, générée par la capacité de l'actine à se lier et hydrolyser l'ATP, donne une polarité physique au filament. La formation de filaments se fait en deux étapes : la nucléation (formation d'un dimère d'actine) et l'élongation (addition de monomères d'actine au site de nucléation). Le contrôle de la formation des filaments se fait à deux niveaux, soit au niveau de la longueur des filaments et au niveau du taux de ramifications entre les filaments (Rogers, Morris et Blake, 1992; Cicchetti, Allen et Glogauer, 2002; Disanza *et al*, 2005).

Chez le neutrophile au repos, environ 50 à 70% du pool d'actine est, sous sa forme monomérique, diffusé dans tout le cytoplasme. Cette distribution procure un avantage, puisque la formation de filaments d'actine peut rapidement avoir lieu aux endroits cellulaires requis. L'actine polymérisée chez les cellules au repos se situe principalement près de la membrane plasmique, avec quelques filaments présents entre le cortex et le noyau. La stimulation des neutrophiles par différents agents active la polymérisation rapide de l'actine (Edwards, 1994).

Il existe de nombreuses protéines associées aux MF (« microfilament associated proteins » ou MFAP) qui jouent un rôle important dans la régulation de la formation, l'organisation spatiale et l'ancrage des MF. La coordination et l'intégration des activités des MFAP sont essentielles au contrôle de la polymérisation directionnelle de l'actine *in vivo* (Rogers, Morris et Blake, 1992; Winder et Ayscough, 2005). Le rôle joué par ces différentes protéines est varié. Par exemple, la myosine se lie à la F-actine et cause la contraction nécessaire au mouvement vectoriel. La gelsoline bloque l'extrémité positive des filaments d'actine, ce qui prévient l'élongation du filament à cette extrémité. De plus, elle solidifie les liens actine-actine et peut diviser des filaments existants. Il semblerait

que la paxilline joue le rôle d'adaptateur moléculaire, responsable du recrutement de molécules structurales et de signalisation aux sites d'adhésion focale. La vinculine, pour sa part, regroupe et ancre la F-actine à la membrane plasmique, fortement associée à l' α -actinine. L'action de ces différentes MFAP est régulée par plusieurs voies de signalisation permettant à la cellule de répondre aux divers stimuli externes (Edwards, 1994; Winder et Ayscough, 2005).

2.2. Les microtubules

Les MT ont un diamètre d'environ 25 nm et forment de longues structures tubulaires résultant de l'association de deux sortes de protéines, soit l' α - et la β -tubuline. Les parois du cylindre sont faites d'éléments linéaires, nommés protofilaments, qui sont formés à partir des sous-unités de tubuline alignées en rangées (Rogers, Morris et Blake, 1992). Les MT sont des structures polaires, c'est-à-dire que la formation des filaments se fait beaucoup plus rapidement d'un côté (l'extrémité positive) que de l'autre (l'extrémité négative). Comme les MF, la formation des MT se fait en deux étapes : nucléation et élongation. Chez la plupart des cellules, l'extrémité négative est attachée au centrosome près du noyau (Alberts, 1994). La quantité de MT chez le neutrophile au repos est estimée être autour de 11 à 23 par cellule, avec environ 35 à 40% du pool de tubuline assemblé. Le reste de molécules de tubuline peut s'assembler très rapidement lors de l'activation du neutrophile (Edwards, 1994).

Les MT irradient à travers le cytoplasme, à partir du noyau jusqu'à la membrane plasmique, et sont intimement associés au réticulum endoplasmique et à l'appareil de Golgi. Ils jouent donc un rôle important dans le transport vésiculaire et lors de l'endocytose et l'exocytose (Rogers, Morris et Blake, 1992). Les MT jouent un rôle dans le maintien des MF et sont impliqués lors du mouvement cellulaire, la translocation d'organelles et autres molécules, le transport vésiculaire et l'établissement du fuseau mitotique (Rogers, Morris et Blake, 1992; Edwards, 1994). Les MT joueraient un rôle lors de la sécrétion et la translocation de vésicules phagocytiques de la périphérie du neutrophile vers des régions plus centrales du cytoplasme (Edwards, 1994).

2.3. Les filaments intermédiaires

Le nom des FI vient du fait que ces filaments ont un diamètre situé entre les MF et les MT, soit d'environ 10 nm. Les FI sont plus robustes que les MF et les MT et, puisque les FI sont incapables de se dissocier de certaines structures cellulaires, il semblerait que ces filaments soient principalement impliqués dans le maintien mécanique des principales structures cellulaires (Edwards, 1994; Vicente-Manzanares et Sanchez-Madrid, 2004). Malgré leur grande diversité, toutes les protéines des FI ont une structure moléculaire semblable, composée de trois domaines : la région N-terminale variable, la portion centrale hautement conservée en hélice α et la région C-terminale variable. Les portions terminales sont variables en homologie de séquence et en dimension et distinguent la protéine par rapport aux autres (Rogers, Morris et Blake, 1992; Fuchs et Cleveland, 1998). Les FI se subdivisent en cinq sous-types basés sur des homologies de séquences entre les protéines qui les composent (tableau 4, page 32). Le type I regroupe les kératines acides, tandis que les kératines de type II sont plus basiques. Des paires de kératines de types I et II sont exprimées différenciellement chez la plupart des cellules épithéliales. Les FI de type III comprennent la vimentine, la desmine, la GFAP (« glial fibrillary acidic protein ») et la péroxydase. Les neurofilaments font partie du type IV et les FI de type V sont composés de lamines. Les lamines sont les protéines formant la lamina nucléaire située à la surface interne de la membrane nucléaire (Fuchs et Weber, 1994; Coulombe *et al*, 2001; Paramio et Jorcano, 2002).

2.3.1. Les lamines

L'enveloppe nucléaire est une structure complexe qui sépare le nucléoplasme du cytoplasme et enveloppe la chromatine. Elle est composée de deux membranes nucléaires (interne et externe), de complexes de pores nucléaires et de la lamina nucléaire (Vleck, Dechat et Foisner, 2001). La lamina nucléaire est un réseau fait principalement de protéines des FI, nommées les lamines. La lamina se concentre près de la membrane interne du noyau et les lamines se ramifient dans tout le noyau en association avec la chromatine (Wolfner et Wilson, 2001). Les lamines nucléaires sont reliées aux FI cytoplasmiques et ont la structure moléculaire typique des FI. Les portions terminales de

la protéine ne sont pas très conservées par rapport aux autres types de FI et la portion c-terminale contient une séquence de localisation nucléaire pour le transport nucléaire et un site de liaison à la chromatine (Moir et Spann, 2001).

Tableau 4 : Classification des filaments intermédiaires (Rogers, Morris et Blake, 1992).

| Types de FI | Noms | Expression |
|-------------|------------------------------------|----------------------------------|
| I | Kératines acides (K9 à K20 et K23) | Cellules épithéliales |
| | Kératines de cheveux (Ha1 à Ha4) | Cheveux |
| II | Kératines basiques (K1 à K8) | Cellules épithéliales |
| | Kératines de cheveux (Hb1 à Hb6) | Cheveux |
| III | Vimentine | Cellules du mésenchyme |
| | Desmine | Cellules musculaires |
| | GFAP | Cellules gliales, astrocytes |
| | Périphérine | Système nerveux périphérique |
| IV | Neurofilaments | Axones et dendrites des neurones |
| V | Lamines A/C | Noyau de certaines cellules |
| | Lamines B | Noyau de toutes les cellules |

Chez les vertébrés, il existe de trois à quatre séquences génomiques codant pour différents types de lamines. Il existe deux classes de lamines, les lamines de type A et celles de type B, qui sont exprimées différemment durant le développement et la différenciation des cellules (Holmer et Worman, 2001; Moir et Spann, 2001). Les lamines de type B sont exprimées constitutivement, alors que celles de type A sont exprimées plus tardivement dans le développement. L'épissage alternatif des gènes de lamines augmente la variété de lamines produites, certaines ayant des fonctions spécifiques aux tissus. L'attachement des lamines à la membrane nucléaire interne implique plusieurs mécanismes et diffère selon le types de lamines. Les lamines B possèdent une séquence dans leur portion c-terminale servant à l'ancrage dans la membrane. Cet attachement est solidifié par la liaison à des protéines membranaires telles que le récepteur aux lamines B (LBR pour « lamin-B receptor ») et la « lamina-associated polypeptide2- β » (LAP2 β). Les lamines de type A sont reliées à la membrane de façon beaucoup moins stable et leur attachement dépendrait de la présence des lamines B et de leur liaison à des protéines telles que LAP1 (Vleck, Dechat et Foisner, 2001).

Les lamines A et C sont identiques, excepté que la lamine A a une région unique de 90 acides aminés dans la portion c-terminale, tandis que la lamine C a une séquence unique de 6 acides aminés dans la même portion. Ces deux isotypes de lamines sont habituellement exprimés en quantités approximativement équivalentes chez les cellules

somatiques différenciées. Il existe deux types de lamines B chez les humains, soit la lamine B₁ et la lamine B₂, qui sont encodées par différents gènes situés sur les chromosomes 5 et 19 respectivement. Ces deux isotypes sont exprimés à des ratios variés selon les différents types de tissus (Moir et Spann, 2001). Des types de lamines spécifiques aux cellules spermatiques, les lamines C₂ et B₃, ont été identifiées chez les rongeurs. Il semblerait que ces deux protéines jouent un rôle dans la forme nucléaire distinctive, observée chez les cellules spermatiques, et qu'elles soient présentes également chez l'humain (Moir et Spann, 2001; Schutz *et al*, 2005).

La lamina nucléaire est principalement impliquée dans le support de la membrane nucléaire et dans la détermination de la structure et la résistance mécanique du noyau. L'organisation des lamines est également impliquée dans la réplication de l'ADN, probablement via son maintien de l'intégrité de l'enveloppe nucléaire, nécessaire au déplacement efficace des facteurs de réplication de l'ADN. Les lamines pourraient également influencer l'organisation de la chromatine, ce qui affecte les processus nucléaires. Il a été suggéré que les lamines nucléaires auraient un rôle à jouer dans la transcription de l'ADN, puisque des changements d'expression des lamines peuvent influencer l'expression des gènes (Moir et Spann, 2001).

Durant la différenciation des neutrophiles, il y a segmentation du noyau produisant le noyau polylobé, typique à ces cellules. Bien que les cellules mononucléées possèdent des lamines de type A et B, les neutrophiles matures n'ont pas de lamines A/C et possèdent seulement de la lamine B₁ et B₂. Lors de la différenciation de la lignée de cellules promyélocytiques humaines HL-60 en neutrophiles, il y a baisse d'expression des lamines A/C tandis que les niveaux de lamines B restent stables (Yabuki *et al*, 1999). L'anomalie de Pelger-Huët est un défaut héréditaire, caractérisé par une forme nucléaire anormale des granulocytes sanguins. Il a été observé que les neutrophiles de patients souffrant de cette maladie ont un noyau ovoïde hyposegmenté, une organisation anormale de la chromatine et une plus faible activité de la caspase-6, une enzyme reconnue pour cliver les lamines A/C (Yabuki *et al*, 1999; Hoffmann *et al*, 2002). Des mutations dans le gène codant pour le LBR ont été découvertes chez les personnes atteintes de l'anomalie de Pelger-Huët et la faible expression du LBR affecte la morphologie nucléaire et la distribution de la

chromatine (Hoffmann *et al*, 2002). Chez les HL-60 différenciés en neutrophiles, la caspase-6 est davantage activée que chez les cellules non différenciées (Yabuki *et al*, 1999). Toutes ces observations nous permettent de croire que la forme polylobée des noyaux de neutrophiles serait due, entre autres, à l'augmentation de la déformabilité de l'enveloppe nucléaire résultant d'une déficience en lamines A/C et à une augmentation des interactions entre l'enveloppe nucléaire et la chromatine, liée à une forte expression du LBR (Olins *et al*, 2001; Olins et Olins, 2004; Hoffmann *et al*, 2007).

2.3.2. La vimentine

La vimentine est produite par les cellules qui proviennent du mésenchyme (fibroblastes, cellules endothéliales, monocytes-macrophages, lymphocytes et granulocytes) de même que par une variété de lignées de cellules transformées et de tumeurs. Elle est la protéine la plus largement exprimée de tous les FI de type III. Les filaments de vimentine forment des associations avec les autres composantes du cytosquelette, contribuant à l'organisation subcellulaire, et semblent former dans plusieurs types cellulaires des associations avec les lamines nucléaires. Une fonction importante reconnue des filaments de vimentine est la protection mécanique de la cellule contre le stress physique (Evans, 1998). En conséquence, le démantèlement des FI serait nécessaire à l'augmentation du niveau de déformabilité requis à l'extravasation. Il a été démontré que la redistribution des FI de vimentine est un événement fondamental lors de la polarisation du lymphocyte. Les filaments de vimentine sont démantelés et réorganisés en un agrégat qui se concentre dans l'uropode (Brown *et al*, 2001).

Il est de plus en plus reconnu que la vimentine joue un rôle dans l'organisation de protéines impliquées dans plusieurs fonctions critiques comme l'adhésion, la migration et la signalisation intracellulaire allant de la membrane plasmique au noyau de la cellule (Paramio et Jorcano, 2002; Ivaska *et al*, 2007). Des études chez les cellules endothéliales ont démontré que la vimentine jouerait un rôle dans l'adhésion cellulaire en régulant l'affinité des intégrines pour leur ligand et l'architecture des sites d'adhésion (Gonzales *et al*, 2001; Tsuruta et Jones, 2003). La vimentine a été observée à l'intérieur des

podosomes de macrophages adhérents et il semblerait également qu'elle soit un joueur important dans le transport vésiculaire (Ivaska *et al*, 2007).

La vimentine est impliquée dans la signalisation intracellulaire, entre autres, par son interaction avec diverses molécules de signalisation. Ces interactions peuvent modifier les propriétés et la disposition des protéines intermédiaires de signalisation et, en particulier, affecter leur distribution cellulaire (Paramio et Jorcano, 2002). Il a été démontré que la vimentine peut se lier avec de nombreuses kinases, entre autres, les isoformes β - et δ - de la PKC (Owen, Johnson et Lord, 1996), la kinase dépendante du GMP cyclique (G-kinase) (Pryzwansky, Wyatt et Lincoln, 1995), la kinase dépendante de l'AMPc et la kinase p34^{cdc2} (Chou, Ngai et Goldman, 1991). La vimentine peut également interagir avec les GTPases Rac1 et Cdc42 (Meriane *et al*, 2000) et la protéine phosphatase 2A (Turowski *et al*, 1999). La vimentine est une protéine pouvant être phosphorylée à plusieurs résidus sérines/thréonines et ces événements de phosphorylation mènent au démantèlement des filaments de vimentine. Les phosphatases ont, à l'inverse, pour effet d'accélérer la formation des filaments (Evans, 1998; Sihag *et al*, 2007).

Chez les neutrophiles, les filaments de vimentine se dispersent dans le cytoplasme autour des lobes du noyau. La différenciation de cellules NB4, une lignée promyélocytaire, en neutrophiles induit une diminution des niveaux de vimentine et remodèle le réseau de FI, pour ainsi modifier les propriétés mécaniques du cytoplasme. La redistribution des filaments de vimentine chez ces cellules permet une plus grande facilité de déplacement à travers une membrane poreuse par chimiotactisme. Ceci nous suggère que l'expression et l'architecture de la vimentine sont contrôlées durant la différenciation des neutrophiles pour réguler les propriétés mécaniques de ces cellules et ainsi faciliter les compressions latérales, nécessaires lors de la diapédèse (Bruel *et al*, 2001).

La vimentine est phosphorylée par la PKC, suite à une stimulation des neutrophiles par le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Huang, Devanney et Kennedy, 1988). Les études les plus poussées sur les FI de vimentine chez les neutrophiles activés ont été réalisées en stimulant les cellules avec du fMLP. L'activation par le fMLP stimule la dégranulation, augmente l'adhésion des cellules et, par le fait même, les niveaux intracellulaires de

calcium et de GMP cyclique. La G-kinase est alors colocalisée avec la vimentine dans le péricortex et l'uropode de la cellule polarisée. Cette colocalisation mène à la phosphorylation et à la réorganisation des filaments de vimentine (Wyatt, Lincoln et Pryzwansky, 1991). Le même effet a été observé en stimulant les neutrophiles avec un ionophore de calcium (Pryzwansky, Wyatt et Lincoln, 1995). Lors de la dégranulation, il y a dissolution des filaments d'actine dans le cortex et assemblage transitoire des FI dans les régions dépourvues de granules, ce qui pourrait permettre le mouvement des granules, dirigé par les MT vers la membrane plasmique (Pryzwansky et Merricks, 1998). Il est à noter que la vimentine a été récemment identifiée dans le protéome des granules spécifiques, tertiaires (Lominadze *et al*, 2005) et azurophiles (Lominadze *et al*, 2005; Feuk-Lagerstedt *et al*, 2007). Les FI de vimentine seraient donc impliqués dans la modulation de l'architecture et l'organisation cytoplasmique, aussi bien que dans la stabilisation de la membrane plasmique et du noyau contre le stress qui survient lors des changements morphologiques du neutrophile activé (Pryzwansky et Merricks, 1998).

2.4. Rôle du cytosquelette dans les maladies auto-immunes

Des auto-anticorps dirigés contre les protéines du cytosquelette sont retrouvés dans plusieurs cas de maladies auto-immunes. La plupart de ces auto-anticorps ciblent des protéines des FI (Varon *et al*, 1990; Rogers, Morris et Blake, 1992). L'injection de cellules T Jurkat apoptotiques dans des souris provoque la production d'auto-anticorps, dont des auto-anticorps anti-vimentine (Gensler *et al*, 2001). Des auto-anticorps dirigés contre les FI, incluant la vimentine, ont été retrouvés chez des modèles expérimentaux d'arthrite chez le rat et chez des patients humains souffrant de cette maladie (Franch *et al*, 1994). Il a été démontré que le sérum de patients souffrant de lupus systémique érythémateux contient des auto-anticorps dirigés contre la vimentine et l'ADN nucléaire (Sanchez *et al*, 1990; Thebault *et al*, 2002). Des auto-anticorps anti-lamine B sont retrouvés dans plusieurs cas de maladies auto-immunes (Nesher, Margalit et Ashkenazi, 2001), notamment dans les cas de lupus (Reeves *et al*, 1987; Guilly *et al*, 1987; Reeves et Ali, 1989; Dieude *et al*, 2002). L'origine de ces auto-anticorps est inconnue; mais quelques études récentes ont démontré que plusieurs types de cellules peuvent exprimer

certaines protéines du cytosquelette à leur surface, ce qui pourrait expliquer l'émergence des auto-anticorps anti-cytosquelette.

2.4.1. Expression à la surface de cellules

Vimentine

La vimentine a été observée à la surface de quelques types cellulaires sous différentes conditions. Il a été démontré que, lorsque des macrophages humains sont activés, il y a phosphorylation de la vimentine par la PKC, ce qui a pour effet de stimuler l'expression de la protéine à la surface et sa sécrétion dans le milieu extracellulaire. Ce processus peut être modulé par des cytokines : l'IL-10 (une cytokine anti-inflammatoire) a pour effet de diminuer la sécrétion de la protéine, tandis que le TNF- α (une cytokine pro-inflammatoire) augmente la sécrétion de la vimentine. De plus, la vimentine extracellulaire facilite la destruction des bactéries et la génération de radicaux libres, deux fonctions importantes des macrophages activés (Mor-Vaknin *et al*, 2003).

La vimentine est exprimée à la surface des plaquettes activées, où elle se lie, via sa portion amino-terminale, à un complexe formé de la vitronectine et de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (« plasminogen activator inhibitor ») de type 1. Ceci suggère que la vimentine serait impliquée dans la régulation de la fibrinolyse dans le plasma et les caillots sanguins (Podor *et al*, 2002).

L'équipe de Boilard (2003) a démontré que les lymphocytes T humains apoptotiques expriment la vimentine à leur surface. En déterminant la spécificité de différents anticorps anti-vimentine, ils ont observé que les portions centrales et carboxy-terminales étaient exprimées à la surface des cellules. La vimentine partiellement exprimée à la surface cellulaire se lie à la phospholipase A₂ sécrétée du groupe IIA, une enzyme impliquée dans les processus inflammatoires. Les auteurs n'ont cependant pas déterminé si la vimentine contribue à réguler l'activation de la phospholipase afin qu'elle hydrolyse des phospholipides membranaires lors de l'inflammation.

Il semblerait qu'une population de cellules endothéliales exprime la vimentine à leur surface et qu'une partie soit sécrétée dans le sang. La vimentine fut identifiée par la

recherche de l'antigène reconnu par l'anticorps PAL-E, un anticorps utilisé dans la distinction entre les cellules endothéliales provenant des vaisseaux sanguins et celles provenant des vaisseaux lymphatiques. Les auteurs de cette étude ont suggéré que la vimentine à la surface des cellules endothéliales serait impliquée lorsque les leucocytes traversent l'endothélium pour quitter la circulation sanguine (Xu *et al*, 2004). Ces observations sont toutefois incertaines, puisque l'identité de la vimentine à la surface des cellules endothéliales a été contestée dans une étude ultérieure (Niemela *et al*, 2005).

Les neutrophiles peuvent générer des radicaux tyrosyles suite à une activation par le PMA, l'interferon- γ (IFN- γ) ou le TNF- α . Ces radicaux agissent de façon autocrine en se liant à des protéines exposées à la surface du neutrophile. Les protéines tyrosylées sont initialement localisées à la surface cellulaire, internalisées puis dégradées. Il est intéressant de constater que la vimentine a été identifiée parmi les protéines tyrosylées et que celle-ci était phosphorylée dans sa portion carboxy-terminale. Il a été suggéré que la phosphorylation de la vimentine serait nécessaire à sa translocation à la membrane plasmique. Les auteurs de cette étude n'ont cependant pas démontré directement la présence de la vimentine à la surface des neutrophiles (Avram *et al*, 2004).

Vinculine

La lignée de lymphocytes T H9 exprime de la vinculine à sa surface et la quantité de la protéine dans le cytoplasme augmente lors de l'apoptose induite par des anticorps anti-CD95 ou par de l'etoposide. La présence d'inhibiteurs de caspases avait pour effet de diminuer la surexpression de la vinculine et d'empêcher son expression à la surface cellulaire. De plus, il a été démontré que la surexpression de la vinculine était due à une synthèse *de novo* de la protéine durant l'apoptose des cellules. La même observation a été obtenue avec différentes lignées de cellules B et de fibroblastes, ce qui suggère que la surexpression de la vinculine et son expression à la surface cellulaire serait un événement commun à plusieurs types de cellules apoptotiques. L'inhibition de l'expression de la vinculine n'a cependant eu aucun effet sur l'apoptose des cellules, ce qui indique que la protéine n'est pas essentielle à la machinerie apoptotique (Propato *et al*, 2001).

Autres protéines

Il a été démontré que l'actine et la tubuline sont présentes à la surface de lymphocytes transformés, mais non chez les lymphocytes normaux au repos (Bachvaroff, Miller et Rapaport, 1980). Les deux mêmes protéines ont été détectées à la surface des U937 non stimulés, une lignée de cellules monocytaires. Une fois activées, ces cellules exprimaient une plus faible quantité des deux protéines du cytosquelette à leur surface. La vimentine ne fut aucunement détectée à la surface des U937 non stimulés (Por *et al*, 1991). Le rôle joué par ces deux protéines à la surface des cellules n'est toutefois pas expliqué jusqu'ici. Un récepteur aux kininogènes de haut poids moléculaire à la surface des cellules endothéliales humaines a été identifié comme étant de la cytokératine 1, une protéine des FI (Hasan, Zisman et Schmaier, 1998; Shariat-Madar, Mahdi et Schmaier, 1999). La cytokératine 8 fut découverte à la surface de lignées de cellules épithéliales de cancer du sein. La protéine joue le rôle de récepteur aux plasminogènes (Hembrough, Li et Gonias, 1996). La cytokératine 18 se retrouve à la surface des hépatocytes (Wells *et al*, 1997).

2.4.2. Citrullination des protéines

La citrullination consiste en la modification post-traductionnelle de l'acide aminé arginine constituant certaines protéines en citrulline. Ce changement modifie la masse moléculaire de la protéine et lui fait perdre une charge positive. Bien que le rôle physiologique de la citrullination reste à déterminer, il a été proposé que ce mécanisme joue un rôle important dans le déploiement des protéines intracellulaires afin de les rendre plus accessibles à la dégradation par les protéases durant l'apoptose. Il semblerait également que la citrullination des histones serve à la régulation de la transcription (van Gaalen *et al*, 2005). Cinq enzymes sont responsables de la conversion de l'arginine en citrulline, soit les peptidylarginine déiminases (PAD). Les différentes PAD, PAD1-4 et PAD6, sont distribuées dans divers tissus. Les monocytes et les granulocytes expriment PAD4, tandis que les macrophages expriment PAD2 et PAD4 (Vossenaar *et al*, 2004; Migliorini *et al*, 2005; van Gaalen *et al*, 2005). Les PAD ne sont activées que lorsque le niveau de calcium intracellulaire augmente considérablement, par exemple, lors de l'apoptose des cellules.

Il existe une forte association entre la production d'auto-anticorps anti-protéines citrullinées et le développement de polyarthrite rhumatoïde (PR). Un test sérologique, qui consiste à détecter la présence d'anticorps anti-protéines citrullinées, a été développé récemment afin de diagnostiquer la PR. On peut également retrouver des plasmocytes sécrétant ces auto-anticorps et des antigènes citrullinés (comme le fibrinogène, des kératines et la vimentine citrullinés) dans les articulations de patients (van Gaalen *et al*, 2005). La recherche de nouveaux auto-anticorps et de leurs molécules cibles ont mené à la découverte des auto-anticorps anti-Sa. Les anti-Sa ont une haute spécificité (92-98%) et une bonne valeur prédictive (84-99%) dans le diagnostic de la PR. L'antigène Sa a été identifié comme étant de la vimentine citrullinée (Menard *et al*, 2000; Vossenaar *et al*, 2004). Les niveaux d'anti-Sa/vimentine citrullinée sont corrélés au taux d'érosion des structures articulaires chez les patients. La vimentine citrullinée contient plusieurs résidus citrulline, ce qui implique que plusieurs épitopes seraient disponibles aux auto-anticorps (Rodriguez-Mahou *et al*, 2006).

Il a été démontré, autant chez la souris (Asaga, Yamada et Senshu, 1998) que chez l'humain (Vossenaar *et al*, 2004b), qu'il y avait citrullination spécifique de la vimentine durant l'apoptose des macrophages, induite par un ionophore de calcium. De plus, cette vimentine citrullinée est dégradée dans le temps. L'expression de PAD4 a été observée chez les cellules de différentes lignées hématopoïétiques, incluant les neutrophiles, provenant de synovia de patients atteints de PR (Chang *et al*, 2005). Le niveau d'expression des différentes PAD est sensiblement le même chez des personnes atteintes de PR par rapport à des personnes normales. La différence résiderait probablement dans le fait que les personnes atteintes de PR ont davantage de leucocytes dans le liquide synovial, ce qui augmenterait considérablement la quantité de PAD et, ainsi, la probabilité d'obtenir une plus grande quantité de protéines citrullinées comme la vimentine (Vossenaar *et al*, 2004b).

2.5. Rôle du cytosquelette dans l'apoptose

Tous les changements cellulaires caractéristiques de l'apoptose dépendent, en autres, de la réorganisation du réseau du cytosquelette. La phosphorylation et le clivage

protéolytique de plusieurs composantes de ce réseau contribuent au recrutement et à la réorganisation de la machinerie apoptotique (Atencia, Asumendi et Garcia-Sanz, 2000). De nombreuses protéines du cytosquelette sont phosphorylées et/ou clivées par différentes enzymes lors de l'exécution de l'apoptose chez différents types cellulaires, incluant les neutrophiles. La signalisation induite par ces enzymes active ou inactive certains régulateurs du cytosquelette, ce qui cause le démantèlement de la structure globale du cytosquelette et l'arrêt des fonctions cellulaires (Vicente-Manzanares et Sanchez-Madrid, 2004). De plus, il semblerait que le démantèlement des différents filaments du cytosquelette pourrait avoir une influence sur la localisation intracellulaire et le niveau d'activation de plusieurs molécules effectrices, impliquées dans l'apoptose (Suria *et al*, 1999).

2.5.1. Les microfilaments

Les changements morphologiques observés chez les cellules apoptotiques dépendent, entre autres, du réarrangement du réseau d'actine. Le clivage protéolytique de plusieurs protéines associées aux MF, comme la fodrine, pourrait contribuer au recrutement et à la réorganisation des filaments d'actine pour former, avec l'aide de la myosine activée (phosphorylée), la machinerie contractile qui mène à la diminution du volume cellulaire et à la formation de corps apoptotiques (Atencia, Asumendi et Garcia-Sanz, 2000). Quelques études indiquent que certaines protéines des MF pourraient jouer un rôle dans les voies de signalisation apoptotiques chez différents types cellulaires.

L'actine est un substrat de clivage par les caspases durant l'apoptose de plusieurs types cellulaires, incluant les neutrophiles (Brown, Bailey et Savill, 1997). L'expression de produits de clivage de l'actine chez des cellules tumorales a pour effet d'induire des changements morphologiques semblables aux cellules apoptotiques, incluant des modifications à l'organisation des filaments d'actine (Mashima, Naito et Tsuruo, 1999). L'équipe de Kothakota (1997) a démontré que la gelsoline est clivée lors de l'apoptose par la caspase-3 et que l'expression de produits de clivage amino-terminal de la gelsoline chez plusieurs types cellulaires a pour effet d'induire l'apoptose des cellules. Ils ont également observé que la gelsoline était clivée durant l'apoptose spontanée des

neutrophiles et celle induite par des anticorps anti-Fas et le TNF- α . De plus, les neutrophiles provenant de souris déficientes en gelsoline étaient réfractaires à l'apoptose. Une autre équipe a observé que la surexpression de la gelsoline chez la lignée de lymphocytes T Jurkat (Ohtsu *et al*, 1997) et d'autres types cellulaires (Kusano *et al*, 2000) diminue l'apoptose induite par différents stimuli. L'effet anti-apoptotique de la surexpression de la gelsoline fut toutefois contredit dans une étude effectuée par un autre laboratoire (Posey *et al*, 2000). La paxilline fut également identifiée comme étant un substrat de clivage de la caspase-3 *in vitro* (Shim *et al*, 2001).

Lorsqu'il y a prolongation de la survie des neutrophiles avec des cytokines inflammatoires comme l'IL-4, l'IL-15 ou le GM-CSF, il y a stimulation d'événements de phosphorylation et de la synthèse *de novo* de nombreuses protéines incluant l'actine (Girard *et al*, 1996; Girard, Paquin et Beaulieu, 1997) qui, sous sa forme active, est connue pour inhiber la DNaseI, une enzyme impliquée dans la fragmentation de l'ADN lors de l'apoptose (Kayalar *et al*, 1996). Dans notre laboratoire, nous avons démontré que certaines protéines associées aux MF sont clivées par les caspases durant l'apoptose des neutrophiles. La gelsoline et la paxilline sont clivées lors de l'apoptose spontanée et celle induite par la lectine de plante *Viscum album* agglutinine-I (VAA-I) (Savoie *et al*, 2000 ; Lavastre *et al*, 2002). Il en va de même avec les pesticides toxaphène (Lavastre *et al*, 2002b) et tributylétain (Lavastre et Girard, 2002) et l'agent chimiothérapeutique trioxyde d'arsenic (As₂O₃) (Binet *et al*, 2006). À l'inverse, deux agents retardant l'apoptose des neutrophiles, soit le GM-CSF et de faibles concentrations de chlorure de méthylmercure (CH₃HgCl) (Moisan *et al*, 2002), préviennent la dégradation de la gelsoline et la paxilline (Moisan, Kouassi et Girard, 2003). La vinculine n'est aucunement modulée lors de l'apoptose spontanée et celle induite par la VAA-I (Lavastre *et al*, 2002), le tributylétain (Lavastre et Girard, 2002) et le CH₃HgCl (Moisan, Kouassi et Girard, 2003), indiquant que les protéines des MF ne sont pas toutes modulées de la même façon lors de l'apoptose des neutrophiles humains.

2.5.2. Les microtubules

Les réseaux de tubuline sont partiellement dépolymérisés et réorganisés durant les premières phases de l'apoptose. Ces modifications impliqueraient des changements dans les niveaux de phosphorylation des filaments. Le désassemblage des MT est accompagné de la déphosphorylation de plusieurs protéines structurales, associées aux filaments de tubuline, telles que la protéine tau. Chez la cellule viable, tau se fixe aux MT, soutient leur nucléation et élongation et empêche leur désassemblage. La dépolymérisation des MT est associée au clivage partiel des protéines constitutives de ces filaments, soit les tubulines- α et $-\beta$ (Atencia, Asumendi et Garcia-Sanz, 2000; Moss et Lane, 2006). Il a été démontré chez certains types de cellules que la portion carboxy-terminale régulatrice des protéines tubuline- α est clivée par les caspases durant l'apoptose, ce qui augmente la capacité de polymérisation de la tubuline. Ces observations peuvent cependant varier selon le type cellulaire (Moss et Lane, 2006).

Plusieurs thérapies anti-cancéreuses ciblent l'activité pro-mitotique des MT en interférant avec les fonctions de ces filaments, induisant l'apoptose des cellules. Par exemple, le paclitaxel (Taxol) est utilisé dans une variété de cancers tels que le cancer des ovaires, des seins, des poumons et certains mélanomes. Il a été suggéré que le désassemblage des MT pourrait contribuer à la diminution de la résistance à la compression de la cellule apoptotique afin de faciliter son ingestion par les phagocytes. Les MT sembleraient avoir un rôle à jouer également dans l'activation des protéines de la famille Bcl-2 lors de l'apoptose (Moss et Lane, 2006). Il a été démontré dans notre laboratoire que les tubulines- α et $-\beta$ ne sont pas clivées durant l'apoptose des neutrophiles induite par la VAA-I (Lavastre *et al*, 2002). L' α -tubuline est toutefois clivée lors de l'apoptose induite par l' As_2O_3 (Binet *et al*, 2006), un agent connu pour cibler les MT (Miller *et al*, 2002), ce qui indique que le clivage de ce type de protéines du cytosquelette peut différer selon l'agent apoptotique utilisé.

2.5.3. Les filaments intermédiaires

Plusieurs types de FI cytoplasmiques forment des agrégats très tôt durant le processus apoptotique et ces protéines sont clivées par des protéases, notamment les caspases

(Atencia, Asumendi et Garcia-Sanz, 2000). Il semblerait que plusieurs protéines des FI et leurs produits de clivage jouent un rôle durant la mort cellulaire chez plusieurs types de cellules (Marceau *et al*, 2007). Certaines cytokératines sont clivées durant l'apoptose. Par exemple, les kératines 14, 18 et 19 sont clivées par les caspases *in vitro* et durant l'apoptose des cellules épithéliales (Ku, Liao et Omary, 1997; Ku et Omary, 2001) et il a été démontré plus spécifiquement que la kératine 18 est clivée par la caspase-3 (Caulin, Salvesen et Oshima, 1997; Ku, Liao et Omary, 1997), la caspase-6, la caspase-7 (Caulin, Salvesen et Oshima, 1997) et la caspase-9 (Schutte *et al*, 2004) *in vitro*. Le clivage de la cytokératine 18 par les caspases, lors de l'apoptose des cellules épithéliales, produit des fragments pouvant amplifier l'activation de la machinerie apoptotique, en autres, en contrôlant la distribution intracellulaire de différentes caspases (Dinsdale *et al*, 2004). Le clivage des cytokératines par les caspases est sélectif, puisqu'il a été démontré que la kératine 8 n'est clivée par aucune des caspases étudiées et que son expression n'est pas modulée lors de l'apoptose des cellules épithéliales (Caulin, Salvesen et Oshima, 1997; Ku, Liao et Omary, 1997). La desmine est clivée par la caspase-6, produisant un fragment amino-terminal (acides aminés 1-263), incapable de s'assembler au réseau de FI et qui induit la formation de larges agrégats à l'intérieur des cellules musculaires. Ce fragment n'avait cependant pas la capacité d'induire à lui seul l'apoptose des cellules. L'expression stable d'une forme de desmine résistante de clivage par les caspases protège en partie les cellules de l'apoptose induite par le TNF- α , suggérant un rôle anti-apoptotique de la protéine (Chen *et al*, 2003).

Durant l'apoptose, le réseau de lamines nucléaires subit de nombreuses modifications qui rendent le noyau fragile et mènent aux changements morphologiques nucléaires observés. Contrairement aux modifications observées lors de la mitose, les changements encourus par la lamina nucléaire sont irréversibles durant l'apoptose. Une faible quantité de lamines est solubilisée par hyperphosphorylation; puis, tout le réseau est clivé et désassemblé. Le clivage des lamines semble être un événement universel et essentiel durant l'apoptose chez différents types cellulaires et en réponse à divers stimuli apoptotiques. Le clivage des lamines aide au détachement de la chromatine à des régions spécifiques, facilite la dégradation de l'ADN par les endonucléases, ce qui aide durant

l'exécution de l'apoptose (Casiano *et al*, 1996; Atencia, Asumendi et Garcia-Sanz, 2000; Buendia, Courvalin et Collas, 2001). Le clivage des lamines constitue une des premières modifications biochimiques se produisant au niveau de l'enveloppe nucléaire durant l'apoptose. Il a été démontré que le clivage des lamines de type A et B par la caspase-6 se fait à un résidu aspartate, situé dans une région charnière de la portion carboxy-terminale. Certaines protéines associées aux lamines sont clivées, entre autres, par la caspase-3 (Buendia, Courvalin et Collas, 2001). En plus de la protéolyse, certaines protéines subissent des changements de phosphorylation durant l'apoptose. Par exemple, il a été démontré que durant l'apoptose des cellules HL-60, la caspase-3 clive la PKC- δ , ce qui stimule la phosphorylation des lamines en coopération avec le clivage par la caspase-6 afin d'induire un désassemblage efficace de la lamina nucléaire (Cross *et al*, 2000; Buendia, Courvalin et Collas, 2001). Il est à noter que la lamine B₁ est un substrat des caspases durant l'apoptose spontanée des neutrophiles (Sanghavi *et al*, 1998), celle induite par la VAA-I (Lavastre *et al*, 2005) et l'As₂O₃ (Binet *et al*, 2006).

Le déclenchement de l'apoptose, chez plusieurs types de cellules par différents agents, induit la dégradation de la vimentine à plusieurs endroits de la protéine par la caspase-3 (Hashimoto *et al*, 1998; Morishima, 1999; Byun *et al*, 2001), la caspase-6 (Morishima, 1999; Byun *et al*, 2001), la caspase-7 (Byun *et al*, 2001), la caspase-8 (Morishima, 1999; Belichenko, Morishima et Separovic, 2001) et la caspase-9 (Nakanishi *et al*, 2001). La construction d'une vimentine mutée à certains résidus aspartates (D) a permis d'identifier les résidus D85 et D259 comme étant deux sites de clivage principaux par les caspases; l'expression d'une vimentine double-mutante à ces deux endroits a eu pour effet de retarder l'apoptose des lymphocytes T Jurkat (Morishima, 1999; Belichenko, Morishima et Separovic, 2001) et une lignée de fibroblastes (Schietke *et al*, 2006). De plus, il a été démontré que la protéolyse de la vimentine génère un fragment amino-terminal (acides aminés 1 à 85) pro-apoptotique qui peut induire l'apoptose dépendante des caspases. Ces résultats suggèrent que la protéolyse de la vimentine par les caspases constituerait une boucle d'amplification de la machinerie apoptotique (Byun *et al*, 2001). Il a été démontré dans notre laboratoire que la vimentine est clivée par les caspases lors de l'apoptose spontanée des neutrophiles, l'apoptose induite par la VAA-I (Lavastre *et al*, 2002), le

toxaphène (Lavastre *et al*, 2002b), le tributylétain (Lavastre et Girard, 2002) et le CH₃HgCl (Moisan, Kouassi et Girard, 2003). À l'inverse, le retard de l'apoptose des neutrophiles par l'IL-15 réduit l'activité des caspases-3 et -8, résultant en une inhibition du clivage de la vimentine (Bouchard, Ratthé et Girard, 2004).

2.6. Étude des fonctions du cytosquelette par l'utilisation de souris knockout

Une des méthodes les plus appropriées pour l'étude des fonctions d'une protéine implique l'inactivation du gène correspondant, suivie de l'analyse du phénotype de l'animal. Voici quelques études chez la souris ayant démontré l'importance de diverses protéines du cytosquelette dans différentes fonctions.

2.6.1. Souris déficientes en gelsoline

Les souris déficientes en gelsoline (*Gsn*^{-/-}) ont un développement embryonnaire normal et se reproduisent sans difficultés. Toutefois, les changements morphologiques des plaquettes sont diminués, ce qui augmente la durée de cicatrisation suite à une blessure. Les fibroblastes de souris *Gsn*^{-/-} ont une morphologie anormale, migrent moins rapidement que ceux des souris normales, mais ont une plus grande contractilité *in vitro*. La quantité de neutrophiles circulant dans le sang est plus élevée chez les souris *Gsn*^{-/-} par rapport aux souris *Gsn*^{+/+} (Witke *et al*, 1995), dû au fait que l'apoptose spontanée des neutrophiles dépourvus de gelsoline est retardée (Kothakota *et al*, 1997). De plus, il a été observé que la migration des neutrophiles *in vitro*, et dans le modèle de l'inflammation intra-péritonéale *in vivo*, est considérablement ralentie (Witke *et al*, 1995). La phagocytose de particules opsonisées par des IgG est diminuée chez les neutrophiles dépourvus de gelsoline, alors que celle passant par les récepteurs du complément est normale, bien que la quantité des deux types de récepteurs phagocytiques à la surface des cellules était la même entre les neutrophiles *Gsn*^{-/-} et *Gsn*^{+/+}. Ces observations suggèrent que la gelsoline fait partie de la machinerie intracellulaire distinguant la phagocytose passant par les récepteurs Fc par rapport à celle passant par les récepteurs du complément. La dégranulation, la formation du phagosome et la production de radicaux libres n'étaient pas affectées chez les neutrophiles *Gsn*^{-/-} (Serrander *et al*, 2000). Ces observations nous

indiquent que la gelsoline est nécessaire chez les cellules impliquées dans les réponses de stress, comme l'inflammation et la guérison des blessures (Witke *et al*, 1995).

2.6.2. Souris déficientes en kératines

Une grande quantité de mutations dans les gènes codant pour les différentes kératines humaines sont à l'origine de divers désordres de la peau. Quelques souris déficientes en kératines ont été développées afin de connaître le rôle joué par certaines de celles-ci et s'il existe certains mécanismes de compensation afin de pallier à un manque d'une kératine donnée (Porter et Lane, 2003). Ces études ont permis de déterminer que certaines kératines, comme la kératine 10, sont dispensables au fonctionnement normal des souris, puisqu'elles ne développent aucun phénotype anormal apparent (Reichelt *et al*, 2001). Ceci s'explique en partie par le fait que certains mécanismes de compensation entre les kératines ont été identifiés. Par contre, d'autres kératines sont essentielles à la survie des animaux, comme c'est le cas pour les souris déficientes en kératine 5 (Peters *et al*, 2001) et 8 (Baribault *et al*, 1993). Il semblerait que les phénotypes observés chez les différentes souris déficientes en kératines dépendent du patron d'expression de la kératine ciblée dans les différents tissus. Par exemple, les souris déficientes en kératine 6a ont des difficultés au niveau de la guérison des blessures (Wojcik, Bundman et Roop, 2000) et celles déficientes en kératine 12 ont une fragilité au niveau de la cornée (Kao *et al*, 1996).

2.6.3. Souris déficientes en GFAP

Chez l'humain, des mutations du gène codant pour la GFAP sont impliquées dans l'émergence de la maladie d'Alexandre, une maladie neurodégénérative fatale pouvant survenir chez l'enfant (Messing et Brenner, 2003). Le rôle présumé des GFAP dans la morphologie des astrocytes a suggéré que l'inactivation du gène chez la souris pourrait s'avérer létal au stade embryonnaire. Curieusement, quatre groupes ont produit indépendamment des souris déficientes en GFAP et ont constaté que ces souris se développent et se reproduisent normalement (Gomi *et al*, 1995; Pekny *et al*, 1995; Liedtke *et al*, 1996; McCall *et al*, 1996). Certaines études ont suggéré, par contre, que l'absence de GFAP mène à des changements subtils dans le fonctionnement des astrocytes, comme la difficulté des astrocytes à maintenir une barrière hémato-

encéphalique dans l'endothélium (Liedtke *et al*, 1996; McCall *et al*, 1996). Ces changements subtils reflètent probablement l'habileté de certaines composantes du cytosquelette à compenser le manque de GFAP, comme la vimentine (Messing et Brenner, 2003), puisqu'il a été démontré que les souris double-déficientes en GFAP et vimentine ont une réponse plus marquée face à un traumatisme au système nerveux central (Pekny *et al*, 1999).

2.6.4. Souris déficientes en desmine

Chez l'humain, certaines formes de myopathies sont reliées à des mutations du gène codant pour la desmine. Les manifestations cliniques de ces désordres sont variées et comprennent, entre autres, des problèmes de muscles squelettiques ou des muscles lisses, de cardiomyopathie, de déficience respiratoire et de neuropathie (Paulin et Li, 2004). Les souris déficientes en desmine, développées indépendamment par deux groupes (Li *et al*, 1996; Milner *et al*, 1996), sont viables et développent des muscles cardiaques, squelettiques et lisses fonctionnels, démontrant que la protéine n'est pas essentielle à la formation des muscles *in vivo*. Ces souris développent, par contre, après leur naissance, une myopathie généralisée, surtout au niveau du muscle cardiaque. Un cœur sans desmine induit la mort cellulaire des cardiomyocytes, la calcification et plusieurs altérations structurales menant à une défaillance cardiaque. La mort cellulaire des myocytes est probablement causée par un fonctionnement déficient et une morphologie anormale des mitochondries (Milner *et al*, 1996). Ces souris développent également des défauts au niveau des muscles squelettiques, comme le diaphragme, ce qui fait qu'elles se fatiguent plus rapidement par rapport à des souris normales (Li *et al*, 1996). Les muscles lisses, comme les veines et artères, sont également altérés par le manque de desmine, ce qui affecte la circulation sanguine (Paulin et Li, 2004).

2.6.5. Souris déficientes en lamines A/C

Des mutations dans le gène de la lamine A sont associées au développement de diverses maladies humaines comme la dystrophie musculaire, une forme de cardiomyopathie, la lypodystrophie et le progeria (Moir et Spann, 2001; Wolfner et Wilson, 2001). Il semblerait que des mutations au niveau de la lamine A cause un assemblage incorrect de

la lamina nucléaire et mène au développement d'une fragilité nucléaire. Cette fragilité, sous des conditions de stress, peut mener à une perte des fonctions nucléaires menant à la mort cellulaire et à la dégénérescence des tissus. De tels défauts pourraient également augmenter la propension des cellules à l'apoptose, puisque les lamines sont des substrats clés des caspases (Holmer et Worman, 2001; Moir et Spann, 2001). Chez la souris, l'inactivation du gène des lamines A/C a fourni plusieurs informations concernant le rôle de ce type de lamines *in vivo*. Les symptômes observés chez les souris déficientes en lamines A/C ressemblent fortement à ceux présents chez l'humain. Ces souris se développent de façon apparemment normale jusqu'à la naissance, mais croissent beaucoup plus lentement ensuite par rapport à des souris normales ou hétérozygotes. De plus, elles développent des difficultés dans la démarche et la posture. Les souris déficientes en lamines A/C meurent après environ 8 semaines et l'analyse de leurs tissus suggère qu'elles développent des symptômes semblables à la dystrophie musculaire, la cardiomyopathie et la lipodystrophie. Il a également été observé que les cellules isolées de ces souris ont une morphologie nucléaire altérée et une fragilité apparente du noyau (Sullivan *et al*, 1999; Moir et Spann, 2001).

2.6.6. Souris déficientes en lamine B₁

Bien que des mutations du gène des lamines A/C peuvent résulter en plusieurs types de maladies, la seule maladie humaine, connue comme étant tributaire à une mutation du gène de lamine B₁ (*Lmnb1*), est une forme de leucodystrophie héréditaire se caractérisant par une démyélinisation avec des symptômes semblables à la sclérose en plaques (Worman et Bonne, 2007). Les individus affectés par la maladie portent une copie supplémentaire du gène *Lmnb1*, ce qui augmente la l'expression de ce gène dans le cerveau (Padiath *et al*, 2006). L'équipe de Vergnes (2004) a produit des souris déficientes en lamine B₁ afin d'étudier les diverses fonctions de la protéine *in vivo*. Bien que les souris hétérozygotes (*Lmnb1*^{+/-}) soient fertiles et qu'elles aient un phénotype normal, les souris *Lmnb1*^{-/-} survivent au développement embryonnaire, mais meurent quelques minutes après leur naissance, principalement à cause de problèmes de développement au niveau des poumons et des os. L'expression des autres types de lamines (A/C et B₂) était équivalente entre les souris *Lmnb1*^{+/+} et *Lmnb1*^{-/-}. La localisation intra-nucléaire des

autres types de lamines était toutefois légèrement affectée chez les souris déficientes en lamine B₁. Les fibroblastes *Lmnb1*^{-/-} provenant d'embryons ont été cultivés *in vitro* et il a été observé que ces cellules avaient une morphologie nucléaire différente et un emplacement anormal de l'ADN. De plus, la sénescence des cellules était accélérée, les cellules avaient de la difficulté à se différencier en adipocytes et présentaient une plus grande quantité de chromosomes.

2.6.7. Souris déficientes en vimentine

L'inactivation du gène de la vimentine chez la souris a tout d'abord fourni des résultats surprenants, puisque ces animaux ne présentaient, à première vue, aucune anomalie dans leur développement sans aucune compensation apparente par une autre protéine des FI (Colucci-Guyon *et al*, 1994). La seule différence observée à ce moment entre les souris *Vim*^{+/+} et *Vim*^{-/-} était que la GFAP ne parvenait pas à développer un réseau de FI normal chez les astrocytes, indiquant que l'assemblage de ce type de protéines requiert la présence de la vimentine (Galou *et al*, 1996; Colucci-Guyon *et al*, 1999).

L'analyse plus détaillée des souris *Vim*^{-/-} montre que de nombreux aspects physiologiques sont perturbés chez ces animaux, ce qui suggère de possibles altérations au niveau des processus de signalisation intracellulaire et démontre l'importance de la vimentine dans ces processus (Paramio et Jorcano, 2002). Il a été démontré que les fibroblastes de souris *Vim*^{-/-} avaient une motilité réduite, associée à des troubles, entre autres, au niveau de l'organisation de l'actine et des protéines d'adhésion focale (Eckes *et al*, 1998), menant à des défauts au niveau de la guérison de blessures (Eckes *et al*, 2000). De plus, il a été démontré que ces souris présentent d'importantes déficiences fonctionnelles au niveau du système nerveux, entre autres, au niveau de la coordination motrice (Colucci-Guyon *et al*, 1999). Il a également été observé que les souris *Vim*^{-/-} sont plus susceptibles à la néphrectomie que les souris normales, puisqu'elles présentent une vasodilatation soutenue dans le système vasculaire rénal (Terzi *et al*, 1997). Des études *in vitro* utilisant des artères de souris *Vim*^{-/-} ont démontré que la vimentine joue un rôle dans la modulation de la structure des artères en réponse à des changements de pression sanguine, possiblement via la régulation de la production de facteurs vasoactifs endothéliaux (Henrion *et al*, 1997; Terzi *et al*, 1997; Schiffers *et al*, 2000; Zhang *et al*, 2001). De plus, il a été observé

que les fibroblastes de souris *Vim*^{-/-} synthétisent moins de glycosphingolipides. Le défaut dans la biosynthèse se situerait au niveau des voies de transport intracellulaire et non au niveau de la synthèse *de novo* des lipides (Gillard *et al*, 1998), ce qui supporte l'idée que la vimentine contribue à la régulation de protéines impliquées dans les processus de transport intracellulaire.

L'équipe de Nieminen (2006) a récemment étudié l'implication de la vimentine durant les processus d'adhésion et de transmigration des leucocytes à travers l'endothélium, en comparant les lymphocytes aux neutrophiles. Ils ont observé que les FI de vimentine forment une structure d'ancrage dynamique aux sites de contact entre les cellules endothéliales et les lymphocytes. Cette interaction est hautement compromise chez les souris déficientes en vimentine. Aucune implication de la vimentine n'a été observée durant l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales, ce qui suggère que les mécanismes d'adhésion et de transmigration diffèrent entre ces deux types cellulaires. De plus, l'absence de vimentine induit une faible expression et une distribution aberrante des molécules de surface critiques à l'interaction entre les cellules endothéliales (ICAM-1 et VCAM-1) et les lymphocytes (β 1-intégrines). Ceci résulte en une plus faible adhésion entre les cellules endothéliales et les lymphocytes. Dans un modèle de péritonite aiguë, un modèle inflammatoire puissant se déroulant sur plus de 24h, une plus grande proportion de neutrophiles ont été recueillis par rapport aux macrophages résidents chez les souris *Vim*^{-/-}. En effectuant des études de microscopie intravitale, dans le muscle crémastaire, un modèle inflammatoire tout à fait différent du modèle de la péritonite, ils ont observé que les leucocytes, en majorité des neutrophiles, avaient davantage de difficulté à adhérer à l'endothélium en absence de vimentine. Cependant, la quantité de cellules qui avaient transmigré était significativement plus élevée. Le taux de transmigration plus important fut expliqué par le fait que l'intégrité de l'endothélium serait altérée chez les souris *Vim*^{-/-}, démontrant que la vimentine régule la barrière régulant l'extravasation des leucocytes. Les résultats obtenus dans cette étude portent toutefois à confusion, puisqu'ils ont utilisé deux modèles inflammatoires différents faisant appel à différents types cellulaires afin d'expliquer un seul phénomène, soit le rôle de la vimentine dans la transmigration des lymphocytes.

Objectifs et hypothèses

Objectif 1 : Modulation de l'expression intra- et extra-cellulaire des protéines du cytosquelette lors de l'apoptose des neutrophiles humains.

On retrouve fréquemment des auto-anticorps dirigés contre les protéines du cytosquelette chez des patients atteints de maladies auto-immunes. L'origine de tels auto-anticorps demeure par contre encore incertaine. Il a été démontré qu'au moins deux protéines du cytosquelette, la vinculine et la vimentine, peuvent être exposées à la surface des macrophages activés (Mor-Vaknin *et al*, 2003), des plaquettes sanguines (Podor *et al*, 2002) des lymphocytes T apoptotiques (Boilard *et al*, 2003; Propato *et al*, 2003) et chez certaines cellules endothéliales (Xu *et al*, 2004). Une telle re-localisation des protéines pourrait potentiellement expliquer la présence d'auto-anticorps anti-cytosquelette.

Les cellules apoptotiques peuvent constituer une source importante d'auto-antigènes (Mevorach *et al*, 1998; Gensler *et al*, 2001). Nous savons que le neutrophile représente une source d'auto-antigènes menant à la production de ANCA associés à des vascularites (Bartunkova, Tesar et Sediva, 2003). De plus, le neutrophile circule en grand nombre dans le sang et dans les tissus inflammatoires et il est connu pour se diriger spontanément en apoptose. Il devient donc important d'étudier la modulation de ses diverses protéines du cytosquelette, un sujet peu étudié jusqu'ici. Il a été démontré dans notre laboratoire que certaines protéines du cytosquelette sont clivées durant l'apoptose des neutrophiles (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002).

Sachant que certaines protéines du cytosquelette sont exprimées à la surface de plusieurs types de cellules, la présente étude a été réalisée dans le but de mieux définir la modulation de l'expression intracellulaire et extracellulaire des protéines du cytosquelette, plus particulièrement celle des FI, chez les neutrophiles humains.

Notre hypothèse est que le neutrophile exprime certaines protéines du cytosquelette à sa surface lors de l'apoptose spontanée, ce qui pourrait possiblement contribuer au développement d'auto-anticorps anti-cytosquelette.

Objectif 2 : Rôle de la vimentine dans l'inflammation aiguë *in vivo* et dans diverses fonctions des neutrophiles *ex vivo*.

Dans un deuxième temps, sachant que les protéines de FI étaient toutes deux exprimées à la surface des neutrophiles apoptotiques, nous nous sommes intéressés à étudier davantage le rôle de ces protéines par l'utilisation de souris knockout. Contrairement aux souris déficientes en lamine B₁ qui meurent à la naissance (Vergnes *et al*, 2004), les souris déficientes en vimentine se développent et se reproduisent normalement (Colucci-Guyon *et al*, 1994). Nous avons donc utilisé une colonie de souris déficientes en vimentine afin de déterminer le rôle de la protéine dans la réponse inflammatoire aiguë *in vivo* en utilisant un seul modèle, celui de la poche d'air. Ce modèle nous permet de déterminer systématiquement si l'inflammation, induite par différents agents à différentes périodes de temps, est altérée en absence de vimentine.

Les neutrophiles recueillis dans la poche d'air ont été utilisés afin de déterminer le rôle de la vimentine dans diverses fonctions *in vitro*, soit la mobilisation du calcium intracellulaire, la flambée oxydative, la phagocytose de globules rouges de moutons opsonisés aux IgG et l'apoptose en réponse à différents agents.

Notre hypothèse pour cet objectif est que la réponse inflammatoire *in vivo* est plus importante chez les souris *Vim*^{-/-} dû au fait que les neutrophiles dépourvus de vimentine sont réfractaires à l'apoptose et demeurent donc activés et en grand nombre au site inflammatoire. Une réponse semblable a déjà été observée chez les souris déficientes en gelsoline (Witke *et al*, 1995; Kothakota *et al*, 1997). Nous nous attendons également à ce que certaines fonctions des neutrophiles soient altérées en absence de vimentine. Par exemple, il a été démontré que les neutrophiles déficients en gelsoline ont des difficultés à phagocyter des particules opsonisées avec des IgG (Serrander *et al*, 2000); il se pourrait que cette fonction soit altérée chez les neutrophiles *Vim*^{-/-}.

SECTION 2 : ARTICLES

Titre

CELL SURFACE EXPRESSION OF INTERMEDIATE FILAMENT PROTEINS VIMENTIN AND LAMIN B1 IN HUMAN NEUTROPHIL SPONTANEOUS APOPTOSIS

Auteurs

Eliane Moisan et Denis Girard

Publié dans

Journal of Leukocyte Biology (2006) 79:489-98.

Contribution personnelle

J'ai participé à la planification et à la réalisation des expériences qui ont permis d'obtenir tous les résultats de l'article. J'ai contribué à l'analyse des résultats et aux analyses statistiques. J'ai également participé à la rédaction du manuscrit. Ma contribution à cet article est évaluée à environ 85%.

Contribution des co-auteurs

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

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur

[Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis.](#)

Moisan E, Girard D.

J Leukoc Biol. 2006 Mar;79(3):489-98. Epub 2005 Dec 19.

<http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0405190>

Résumé en français de l'article

Les neutrophiles représentent une source importante d'auto-antigènes pour les auto-anticorps anti-cytoplasme de neutrophiles associés à des vasculites. Jusqu'ici, deux protéines du cytosquelette, la vinculine et la vimentine, ont été identifiées à la surface des macrophages activés, des plaquettes et des lymphocytes T apoptotiques. Cependant, une telle expression n'a jamais été étudiée à la surface des neutrophiles humains. Puisque nous avons récemment démontré que différentes protéines du cytosquelette sont clivées chez les neutrophiles apoptotiques, nous avons émis l'hypothèse que certaines d'entre elles sont exprimées à la surface des neutrophiles apoptotiques. Dans cette étude, nous avons découvert que, parmi la vinculine, la paxilline, la gelsoline, la vimentine, la lamine B₁, l' α -tubuline et la β -tubuline, seulement les deux protéines des filaments intermédiaires (FI), la vimentine et la lamine B₁, sont exprimées à la surface des neutrophiles âgés de 24h (apoptose spontanée). En étudiant l'expression intracellulaire de la vimentine et la lamine B₁ durant l'apoptose spontanée, nous avons découvert que ces deux protéines sont clivées et que le clivage était inhibé par l'inhibiteur de caspases N-benzyloxy-carbonyl-V-A-D-O-méthylfluorométhyl ketone (z-VAD-fmk). Lorsque l'apoptose des neutrophiles fut retardée ou supprimée par les lipopolysaccharides ou les cytokines « granulocyte-colony stimulating factor » (G-CSF), granulocyte-macrophage (GM)-CSF, ou l'interleukine-4, la perte d'expression intracellulaire de la vimentine et la lamine B₁ était inhibée. Les protéines des FI étaient absentes de la surface cellulaire lorsque l'apoptose des neutrophiles était retardée. Lors de l'apoptose spontanée, l'ajout de z-VAD-fmk diminue significativement l'expression de la vimentine et de la lamine B₁ à la surface des neutrophiles. Cette étude constitue la première évidence que les neutrophiles apoptotiques expriment des protéines du cytosquelette à leur surface, ouvrant la possibilité que ces cellules pourraient participer au développement d'auto-anticorps dirigés contre des protéines du cytosquelette, une condition fréquemment rapportée dans plusieurs cas de maladies inflammatoires.

Titre

THE INTRIGUING NORMAL ACUTE INFLAMMATORY RESPONSE IN MICE LACKING VIMENTIN

Auteurs

Eliane Moisan, Sonia Chiasson et Denis Girard

Accepté pour publication dans

Clinical and Experimental Immunology

Contribution personnelle

J'ai participé à la planification et à la réalisation des expériences qui ont permis d'obtenir tous les résultats de l'article, sauf celui présenté à la figure 2A (page 73). J'ai contribué à l'analyse des résultats et aux analyses statistiques. J'ai également participé à la rédaction du manuscrit. Ma contribution à cet article est évaluée à environ 80%.

Contribution des co-auteurs

Sonia Chiasson : Elle a travaillé à l'établissement et à la gestion de la colonie de souris déficientes en vimentine, incluant le géotypage des animaux. Elle a effectué les expériences qui ont permis d'obtenir les résultats de la figure 2A. De plus, elle m'a aidée lors des expériences *in vivo* en récoltant les échantillons et en effectuant les comptes cellulaires pour chaque exsudat recueilli dans les poches d'air de souris.

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

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Clin Exp Immunol. 2007 October; 150(1): 158–168.
doi: [10.1111/j.1365-2249.2007.03460.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03460.x)

Résumé en français de l'article

Les neutrophiles expriment seulement deux protéines des filaments intermédiaires, la vimentine et la lamine B. Alors que les souris déficientes en lamine B meurent peu de temps après leur naissance, les souris déficientes en vimentine (*Vim*^{-/-}) se développent et se reproduisent normalement. Dans cette étude, nous avons étudié pour la première fois le rôle de la vimentine dans l'inflammation générale *in vivo* et dans les fonctions des neutrophiles *ex vivo*. En utilisant le modèle de la poche d'air murine, nous démontrons que la réponse inflammatoire induite par le LPS, l'interleukine-21 ou la carraghénine, curieusement, n'est pas compromise chez les souris *Vim*^{-/-} et que les fonctions des neutrophiles ne sont pas altérées *ex vivo*. Nos résultats suggèrent que la vimentine est dispensable à l'établissement d'une réponse inflammatoire aiguë *in vivo*. De plus, en se basant sur plusieurs critères présentés dans cette étude, nous devons croire à l'existence d'un mécanisme de compensation très complexe afin d'expliquer l'intrigante réponse inflammatoire normale en absence de vimentine.

Discussion et conclusion

Modulation de l'expression intra- et extracellulaire des protéines du cytosquelette lors de l'apoptose des neutrophiles humains.

Nous retrouvons des auto-anticorps dirigés contre les protéines du cytosquelette dans de nombreux cas de maladies auto-immunes. Leur origine reste cependant obscure pour le moment. Quelques études ont démontré récemment que différents types cellulaires expriment certaines protéines du cytosquelette à leur surface sous diverses conditions, ce qui pourrait expliquer en partie l'émergence d'auto-anticorps anti-cytosquelette. La vimentine a été observée à la surface des macrophages activés (Mor-Vaknin *et al*, 2003), des plaquettes (Podor *et al*, 2002), de certaines cellules endothéliales (Xu *et al*, 2004) et des lymphocytes T apoptotiques (Boilard *et al*, 2003). La vinculine a, pour sa part, été observée à la surface des lymphocytes T apoptotiques (Propato *et al*, 2001). De plus, certaines de ces études ont démontré que ces protéines à la surface cellulaire pouvaient jouer un rôle dans les processus inflammatoires.

Le neutrophile est une cellule grandement impliquée dans les processus inflammatoires et peut constituer une source d'auto-antigènes. Compte tenu du fait que le neutrophile meurt spontanément par apoptose après environ 24h et qu'il circule en grandes quantités dans le sang, nous nous sommes intéressés à déterminer la modulation des protéines du cytosquelette lors de l'activation et lors de l'apoptose spontanée de cette cellule, autant au niveau intracellulaire qu'extracellulaire. Jusqu'ici, aucune étude n'avait systématiquement vérifié la présence de plusieurs protéines du cytosquelette provenant des trois types de filaments à la surface de cellules, sous différentes conditions expérimentales (activation, apoptose). Nous démontrons pour la première fois que la vimentine et la lamine B₁ sont exprimées à la surface des neutrophiles apoptotiques. Fait intéressant, ceci constitue la première étude démontrant que la lamine B₁ est exposée à la surface d'une cellule, ce qui suggère qu'elle pourrait vraisemblablement se retrouver à la surface d'un ou plusieurs autres types cellulaires.

Les autres protéines des MF faisant partie de cette étude, soit la paxilline, la gelsoline, la vinculine, la chaîne lourde IIA de la myosine non musculaire (NMHC-IIA) (voir

appendice A) et les protéines des MT, soit les tubulines α et β , n'étaient en aucun temps exposées à la surface des neutrophiles. Par un double marquage en cytométrie en flux, nous avons pu déterminer que ce sont uniquement les neutrophiles apoptotiques qui expriment les FI à leur surface, puisque la détection des deux protéines se produisait uniquement sur les cellules positives en annexine V, un marqueur spécifique aux cellules apoptotiques. Ce résultat fut confirmé avec une colonne d'affinité pour le CD16, un récepteur connu pour être clivé à la surface des neutrophiles apoptotiques (Moulding, Hart et Edwards, 1999). Seuls les neutrophiles ayant perdu leur CD16 exprimaient de la lamine B₁ à leur surface.

La vinculine a été détectée à la surface des plaquettes activées et il a été suggéré que la surexpression intracellulaire de cette protéine était un événement commun lors de l'apoptose de plusieurs types cellulaires (Propato *et al*, 2001). Ceci ne semble pas être le cas chez les neutrophiles, puisque la vinculine n'a pas été détectée à leur surface sous différentes conditions expérimentales et qu'il ne semble pas y avoir de modulation intracellulaire de la protéine lors de l'apoptose spontanée et induite (Lavastre *et al*, 2002; Lavastre et Girard, 2002; Moisan, Kouassi et Girard, 2003; cette étude), ou même lorsque l'apoptose est retardée par différents agents (cette étude).

Nous ne pouvons pas exclure hors de tout doute que d'autres protéines du cytosquelette soient présentes à la surface des neutrophiles sous différentes conditions expérimentales. Il existe une multitude de protéines du cytosquelette et il serait ardu de toutes les étudier. Nous nous sommes concentrés sur les protéines que nous avons déjà étudiées au niveau intracellulaire dans notre laboratoire lors de l'apoptose des neutrophiles et dont nous connaissions quelques notions sur leur modulation durant le processus. Parmi les protéines non détectées à la surface des neutrophiles faisant partie de cette étude (paxilline, gelsoline, vinculine, NMHC-IIA, tubulines), il se pourrait que certaines d'entre elles se retrouvent exposées à la surface sous certaines conditions et que nous ne pouvions pas les détecter avec les anticorps que nous avons utilisés. Malgré le fait que nous ayons utilisé quatre anticorps anti-vimentine ciblant différentes portions de la protéine, un seul (V9), ciblant la portion carboxy-terminale de la protéine, est parvenu à se lier à la vimentine à la surface des neutrophiles apoptotiques.

Le fait que nous n'ayons observé que des protéines des FI à la surface des cellules suggère qu'il existe probablement un mécanisme commun à ce type de protéines du cytosquelette. Bien que le mécanisme d'expression des FI à la surface des neutrophiles reste à déterminer, nous pouvons émettre quelques hypothèses. Il a été suggéré que l'expression de la vimentine est associée à une stabilisation des radeaux lipidiques chez les cellules épithéliales (Runembert *et al*, 2002). Par contre, peu de choses sont connues sur ce qui se passe au niveau des radeaux lipidiques lors de l'apoptose des neutrophiles. En utilisant la sous-unité B de la toxine du choléra, l'équipe de Sheriff (2004) a marqué en cytométrie en flux la ganglioside GM1, un marqueur des radeaux lipidiques, à la surface des neutrophiles. Ils ont observé que, durant les premiers instants de l'apoptose, il y a perte d'expression de GM1 à la surface, mais que cette molécule réapparaît à la surface à un moment plus tardif, soit après une période de 24 à 48h (Sheriff *et al*, 2004). Il se pourrait que la vimentine soit associée aux radeaux lipidiques et que les changements encourus durant l'apoptose mènent à l'expression de la protéine à la surface des cellules. Une telle hypothèse pourrait être étudiée en utilisant un agent de dissolution des radeaux lipidiques, comme le méthyl- β -cyclodextrin.

La vimentine a été identifiée dans le protéome des granules spécifiques, tertiaires (Lominadze *et al*, 2005) et azurophiles (Lominadze *et al*, 2005; Feuk-Lagerstedt *et al*, 2007) des neutrophiles. De plus, il a été démontré que l'apoptose spontanée de neutrophiles non pré-activés est associée, chez une sous-population des cellules, à une translocation des granules azurophiles à la surface cellulaire. Des anticorps anti-MPO réagissent avec les neutrophiles apoptotiques et non avec les cellules viables (Gilligan *et al*, 1996). Il se pourrait alors que la vimentine soit transloquée vers la membrane plasmique en même temps que les granules cytoplasmiques. Bien qu'un lien entre les lamines et les granules cytoplasmiques n'ait jamais été évoqué, il se pourrait que les deux protéines des FI soient associées aux membranes des granules. De plus, il est connu que la vimentine et la lamine B forment des liens chez plusieurs types cellulaires (Evans, 1998). Ceci suggère que la vimentine pourrait entraîner la lamine B₁ à la surface du neutrophile.

Les résultats présentés dans cette thèse, ainsi que certains autres présentés précédemment par notre laboratoire (Lavastre *et al*, 2002; Lavastre *et al*, 2005), nous indiquent qu'à l'exception de la vinculine, toutes les protéines du cytosquelette étudiées, soit la gelsoline, la paxilline, la NMHC-IIA (article en annexe), la vimentine, la lamine B₁, l' α -tubuline et la β -tubuline, sont clivées en partie par les caspases lors de l'apoptose des neutrophiles. Cependant, seules les protéines des FI, la vimentine et la lamine B₁, sont exposées à la surface des cellules, ce qui indique que le clivage des protéines du cytosquelette par les caspases ne mène pas nécessairement à leur expression à la surface du neutrophile apoptotique. Le retard de l'apoptose par différents agents a pour effet de réduire le niveau de clivage intracellulaire des FI et, par le fait même, leur expression à la surface cellulaire. Il semblerait qu'il y ait synthèse *de novo* des protéines en présence de ces agents anti-apoptotiques, ce qui permettrait le maintien du réseau de FI en place dans la cellule. Il ne faut toutefois pas oublier qu'il y a tout de même un certain degré de clivage des protéines qui se produit, même lorsque l'apoptose est retardée. L'expression des FI à la surface est peut-être tout à fait indépendante du clivage par les caspases; que les agents anti-apoptotiques ou le z-VAD-fmk ne font que diminuer l'apoptose des cellules. Il est donc difficile, voire impossible, de distinguer un mécanisme de l'autre. Le clivage intracellulaire observé n'est pas complètement inhibé à l'aide du z-VAD-fmk, ce qui indique que d'autres protéases seraient probablement impliquées dans le clivage des FI. Par exemple, il a été suggéré que la vimentine est clivée par les calpaïnes (Yoshida, Murachi et Tsukahara, 1984; Muller *et al*, 2001; Perlson *et al*, 2005) et le protéasome (Muller *et al*, 2001).

La vimentine se lie à la membrane plasmique via sa portion amino-terminale chargée positivement et au noyau de la cellule via son extrémité carboxy-terminale chargée négativement (Georgatos et Blobel, 1987; Perides, Harter et Traub, 1987). Nous avons démontré dans cette étude, en utilisant quatre anticorps anti-vimentine ciblant différentes portions de la protéine, que c'est la portion carboxy-terminale de la protéine qui est détectée à la surface des neutrophiles apoptotiques. Il se pourrait que, lors de l'apoptose, la portion amino-terminale reste attachée à la membrane et que l'autre extrémité de la protéine soit transloquée vers la surface cellulaire. Il se pourrait tout de même que

d'autres portions de la protéine soient exposées à la surface, mais inaccessibles aux anticorps que nous avons utilisés. Les quatre anticorps anti-vimentine ont été utilisés en immunobuvardage de type Western afin de déterminer si un fragment spécifique de la protéine serait reconnu uniquement par le clone V9, l'anticorps reconnaissant la vimentine à la surface des neutrophiles. Il s'avère que tous les fragments reconnus par l'anticorps V9 sont détectés par l'un ou l'autre des trois autres anticorps anti-vimentine en immunobuvardage de type Western. Cette technique ne nous a donc pas permis de déterminer si un fragment spécifique de la protéine est exposé à la surface.

Nous n'avons pas détecté de lamine B₁ ni de vimentine dans le milieu extracellulaire de neutrophiles activés ou en apoptose par immunobuvardage de type Western. Puisqu'il s'agit d'une méthode de détection limitée (résolution des gels, anticorps utilisés), cette observation n'exclut pas totalement le fait que les protéines pourraient être sécrétées par les neutrophiles, lors de l'apoptose. Il a été observé que la vimentine est sécrétée par les macrophages (Mor-Vaknin *et al*, 2003) et détectée dans le sang (Xu *et al*, 2004). Cette vimentine sécrétée aurait des propriétés pro-inflammatoires, puisqu'elle joue un rôle dans la destruction des bactéries et dans la production de radicaux libres (Mor-Vaknin *et al*, 2003). De plus, il a été démontré que les neutrophiles stimulés avec de l'IL-8, du PMA ou du LPS libèrent dans le milieu extracellulaire des fibres nommées « neutrophil extracellular traps » (NET). Ces structures sont composées de constituantes des granules (élastase, cathepsine G, myéloperoxydase, lactoferrine et gélatinase) et du noyau (ADN, histones) qui ont la capacité de détruire les bactéries au niveau extracellulaire (Brinkmann *et al*, 2004). De plus, il a été récemment suggéré que la libération des NET est un événement précurseur à l'induction de l'apoptose des neutrophiles (Fuchs *et al*, 2007). Plusieurs protéines du cytosquelette, comme l'actine et la tubuline, étaient absentes des NET. Les auteurs n'ont toutefois pas mentionné si la vimentine et la lamine B₁ étaient présentes ou absentes de ces fibres extracellulaires (Brinkmann *et al*, 2004). Puisque la vimentine a été identifiée dans le protéome des granules spécifiques, tertiaires (Lominadze *et al*, 2005) et azurophiles (Lominadze *et al*, 2005; Feuk-Lagerstedt *et al*, 2007) et puisque ce sont des protéines des granules cytoplasmiques qui ont été détectées dans les NET, il se pourrait que la vimentine y soit présente également. De plus, la détection de chromatine dans les NET pourrait suggérer la présence de lamine B₁, une

protéine connue pour son attachement à l'ADN dans le noyau des cellules (Moir et Spann, 2001; Wolfner et Wilson, 2001). Cette hypothèse est cependant très incertaine, puisqu'il semblerait que la libération des NET est indépendante de l'activation des caspases (Fuhs *et al*, 2007).

Tel que mentionné dans la revue de littérature de cette thèse (voir page 24), il existe quelques hypothèses concernant la nature des événements responsables de l'apparition de maladies auto-immunes. Certains proposent que les infections virales ou microbiennes soient à l'origine de l'auto-immunité, d'autres mentionnent qu'il s'agirait d'une chute de mécanismes de régulation des lymphocytes auto-réactifs (Mocci, Lafferty et Howard, 2000). Il a également été suggéré que le bagage génétique serait en cause (Savill *et al*, 2002) et que l'élimination inappropriée des cellules apoptotiques pourrait mener à l'auto-immunité (Taylor *et al*, 2000; Manfredi *et al*, 2002; Savill *et al*, 2002).

Bien que l'expression de certaines protéines du cytosquelette à la surface des cellules pourrait en partie expliquer la formation d'auto-anticorps anti-cytosquelette retrouvés dans plusieurs cas de maladies auto-immunes, il ne faut pas oublier que nous avons observé les protéines des FI à la surface de neutrophiles apoptotiques provenant de personnes saines. La différence entre les personnes saines et celles développant une maladie auto-immune résiderait probablement dans la capacité de l'organisme à éliminer efficacement les cellules apoptotiques, qui pourraient stimuler une réponse auto-immune et aider à la formation de complexes immuns en se liant aux auto-anticorps. Les cellules apoptotiques expriment à leur surface de nombreux auto-antigènes ciblés par les auto-anticorps de patients souffrant de lupus systémique érythémateux. Par exemple, certains patients produisent des anticorps anti-phospholipides qui se lient à des molécules de phosphatidylsérines à la surface des cellules apoptotiques. Les anti-phospholipides opsonisent les cellules apoptotiques et induisent leur reconnaissance par les macrophages via les récepteurs Fc, ce qui convertit la réponse anti-inflammatoire du macrophage en une réponse pro-inflammatoire (Albert, 2004; Savill *et al*, 2002). De plus, si les cellules apoptotiques ne sont pas éliminées efficacement de l'organisme, ces dernières peuvent être reconnues et ingérées par les cellules dendritiques qui présentent les antigènes aux cellules T, menaçant ainsi une persistance de la présentation d'auto-antigènes au système

immunitaire (Luster, Alon et von Andrian, 2005). Chez l'humain, les macrophages de patients atteints de lupus ont de la difficulté à ingérer des cellules apoptotiques et il a été démontré que la quantité de neutrophiles apoptotiques dans le sang de ces patients était plus élevée, probablement une conséquence de l'élimination inefficace de ceux-ci de l'organisme (Donnelly *et al*, 2006).

Comme il a été mentionné dans quelques études (Propato *et al*, 2001; Boilard *et al*, 2003; Leong *et al*, 2008), nous suggérons que certaines cellules du sang, incluant les neutrophiles, pourraient participer aux événements impliqués dans l'auto-immunité via l'expression de protéines du cytosquelette à leur surface lors de l'apoptose. Tout comme les phospholipides, qui sont des molécules normalement exprimées à la surface de cellules provenant de personnes saines, nous avons observé que la vimentine et la lamine B₁ sont exprimées à la surface de neutrophiles normaux. Il serait donc peu probable que l'expression de FI à la surface des neutrophiles apoptotiques suffise à elle-seule à induire l'auto-immunité. Chez certains patients souffrant de maladies auto-immunes, des auto-anticorps anti-vimentine et anti-lamine B₁ circulant dans le sang pourraient se lier aux FI exposés à la surface des neutrophiles apoptotiques, être reconnus par les macrophages via leurs récepteurs Fc et induire une réponse inflammatoire. Les auto-anticorps anti-FI pourraient donc jouer le même rôle destructeur que les auto-anticorps anti-phospholipides. Bien que cette hypothèse n'ait jamais été démontrée jusqu'ici, elle est d'autant plus importante du fait que les neutrophiles sont présents en grandes quantités dans le sang et aux sites inflammatoires. Il serait donc intéressant de déterminer si des auto-anticorps provenant de patients atteints de différentes maladies auto-immunes parviennent à reconnaître les FI exposés à la surface des neutrophiles apoptotiques. Ce type d'expérience pourrait s'effectuer en marquant les neutrophiles apoptotiques avec des anticorps anti-vimentine (V9) et anti-lamine B₁ en cytométrie en flux. Nous pourrions déterminer si une pré-incubation des cellules avec du sérum de patients atteints de maladies auto-immunes empêche les deux anticorps mentionnés ci-haut de reconnaître les FI à la surface des neutrophiles apoptotiques. Les résultats pourraient être comparés avec ceux utilisant du sérum provenant de personnes saines.

Il est bien connu que les neutrophiles constituent une source importante d'auto-antigènes, plus particulièrement de ANCA (voir page 26). Les ANCA sont principalement associés à la protéinase-3, à la MPO et non aux protéines du cytosquelette. Il existe une étude mentionnant l'existence d'ANCA atypiques dans le sérum de patients souffrant de colite ulcéreuse, de cholangite sclérosante primitive, d'hépatite auto-immune ou de vasculite systémique. Ces P-ANCA atypiques reconnaissent des antigènes nucléaires de neutrophiles. Il a été notamment démontré que la lamine B₁ était co-localisée avec un de ces antigènes (Terjung *et al*, 1998). Il est difficile de déterminer si ce type d'ANCA atypique pourrait reconnaître la lamine B₁ à la surface des neutrophiles apoptotiques, puisque qu'il a été démontré qu'il reconnaît des épitopes intracellulaires.

Il est connu que les cellules T jouent un rôle important dans la polyarthrite rhumatoïde (Pope, 2002). Cependant, un des leucocytes ayant la plus grande capacité d'infliger des dommages aux articulations est le neutrophile, présent en grandes quantités dans le liquide synovial (Edwards et Hallett, 1997). Le liquide synovial contient également de grandes quantités de complexes immuns et est une riche source de cytokines sécrétées par les neutrophiles et les macrophages. L'ingestion de complexes immuns et l'activation par les cytokines environnantes provoquent la flambée oxydative et la dégranulation, ce qui contribue à la destruction des tissus (Edwards et Hallett, 1997; Witko-Sarsat *et al*, 2000). Tel que mentionné précédemment, il existe une forte association entre la présence d'auto-anticorps anti-protéines citrullinées, incluant les anti-vimentine citrullinée, et le développement de la polyarthrite rhumatoïde. Les auto-anticorps reconnaissant des protéines citrullinées sont détectés bien avant l'apparition des premiers signes cliniques de l'arthrite, ce qui indique que ceux-ci pourraient jouer un rôle dans le développement de la maladie. La pathologie pourrait se déclencher lorsqu'il y a expression d'auto-antigènes citrullinés dans les articulations et que ceux-ci interagissent avec les auto-anticorps anti-protéines citrullinées, menant à la formation de complexes auto-immuns, à l'activation du complément et à l'attraction de cellules inflammatoires (van Gaalen *et al*, 2005). La citrullination des protéines est un événement naturel se produisant lors de l'apoptose des cellules et durant l'inflammation (Asaga, Yamada et Senshu, 1998; Vossenaar *et al*, 2004b). Par contre, moins de 1% des personnes saines développent des anticorps anti-protéines citrullinées, ce qui plaide en faveur de la nécessité d'une prédisposition

génétique pour le développement de l'arthrite rhumatoïde (van Gaalen *et al*, 2005). PAD4, une enzyme responsable de la citrullination des protéines, a été détectée dans le cytoplasme de neutrophiles (van Gaalen *et al*, 2005; Migliorini *et al*, 2005). Il se pourrait alors que la vimentine soit citrullinée lors de l'apoptose des neutrophiles et qu'elle soit exposée à la surface des cellules sous cette forme.

Rôle de la vimentine dans l'inflammation aiguë in vivo et dans diverses fonctions des neutrophiles ex vivo.

Le fait que nous ayons détecté la vimentine et la lamine B₁ à la surface des neutrophiles humains a aiguë notre curiosité en ce qui regarde le rôle des FI dans la physiologie des neutrophiles et lors de la réponse inflammatoire aiguë. Nos connaissances sur le rôle des différentes protéines du cytosquelette dans la physiologie des neutrophiles sont limitées, surtout celles concernant les FI. Puisqu'il est difficile d'étudier les fonctions d'une protéine donnée chez les neutrophiles à l'aide de techniques moléculaires classiques, les animaux déficients en cette protéine d'intérêt s'avèrent un outil d'analyse très intéressant. Toute fonction déficiente chez l'animal est un indice que la protéine joue un rôle dans celle-ci. Nous avons donc étudié le rôle de la vimentine lors de l'inflammation aiguë *in vivo* et dans diverses fonctions des neutrophiles *ex vivo*, en initiant une colonie de souris *Vim*^{-/-} (Colucci-Guyon *et al*, 1994). Cette option est malheureusement inaccessible pour étudier les fonctions de la lamine B₁, puisque les souris déficientes en cette protéine meurent quelques minutes après leur naissance (Vergnes *et al*, 2004).

Nous nous attendions à observer des différences entre les souris *Vim*^{+/+} et *Vim*^{-/-}, puisque certains défauts avaient été découverts chez les souris *Vim*^{-/-}, entre autres, au niveau de la motilité des fibroblastes (Eckes *et al*, 1998; Eckes *et al*, 2000) et du système vasculaire (Terzi *et al*, 1997). Un autre point important à considérer était que la vimentine constitue la seule protéine constituant les FI cytoplasmiques chez les neutrophiles. Plusieurs problèmes ont été découverts chez les souris déficientes en diverses protéines des FI cytoplasmiques, que ce soit les souris déficientes en kératines, en desmine ou en GFAP, lorsqu'aucun phénomène de compensation n'était apparent. De plus, l'étude des souris déficientes en gelsoline nous a révélé que l'absence d'une seule protéine du cytosquelette pouvait avoir plusieurs conséquences. Des problèmes au niveau de la guérison des

blessures et de la motilité des fibroblastes avaient été observés chez les souris *Gsn*^{-/-}. Les neutrophiles *Gsn*^{-/-} sont plus nombreux dans le sang, prennent davantage de temps pour se rendre au site inflammatoire (Witke *et al*, 1995), ont de la difficulté à phagocyter des particules via leur récepteur Fc (Serrander *et al*, 2000) et leur apoptose spontanée est retardée (Kothakota *et al*, 1997). Ces observations nous laissent présager que des problèmes semblables pourraient être découverts chez les neutrophiles de souris *Vim*^{-/-}.

Pour déterminer le rôle de la vimentine lors d'une réponse inflammatoire aiguë *in vivo*, nous avons utilisé le modèle de la poche d'air murine en attirant les cellules par différents agents. Le LPS est reconnu pour attirer en majorité des neutrophiles dans la poche d'air après 6h. À notre grande surprise, la quantité et le type de cellules recueillies étaient les mêmes chez les souris *Vim*^{+/+}, *Vim*^{+/-} et *Vim*^{-/-}. Nous pouvions donc exclure l'hypothèse de la compensation par la lamine B₁, puisque les niveaux de la protéine étaient identiques chez tous les types de souris et que la morphologie des neutrophiles, incluant le noyau polylobé, était normale en absence de vimentine. Nous pouvions également rejeter l'hypothèse d'une quantité de leucocytes différente dans le sang, puisque la quantité de lymphocyte, de monocytes-macrophages et de neutrophiles était la même chez tous les types de souris. Ce résultat est différent de ce qui a été observé chez les souris déficientes en gelsoline, puisqu'il a été démontré que celles-ci ont plus de neutrophiles dans le sang (Witke *et al*, 1995).

Afin de déterminer si la réponse identique était due à l'utilisation du LPS, nous avons injecté de l'IL-21 dans la poche d'air, qui est reconnu pour attirer à la fois des neutrophiles et des monocytes-macrophages (Pelletier, Bouchard et Girard, 2004). L'intérêt se trouvait également dans le fait que l'IL-21 cible un autre récepteur à la surface des cellules, soit le récepteur à l'IL-21 composé du IL-21R α et du CD132, tandis que le LPS cible le « Toll-like receptor-4 ». La réponse fut identique chez les souris *Vim*^{+/+} et *Vim*^{-/-}. Les résultats obtenus avec l'IL-21 nous indiquent également que les monocytes-macrophages se rendent au site inflammatoire, même en absence de vimentine. Nous avons alors injecté de la carraghénine, une molécule reconnue pour attirer de grandes quantités de neutrophiles à plus long terme, soit après 24h. Une fois de plus, aucune différence n'a été observée au niveau de la quantité et des types de cellules

attirées entre les souris *Vim*^{+/+} et *Vim*^{-/-}, indiquant que la vimentine n'est pas essentielle à une réponse inflammatoire prolongée. Toutes ces observations suggèrent que la réponse inflammatoire aiguë est normale en absence de vimentine, peu importe l'agent inflammatoire injecté. De plus, l'absence de cellules dans la poche d'air, après 24h chez les souris ayant reçu du LPS, indique que la résolution de l'inflammation est normale chez tous les types de souris utilisés dans cette étude.

L'absence de réponse inflammatoire aberrante chez les souris *Vim*^{-/-} suggère que la vimentine n'est pas essentielle à la production de molécules chimioattractantes par les cellules tapissant la poche d'air (macrophages, fibroblastes). Le criblage de facteurs de chimioattraction («antibody array») indique que la production de molécules chimioattractantes est la même chez les souris *Vim*^{-/-} et *Vim*^{+/+}. L'utilisation de plusieurs agonistes (LPS, IL-21, carraghénine) suggère que l'expression des récepteurs ciblés par ces agonistes, à la surface des cellules tapissant la poche d'air, est normale même en absence de vimentine. De plus, ces résultats suggèrent que la vimentine n'est pas essentielle à la réponse des neutrophiles aux divers agents chimioattractants, autant au niveau de la chimioattraction que de la diapédèse. Il serait tout de même intéressant de vérifier *in vitro* l'expression des récepteurs de chimiokines à la surface des cellules tapissant la poche et à la surface des neutrophiles chez les souris déficientes en vimentine.

Le modèle de la poche d'air murine s'avère un bon outil d'analyse pour étudier les mécanismes d'inflammation aiguë *in vivo* et la cavité produite est similaire à du tissu synovial. Chez les souris *Vim*^{-/-}, l'inflammation aiguë est normale dans ce modèle expérimental, ce qui indique que la vimentine ne joue pas un rôle essentiel dans l'établissement de la réponse inflammatoire. L'équipe de Nieminen (2006) a étudié l'inflammation intrapéritonéale en réponse à un seul stimulus (PBS contenant 5% de « proteose peptone » et 10 ng d'IL-1), à un seul temps (25h), et a recueilli davantage de neutrophiles chez les souris *Vim*^{-/-} par rapport aux macrophages résidents. Pour notre part, nous avons testé plusieurs agonistes, ciblant différents récepteurs à la surface des cellules, à différentes périodes de temps (6h et 24h), et nous n'avons observé aucune différence entre les souris déficientes en vimentine et celles normales. La différence entre nos résultats et ceux de l'équipe de Nieminen pourrait résider dans le fait que les deux

modèles inflammatoires sont différents en termes de cellules ciblées par les agents injectés et du temps requis pour attirer les leucocytes au site inflammatoire.

Nous démontrons dans cette étude que plusieurs fonctions des neutrophiles murins sont normales en absence de vimentine. Ceci inclut l'attraction des cellules vers un site inflammatoire *in vivo*, l'augmentation du calcium intracellulaire, la production de radicaux libres, la phagocytose via les récepteurs Fc et la modulation de l'apoptose des cellules *ex vivo*. Nos résultats concernant la production de radicaux libres par les neutrophiles déficients en vimentine corroborent une observation similaire (Chen *et al*, 2003b), mentionnant brièvement que les neutrophiles de souris *Vim*^{-/-} ont une flambée oxydative dépendante de l'adhésion via les β 2-intégrines normale, suggérant que la vimentine n'est pas essentielle à la production de radicaux libres et à la signalisation intracellulaire via les intégrines. L'étude des souris déficientes en desmine a révélé que les myocytes étaient davantage susceptibles d'apoptose, probablement grâce à un fonctionnement déficient et une morphologie anormale des mitochondries (Milner *et al*, 1996). De plus, le mécanisme oxydatif de fibroblastes *Vim*^{-/-} immortalisés est déficient au niveau de l'activité des mitochondries (Bannikova *et al*, 2005; Tolstonog *et al*, 2005). Ce ne semble pas être le cas des neutrophiles déficients en vimentine, puisque le produit que nous avons utilisé pour mesurer la flambée oxydative, la dihydrorhodamine 123 (DHR123), mesure les radicaux libres totaux intracellulaires, incluant ceux provenant des mitochondries.

Bien qu'il ait été suggéré par des études *in vitro* que la vimentine joue un rôle important lors de l'apoptose chez plusieurs types cellulaires (Morishima, 1999; Belichenko, Morishima et Separovic, 2001; Byun *et al*, 2001; Schietke *et al*, 2006), nous n'avons observé aucune différence dans les niveaux d'apoptose des neutrophiles *Vim*^{-/-} et *Vim*^{+/+}, que ce soit lors de l'apoptose spontanée, induite ou retardée. Ceci indique que la vimentine n'est pas essentielle au fonctionnement de la machinerie apoptotique des neutrophiles murins. Nous avons utilisé principalement la technique de marquage des cellules à l'annexine V en cytométrie en flux afin de mesurer les niveaux d'apoptose des neutrophiles murins. Il a été suggéré que la vimentine jouerait un rôle dans le transport intracellulaire des lipides (Gillard *et al*, 1998). Or, nous avons observé par la technique du

marquage à l'annexine V que les niveaux d'apoptose spontanée et induite par la VAA-I et l'As₂O₃ étaient semblables chez les neutrophiles *Vim*^{+/+}, *Vim*^{+/-} et *Vim*^{-/-}. Ceci suggère que le « flip flop » des phospholipides et l'exposition des phosphatidylsérines sont fonctionnels, même en absence de vimentine. De plus, ceci indique que les neutrophiles apoptotiques déficients en vimentine seront probablement reconnus et éliminés efficacement par les macrophages et autres phagocytes environnants via cette exposition des phosphatidylsérines en conditions inflammatoires.

Le rôle des neutrophiles lors de l'inflammation aiguë implique une multitude de mécanismes. Il est donc difficile de déterminer si toutes les fonctions de cette cellule sont normales en absence de vimentine. Le rôle de la vimentine dans plusieurs autres fonctions des neutrophiles, comme l'adhésion et la dégranulation *in vitro*, restent à déterminer. Il se pourrait que la vimentine joue un rôle dans ces deux fonctions, puisqu'elle régule l'affinité des intégrines chez les cellules endothéliales (Gonzales *et al*, 2001; Tsuruta et Jones, 2003) et qu'elle se trouve dans les granules spécifiques, tertiaires (Lominadze *et al*, 2005) et azurophiles (Lominadze *et al*, 2005; Feuk-Lagerstedt *et al*, 2007) de neutrophiles.

Il a été récemment observé que l'adhésion des lymphocytes sur les cellules endothéliales *in vitro* impliquait une réorganisation de la vimentine afin de former une structure d'ancrage entre les deux cellules. L'adhésion et les niveaux d'expression de β 1-intégrines étaient plus faibles chez les lymphocytes déficients en vimentine. Une implication de la vimentine dans la formation d'une structure d'ancrage entre les neutrophiles et les cellules endothéliales n'a cependant pas été observée et les niveaux d'adhésion entre les neutrophiles déficients en vimentine et les cellules endothéliales n'ont pas été étudiés *in vitro*. En microscopie intravitale, la quantité de neutrophiles roulant sur la paroi des vaisseaux sanguins était normale chez les souris *Vim*^{-/-}, tandis que leur vitesse (temps requis aux neutrophiles pour rouler sur un segment donné du vaisseau sanguin) était plus élevée (Nieminen *et al*, 2006). Ces observations suggèrent que l'action des molécules d'adhésion à la surface des neutrophiles serait compromise en absence de vimentine. Tel que mentionné précédemment, il a été toutefois démontré que la flambée oxydative dépendante des β 2-intégrines est normale chez les neutrophiles *Vim*^{-/-} (Chen *et al*, 2003b),

indiquant un fonctionnement normal des molécules d'adhésion. Il serait tout de même intéressant de mesurer la distribution et les niveaux d'expression de β 2-intégrines à la surface des neutrophiles déficients en vimentine.

Bien que nous ayons démontré que la réponse inflammatoire aiguë en absence de vimentine se déroule normalement, il ne faut pas oublier que les souris *Vim*^{-/-} sont maintenues dans un environnement contrôlé. Il est de plus en plus reconnu que la vimentine joue un rôle dans diverses fonctions cellulaires impliquées en périodes de stress (Ivaska *et al*, 2007). Il serait alors intéressant de déterminer si les souris *Vim*^{-/-} sont davantage sensibles aux infections par rapport à des souris normales. Par exemple, il a été démontré que les souris déficientes en plastine, une protéine liant les filaments d'actine, n'arrivent pas à contrôler une infection aux *Staphylococcus Aureus* dans un modèle d'abcès sous-cutané. Pourtant, la migration des neutrophiles au site inflammatoire, ainsi que l'ingestion des bactéries opsonisées avec du sérum murin, se faisaient normalement. Le défaut principal était que la flambée oxydative dépendante d'une adhésion des neutrophiles via les β 2-intégrines était déficiente en absence de plastine (Chen *et al*, 2003b). Bien que les auteurs de cette étude aient démontré que cette flambée oxydative était normale chez les neutrophiles *Vim*^{-/-}, il se pourrait que d'autres mécanismes impliqués dans la destruction des micro-organismes soient déficients en absence de vimentine.

Les résultats présentés dans cette étude n'excluent pas le fait que la vimentine pourrait jouer un rôle important dans plusieurs fonctions du système immunitaire chez divers types cellulaires. Il se pourrait que la vimentine soit davantage importante chez les macrophages, puisqu'il a été démontré que ces cellules pouvaient sécréter la vimentine dans le milieu extra-cellulaire et que la protéine avait des propriétés microbicides (Mor-Vaknin *et al*, 2003). Il semblerait également que la vimentine est davantage importante dans les fonctions des lymphocytes, comme il a été suggéré par l'équipe de Nieminen (2006). De plus, il a été démontré *in vitro* que la vimentine joue un rôle dans l'activation des mastocytes, où elle se lie à Fyn, une kinase de la famille Src connue pour avoir un rôle essentiel dans la dégranulation chez ce type cellulaire (Nahm *et al*, 2003).

Notre étude ne constitue pas la première à n'observer aucune différence entre les souris *Vim*^{-/-} et des souris normales. L'expression du gène de la vimentine est induite ou augmentée dans certains cancers, constituant un marqueur de progression tumorale maligne et suggérant un rôle de la protéine dans les changements au niveau du profil d'expression des intégrines et dans la formation de métastases (Kryszke et Vicart, 1998). Afin de déterminer si la vimentine est impliquée dans la tumorigenèse, l'équipe de Langa (2000) a effectué des injections sous-cutanées de cellules souches embryonnaires *Vim*^{-/-} ou *Vim*^{+/+} à des souris *Vim*^{-/-} ou *Vim*^{+/+}. Or, aucune différence significative n'a été observée au niveau de l'incidence des tumeurs, la taille ou la vascularisation des teratocarcinomes obtenus avec toutes les combinaisons possibles. Ces observations suggèrent que la vimentine n'est pas essentielle à la croissance tumorale et à la différenciation *in vivo* (Langa *et al*, 2000).

Le fait que nous n'ayons observé aucune différence dans la réponse inflammatoire *in vivo* et dans les fonctions des neutrophiles *ex vivo*, entre les souris *Vim*^{-/-} et *Vim*^{+/+}, n'exclut pas le fait que la vimentine jouerait un rôle important lors de ces mêmes processus chez l'humain. Certains éléments diffèrent entre la souris et l'humain. Par exemple, les quantités et proportions des différents types de leucocytes dans le sang ne sont pas les mêmes. Les souris ont beaucoup moins de neutrophiles et davantage de lymphocytes (Doeing, Borowicz et Crockett, 2003). Chez les neutrophiles humains, la molécule chimioattractante la plus étudiée est l'IL-8, qui est le premier stimulus à la migration des neutrophiles dans plusieurs cas de réponses inflammatoires (Wagner et Roth, 2000). Bien que l'injection d'IL-8 humaine dans la poche d'air murine induit l'inflammation (Perretti *et al*, 1993), les souris n'en produisent pas (Wagner et Roth, 2000; Ley, 2002).

Puisqu'il a été observé que la vimentine et la lamine B₁ sont exposées à la surface des neutrophiles apoptotiques, il se pourrait que l'expression de ces deux protéines à la surface serve à la reconnaissance des cellules par les phagocytes (« eat-me signal »). Le fait que nous n'ayons pas observé de persistance de l'inflammation, après une période de 24h chez les souris déficientes en vimentine, nous permet de supposer que l'expression de la vimentine à la surface des neutrophiles apoptotiques n'est pas essentielle à leur reconnaissance par les phagocytes environnants. Il est toutefois risqué de conclure hors de

tout doute sur une telle affirmation. Il est difficile de déterminer clairement le rôle des différentes protéines impliquées dans la reconnaissance des cellules apoptotiques par les macrophages, puisqu'il existe une redondance dans cette signalisation. L'absence d'un « eat-me signal » à la surface des cellules apoptotiques peut être palliée par la présence d'une autre molécule prenant le relai. Des expériences *in vitro* devraient être effectuées afin de déterminer si la vimentine et la lamine B₁ constituent des « eat-me signals » à la surface des neutrophiles apoptotiques. Ces expériences pourraient être effectuées en utilisant des anticorps anti-vimentine et anti-lamine B₁ afin de tenter de bloquer la reconnaissance entre les neutrophiles apoptotiques et des macrophages en culture, autant chez l'humain que chez la souris. Nous pourrions également profiter du fait que les neutrophiles de souris *Vim*^{-/-} n'ont pas de vimentine afin de déterminer s'ils sont moins reconnus par des macrophages murins par rapport à des cellules provenant de souris normales. Puisqu'il a été démontré que les macrophages activés expriment la vimentine à leur surface (Mor-Vaknin *et al*, 2003) et qu'il a été suggéré qu'elle serait impliquée dans l'interaction entre les cellules endothéliales et les leucocytes (Xu *et al*, 2004), il serait également intéressant de déterminer si la vimentine à la surface des macrophages est impliquée lors de la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques. Cette hypothèse pourrait être étudiée en effectuant des expériences *in vitro* de phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages en utilisant des anticorps anti-vimentine et des macrophages provenant de souris *Vim*^{-/-}.

Les souris knockout constituent un bon outil d'analyse dans l'étude des fonctions d'une protéine spécifique. Ceci s'avère d'autant plus intéressant dans l'étude du rôle de certaines protéines dans la physiologie des neutrophiles *in vivo* et *ex vivo*, puisque ces cellules ne prolifèrent pas. La quantité de souris déficientes en protéines du cytosquelette est toutefois limitée. Bien que dans le cadre de cette étude nous n'ayons observé aucune différence entre les souris *Vim*^{+/+} et *Vim*^{-/-}, plusieurs différences ont été détectées dans diverses fonctions des neutrophiles de souris déficientes en gelsoline (Witke *et al*, 1995; Kothakota *et al*, 1997; Serrander *et al*, 2000). Il serait alors intéressant de développer des souris déficientes en protéines comme la paxilline, la vinculine et la lamine B₂ afin de déterminer le rôle de ces protéines dans le développement embryonnaire et dans la physiologie de différents systèmes *in vivo*.

Contribution à l'avancement des connaissances

Cette étude est la première à vérifier systématiquement la présence de plusieurs protéines du cytosquelette provenant des trois types de filaments (MF, FI, MT) à la surface d'une cellule sous différentes conditions expérimentales (activation, apoptose). Nous démontrons pour la première fois l'expression de protéines du cytosquelette, la vimentine et la lamine B₁, à la surface des neutrophiles humains apoptotiques. Ceci constitue également la première étude démontrant que la lamine B₁ est exposée à la surface d'une cellule. Le retard de l'apoptose par différents agents ou l'inhibition des caspases ont pour effet d'inhiber ou réduire l'expression des FI à la surface des neutrophiles. Au niveau intracellulaire, nous démontrons pour la première fois que le retard de l'apoptose par différents agents a pour effet de réduire le niveau de clivage intracellulaire et stimuler la synthèse *de novo* des FI. Ces observations suggèrent que les neutrophiles apoptotiques pourraient jouer un rôle dans le développement d'auto-anticorps dirigés contre les protéines du cytosquelette, qui sont fréquemment retrouvés dans de nombreux cas de maladies inflammatoires.

Nous sommes les premiers à utiliser le modèle de la poche d'air murine chez des souris déficientes en vimentine (*Vim*^{-/-}) afin d'étudier le rôle de la vimentine lors de l'inflammation aiguë *in vivo* et de diverses fonctions des neutrophiles *ex vivo*. L'utilisation de trois agents pro-inflammatoires attirant les leucocytes par différents mécanismes nous a permis de démontrer que la réponse inflammatoire aiguë est normale en absence de vimentine, peu importe l'agent inflammatoire injecté. De plus, l'absence de cellules dans la poche d'air après une période de 24h chez les souris ayant reçu du LPS, indique que la résolution de l'inflammation est normale chez les souris *Vim*^{-/-}. La technique de criblage de facteurs de chimioattraction («antibody array») indique que la production de molécules chimioattractantes est la même chez les souris *Vim*^{+/+} et *Vim*^{-/-}. Nous démontrons finalement que plusieurs fonctions des neutrophiles *Vim*^{-/-} sont normales *ex vivo*. Ceci inclut la morphologie cellulaire, les niveaux d'expression de la lamine B₁, l'augmentation du calcium intracellulaire, la production de radicaux libres, la phagocytose via les récepteurs Fc et la modulation de l'apoptose des cellules *ex vivo*.

APPENDICE A

***VISCUM ALBUM* AGGLUTININ-I INDUCES DEGRADATION OF CYTOSKELETAL PROTEINS IN LEUKAEMIA PLB-985 CELLS DIFFERENTIATED TOWARD NEUTROPHILS: CLEAVAGE OF NON-MUSCLE MYOSIN HEAVY CHAIN-IIA BY CASPASES.**

Titre

***VISCUM ALBUM* AGGLUTININ-I INDUCES DEGRADATION OF CYTOSKELETAL PROTEINS IN LEUKAEMIA PLB-985 CELLS DIFFERENTIATED TOWARD NEUTROPHILS: CLEAVAGE OF NON-MUSCLE MYOSIN HEAVY CHAIN-IIA BY CASPASES.**

Auteurs

Valérie Lavastre, François Binet, Eliane Moisan, Sonia Chiasson et Denis Girard

Accepté pour publication dans

British Journal of Haematology

Contribution personnelle

J'ai participé à la planification et à la réalisation des expériences qui ont permis d'obtenir les résultats des figures 5A et 6 (page 107). J'ai contribué à l'analyse des résultats et aux analyses statistiques de ces mêmes figures. J'ai également effectué la mise au point des conditions nécessaires à la détection intracellulaire de la chaîne lourde IIA de la myosine non musculaire par immunobuvardage de type Western. Ma contribution à cet article est évaluée à environ 20%.

Contribution des co-auteurs

Valérie Lavastre : Elle a planifié et réalisé les expériences de microscopie des figures 1A et B (page 104), ainsi que les immunobuvardages de type Western des figures 2, 3 (page 105) et 4A (page 106). Elle a contribué à l'analyse des résultats et aux analyses statistiques de ces mêmes figures.

François Binet : Il a planifié et réalisé les expériences de microscopie à fluorescence des figures 1C (page 104) et 4B (page 106). Il a contribué à l'analyse des résultats et aux analyses statistiques de ces mêmes figures.

Sonia Chiasson : Elle a effectuée les expériences de RT-PCR afin de déterminer l'expression des différentes caspases chez les PLB-985 et les neutrophiles (figure 5B, page 107). Elle a contribué à l'analyse des résultats et aux analyses statistiques de ces mêmes figures.

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

Résumé en français de l'article

Le rôle de l'agent anti-cancéreux *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) chez les cellules de leucémie PLB-985, différenciées en un phénotype de neutrophiles par le diméthylsulfoxyde (PLB-985D), n'a jamais été étudié. Cette étude a enquêté à savoir si la VAA-I peut induire un démantèlement du cytosquelette chez les cellules PLB-985D, comme il a été observé précédemment chez les cellules PLB-985 non différenciées. La VAA-I induit l'apoptose des cellules PLB-985D, en démontrant par la cytologie et par la dégradation de la gelsoline, un événement reconnu pour se produire via l'activation de la caspase-3. La VAA-I a induit le démantèlement du cytosquelette, basé sur la rupture du réseau de F-actine et le clivage de la paxilline, la vimentine et la lamine B₁. De plus, nous démontrons, pour la première fois, que la chaîne lourde IIA de la myosine non musculaire (NMHC-IIA) est clivée par un traitement à la VAA-I. La dégradation de la NMHC-IIA a été inhibée par l'inhibiteur de caspases z-VAD-fmk chez les cellules PLB-985D et les neutrophiles. Cependant, contrairement à la lamine B₁, aucune NMHC-IIA n'a été détectée à la surface des neutrophiles apoptotiques. En conclusion, les cellules PLB-985D ont répondu de façon similaire aux neutrophiles concernant la dégradation des protéines du cytosquelette étudiées. Les cellules PLB-985D pourraient donc procurer un substitut approprié de neutrophiles lors d'expériences de criblage, prévenant des isolations cellulaires de neutrophiles répétées.

***Viscum album* agglutinin-I induces degradation of cytoskeletal proteins in leukaemia PLB-985 cells differentiated toward neutrophils: cleavage of non-muscle myosin heavy chain-IIA by caspases**

Valérie Lavastre, François Binet, Éliane Moisan, Sonia Chiasson and Denis Girard

INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Pointe-Claire, QC, Canada

Summary

The role of the anti-cancer agent *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) in leukaemia PLB-985 cells differentiated toward a neutrophil-like phenotype by dimethylsulphoxide (PLB-985D) has never been studied. This study investigated whether or not VAA-I can induce cytoskeletal breakdown in PLB-985D cells, as previously observed in undifferentiated PLB-985 cells. VAA-I was found to induce apoptosis in PLB-985D cells, as assessed by cytology and by degradation of gelsolin, an event known to occur via caspase-3 activation. VAA-I induced cytoskeletal breakdown based on the disruption of the F-actin network and cleavage of paxillin, vimentin and lamin B₁. In addition, we demonstrated, for the first time, that non-muscle myosin heavy chain IIA (NMHC-IIA) was cleaved by VAA-I treatment. Degradation of NMHC-IIA was reversed by the pan caspase inhibitor z-VAD-fmk in PLB-985D cells and neutrophils. However, unlike lamin B₁, no NMHC-IIA was detected on the cell surface of apoptotic neutrophils. In conclusion, PLB-985D cells responded in a similar manner to neutrophils regarding the degradation of the tested cytoskeletal. Therefore, PLB-985D cells may provide a suitable substitute for neutrophils in screening experiments, preventing extensive neutrophil cell isolation.

Keywords: leukaemia cells, neutrophils, cytoskeleton, caspases, myosin.

Received 2 April 2007; accepted for publication 18 May 2007

Correspondence: Denis Girard, PhD, INRS-Institut Armand-Frappier, 245 boul. Hymus, Pointe-Claire (PQ), QC, Canada, H9R 1G6. E-mail: denis.girard@iaf.inrs.ca

Although the cytoskeleton is known to undergo dramatic changes during apoptosis, the list of cytoskeletal proteins known to be degraded in haematopoietic cells is far from being complete. This is particularly true for granulocytes, which are known to exert several functions requiring cytoskeleton rearrangements, including respiratory burst, chemotaxis, adhesion, phagocytosis and apoptosis (Bengtsson *et al*, 1993, 2006; Kothakota *et al*, 1997; Anderson *et al*, 2000; Robinson & Badwey, 2002; Grzanka *et al*, 2003; Veselska *et al*, 2003). Among the cytoskeletal proteins, actin has been (and is still) the most studied in neutrophils (Bengtsson *et al*, 1993, 2006), probably due to the fact that several laboratories investigate F-actin polymerisation in activated neutrophils using flow cytometry, which is a very simple and rapid method. In the past few years, studies performed in apoptotic cells have identified several cytoskeletal proteins as caspase substrates

(Brancolini *et al*, 1995; Sanghavi *et al*, 1998; Nicholson, 1999; Byun *et al*, 2001; Chen *et al*, 2003; Cho & Johnson, 2004). Because of our general interest in granulocytes, we conducted experiments in order to identify which cytoskeletal proteins are cleaved by caspases during apoptosis. We have previously demonstrated that the microfilament-associated proteins (MFAPs) gelsolin and paxillin, but not vinculin, are cleaved by the plant lectin *Viscum album* Agglutinin-I (VAA-I) in apoptotic mature human neutrophils (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002) as well as in promyelocytic PLB-985 cells, mature eosinophils and eosinophilic AML14.3D10 cells (Lavastre *et al*, 2005a,b). The two intermediate filament (IF) proteins vimentin and lamin B, known to be expressed in neutrophils, were also found to be cleaved by VAA-I-induced caspases in neutrophils, PLB-985 cells, eosinophils and AML14.3D10 cells (Lavastre *et al*, 2002, 2005a,b). In addition

to vinculin, VAA-I did not promote cleavage of α - and β -tubulin in granulocytes (Lavastre *et al*, 2002, 2005a,b), suggesting that existence of a selective mechanism for cytoskeletal protein degradation.

Factors that modulate apoptosis and the execution phase of apoptosis may vary from cell to cell, and because several common caspase substrates are not expressed in neutrophils (Bhatia *et al*, 1995; Sanghavi *et al*, 1998; Santos-Beneit & Mollinedo, 2000; Moulding *et al*, 2001) it is important to identify caspase substrates specific to these cells. In addition, because elimination of apoptotic neutrophils by professional phagocytes, such as macrophages, is important for the resolution of inflammation, searching for new pro-apoptotic agents and/or new targets to these agents represent an interesting avenue of research for developing or ameliorate therapeutic strategies in inflammatory disorders. Because we have recently demonstrated that the MFAP gelsolin is fragmented by caspases in VAA-I-induced human neutrophils (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002), we hypothesised that several other cytoskeletal proteins may be targets to caspases. The present study found that non-muscle myosin heavy chain IIA (NMHC-IIA) was cleaved by VAA-I in apoptotic granulocytes, including dimethylsulphoxide (DMSO)-differentiated PLB-985 (PLB-985D) and peripheral human neutrophil cells.

Methods

Chemicals and agonists

The monoclonal antibodies to human cytoskeletal proteins (anti-gelsolin, clone GS-2C4; anti-vinculin, clone Vin-11-5; anti-vimentin, clone Vim 13.2; anti- α -tubulin, clone B-5-1-2; anti-myosin IIA (non-muscle) and the plant lectin VAA-I, a potent inducer of apoptosis (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON, Canada). The pan caspase inhibitor, z-VAD-fmk (caspase-1, -3, -4 and -7) was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA, USA) and dissolved in endotoxin-tested DMSO (Sigma, St Louis, MO, USA) as previously published. The polyclonal anti-lamin B₁ antibody (clone C-20) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

Cell cultures and differentiation

Human myelomonoblastic cell line PLB-985 cells (a gift from Dr Y. Pommier, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA) were cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, in RPMI-1640 complete medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics; 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). Cells were cultivated at a cell density between 2×10^5 /ml and 1×10^6 /ml and the medium was changed thrice a week. For differentiation of PLB-985/HL-60 cells toward the neutrophil-like phenotype, 1-25% (v/v) DMSO (Lavastre *et al*, 2002, 2005a) was added to the culture for 6 d and the efficiency of the differentiation was

evaluated by the Nitroblue tetrazolium (NBT; Sigma) dye reduction (blue-black formazan deposits). Experiments were conducted with an efficiency of cell differentiation >75%. Cell viability was systematically verified with trypan blue exclusion before performing the different experiments and was routinely >98%.

Granulocyte isolation

Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Baie D'urfee, QC, Canada), as previously described (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002, 2005a,b). Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to our institutionally approved procedures. Experiments were performed when cell purity was >95% as verified by cytology from cytocentrifuged preparations coloured by the Hema 3 Stain Set (Biochemical Sciences Inc., Swedesboro, NJ, USA). Cell viability was verified by trypan blue exclusion and was always >98%.

Immunofluorescence

Cells were incubated as specified and for the indicated times. Then, cells were spun on prewashed microscope slides for 2 min at 300 g and fixed/permeabilised with a solution of 2% paraformaldehyde -0.005% digitonin for 5 min at 37°C. After several washes in phosphate-buffered saline (PBS)-1.25% bovine serum albumin (BSA), slides were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-phalloidin (1:50), the anti-NMHC-IIA antibody (1:50) or the respective isotypic control for 30 min at 37°C. For NMHC-IIA detection, slides were washed again and incubated with a goat anti-rabbit FITC-conjugated antibody (1:50), for 30 min at 37°C. Slides were visualised at 400 \times with a Leica microscope (Deerfield, IL, USA) equipped with a fluorescent lamp.

Assessment of apoptosis

Cells (1×10^6 /ml) were untreated or treated with 1000 ng/ml VAA-I for 22 h and apoptosis was assessed by staining DNA with Hoechst reagent. Briefly, an aliquot of 2×10^5 cells was harvested and washed twice with PBS. Cells were then fixed in 25% ethanol, stained with Hoechst (5.6 μ g/ml) and incubated at 37°C for 30 min and observed with the above fluorescent microscope. Images were digitalised using ImagePro Plus software (version 4.0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Cells harboring characteristic-segmented nuclei were scored as apoptotic.

Western blot and degradation of cytoskeletal proteins

PLB-985 and X-CGD cells (1×10^6 cells/ml in 24-well plate) were incubated with or without 1000 ng/ml VAA-I in the

presence or absence of 50 $\mu\text{mol/l}$ z-VAD-fmk (Lavastre *et al.*, 2002, 2005a) or the diluent (<1% DMSO) for the indicated period of time and then harvested for the preparation of cell lysates in Laemmli's sample buffer. Aliquots corresponding to 225 000 cells were subjected to 10% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and then transferred from the gel to polyvinylidenedifluoride (PVDF) membranes. Non-specific sites were blocked with 1% BSA in TBS-Tween (25 mmol/l Tris-HCl, pH 7.8, 190 mmol/l NaCl, 0.15% Tween-20) overnight at 4°C. Membranes were incubated with monoclonal anti-human cytoskeletal antibodies [anti-gelsolin (1:2000); anti-vinculin (1:500); anti-vimentin (1:1000); anti- α tubulin (1:500); anti-lamin B₁ (1:500) or anti-NMHC-IIA (1:500)] for 1 h at room temperature followed by washes, and incubated with a horseradish peroxidase-labelled sheep anti-mouse IgG (1:20 000) (Bio/Can) for 1 h at room temperature in fresh blocking solution as previously documented (Lavastre *et al.*, 2002, 2005a). Membranes were washed three times with TBS-Tween, and bands were revealed with the enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting detection system (Amersham, Pharmacia Biotech Inc). Protein loading was systematically verified by staining the membranes with Coomassie blue at the end of the experiments. In some experiments, activation of caspase-3 and caspase-8 was assessed by monitoring the cleavage of the procaspase-3 or procaspase-8 forms by immunoblotting under the conditions indicated in the corresponding figure legend.

Reverse transcription-polymerase chain reaction

Total RNA was extracted from human 3D10, HL-60 and neutrophil cells using the absolutely RNA reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) Miniprep Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). For the RT reaction, total RNA (500 ng) was primed with random primer pd(N)₆ (Amersham, Baie d'Urfe', QC, Canada) and reverse-transcribed into cDNA with 200 units of Moloney-murine leukaemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), according to the manufacturer's instructions, in a final volume of 25 μl . The mixture was incubated at 37°C for 1 h. PCR reactions were performed in a GeneAmp PCR System model 2400 (Perkin Elmer Wallac/Can, Wood Bridge, ON, Canada). PCR mixtures (25 μl) contained 1 μl of the RT reaction, 10 pmol of each primer, each dNTP (0.1 mmol/l), 1.5 mmol/l MgCl₂ and 0.5 unit of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). The primers used to amplify CASP mRNA (Lavastre *et al.*, 2005b) are listed below:

- CASP1: Forward 5'-CGACAAGGTCCTGAAGGAGA-3'
Reverse 5'-CATCTGGCTGCTCAAATGAA-3'
CASP2: Forward 5'-CAGTTACCTGCACACCGAGTCACGG-3'
Reverse 5'-AGCCGCATATCATGTCTGAGCGCG-3'
CASP3: Forward 5'-TTTGTTTGTGTGCTTCTGAGCC-3'
Reverse 5'-ATTCTGTTGCCACCTTTCGG-3'
CASP4: Forward 5'-TCGGGTCATGGCAGACTCTATGC-3'
Reverse 5'-ATGCACAGTTCGGCAGATTC-3'

- CASP7: Forward 5'-CGATCCATCAAGACCACCCG-3'
Reverse 5'-GGAATAGGCGAAGAGGAAGTCAGC-3'
CASP8: Forward 5'-GGGACAGGAATGGAACACACTTGG-3'
Reverse 5'-TCAGGATGGTGAGAATATCATCGCC-3'
CASP9: Forward 5'-AACAGGCAAGCAGCAAAGTT-3'
Reverse 5'-TCCATCTGTGCCGTAGACAG-3'
CASP10: Forward 5'-TGCTGAGTGAGGAAGACCCT-3'
Reverse 5'-CCTCTGTGGTTCCGATTCAT-3'

As an internal controls, 18S cDNA was amplified by PCR using the primers: 5'-TCCGATAACGAACGAGACTC-3' (forward) and 5'-AGGGACTTAATCAACG-CAA-3' (reverse) for 18S. After 3-min incubation at 95°C, PCR reactions were carried out for 30 s at 94°C, 30 s for annealing and 45 s at 72°C (the number of cycles varied between 26 and 35, depending on the linear phase of amplification for each gene or in order to see a specific isoform); followed by further incubation for 7 min at 72°C. The annealing step was carried out at 60°C with 35 PCR cycles (CASP1); 69°C, 26 cycles (CASP2); 65°C, 28 cycles (CASP3); 69°C, 35 cycles (CASP4); 67°C, 35 cycles (CASP7); 69°C, 30 cycles (CASP8); 69°C, 38 cycles (CASP9); 68°C, 38 cycles (CASP10); 56°C, 10 cycles (18S). The PCR products were subjected to 2% agarose gel electrophoresis and visualised by ethidium bromide staining. The expected sizes of PCR products for each gene were as follows: CASP1 (1076 bp), CASP2 (325 bp), CASP3 (400 bp), CASP4 (502 bp), CASP7 (537 bp), CASP8 (558 and 694 bp), CASP9 (492 bp), CASP10 (514, 551 and 643 bp) and 18S (315 bp).

Cell surface expression of cytoskeletal proteins by flow cytometry

Neutrophils (10×10^6 cells/ml RPMI-HEPES P/S) were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 22 h in order to undergo spontaneous apoptosis. Cells were harvested in cold PBS and blocked with PBS containing 20% autologous serum for 30 min on ice. Cells were washed in PBS and incubated for 30 min on ice with 2 $\mu\text{g/ml}$ of mouse monoclonal anti-cytoskeletal antibodies (anti-lamin B₁ or anti-NMHC-IIA). Appropriate isotypic control antibodies were used to compare with the proteins of interest. Cells were washed in PBS and incubated for 30 min on ice with FITC-conjugated goat anti-mouse; FITC-conjugated rabbit anti-goat or FITC-conjugated goat anti-rabbit antibodies. Cell surface expression was analysed using a FACScan. Apoptosis was evaluated by flow cytometry after staining with FITC-annexin-V (Moisan & Girard, 2006).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SigmaStat for Windows Version 3.00 (copyright © 1992-2003 SPSS Inc., Chicago, IL, USA) with a one-way analysis of variance (ANOVA). Statistical significance was established at $P < 0.05$.

Results

VAA-I induces apoptosis in PLB-985D

VAA-I is a potent inducer of apoptosis in a variety of cells (Bussing *et al*, 1996; Hostanska *et al*, 1996; Hajto *et al*, 2003, 2006; Harmsma *et al*, 2004), including granulocytes (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002, 2005a,b). In these latter cells, although VAA-I was found to induce apoptosis in human promyelocytic PLB-985 and leukaemia eosinophil AML14.3D10 cells, as well as in mature neutrophils and eosinophils, its ability to induce apoptosis in DMSO-differentiated PLB-985 (PLB-985D) cells toward a neutrophil-like phenotype, has never been investigated. As illustrated in Fig 1, the efficiency of PLB-985 cell differentiation toward neutrophil-like cells (PLB-985D) was evaluated by cytology and by the NBT dye reduction assay (blue-black formazan deposits) (Fig 1A). All experiments were conducted with a differentiation efficiency $\geq 75\%$. VAA-I was found to induce apoptosis in PLB-985D cells, as assessed by Hoechst staining (Fig 1B and inset). Interestingly, the number of apoptotic cells is similar to that previously observed in undifferentiated PLB-985 cells (Lavastre *et al*, 2005b). As illustrated in Fig 1C, breakdown of

the cytoskeleton in apoptotic PLB-985D cells was confirmed by immunofluorescence where the normal F-actin network appearance (left panel) switched to the disintegration of the filament into small aggregates (left panel) after VAA-I treatment.

VAA-I induces the degradation of cytoskeletal components in PLB-985D cells

Knowing that VAA-I induced apoptosis as well as cytoskeleton breakdown in PLB-985D cells, we verified the possibility that it would induce the degradation of the MFAP gelsolin, an event known to occur via caspase-3 activation (Kothakota *et al*, 1997; Lavastre *et al*, 2002). As illustrated in Fig 2A, gelsolin was degraded by VAA-I after 22 h of treatment. Similarly to undifferentiated PLB-985 cells (Lavastre *et al*, 2005a) and mature neutrophils (Lavastre *et al*, 2002), the degradation of gelsolin did not occur rapidly, since very little, if any, degradation was observed after 4 h of treatment with VAA-I. Next, we investigated the possibility that VAA-I induced the degradation of paxillin, but not of vinculin (two other MFAPs), in PLB-985D cells. As illustrated in Fig 2B, VAA-I induced the degradation of the two paxillin bands (68 and

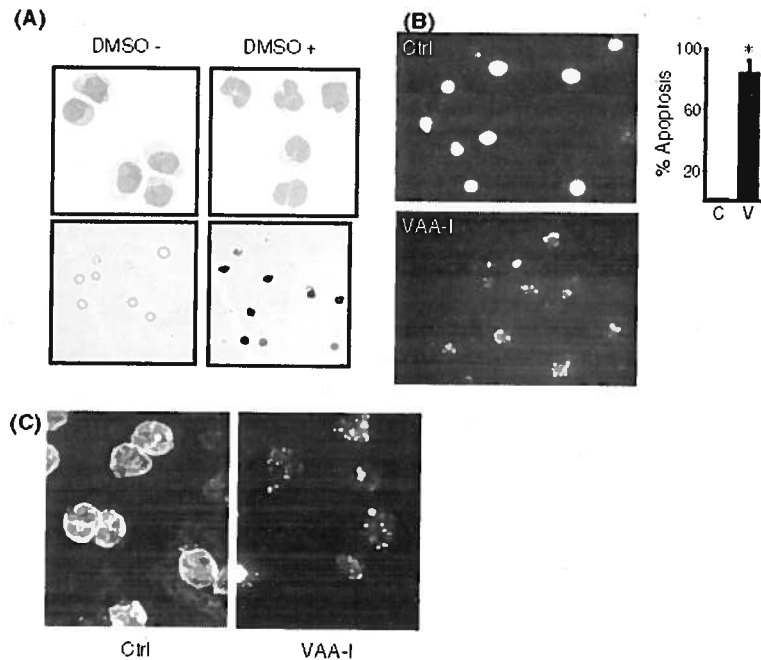


Fig 1. *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) induces apoptosis and cytoskeletal breakdown in apoptotic PLB-985D cells. (A) PLB-985 cells were fully differentiated toward neutrophil-like cells with DMSO (PLB-985D) and the efficiency of differentiation was verified by cytology (upper panels, note the appearance of polylobed nucleus in the top right panel) and by the NBT dye reduction assay (formation of blue-black formazan deposits, bottom right). (B) Apoptosis was evaluated by immunofluorescence microscopy after staining DNA with Hoechst in PLB-985D cells treated with buffer (Ctrl or C) or 1000 ng/ml VAA-I (V) for 22 h. The number of apoptotic cells was counted and expressed as mean \pm SEM ($n = 3$). (C) PLB-985D cells were treated as above and the F-actin network was observed by immunofluorescence after staining with FITC-phalloidin. Note the appearance of actin aggregates in the right panel when cells were treated with VAA-I. All illustrated results are representative of at least three different experiments.

40 kDa) known to be recognised by the antibody (Lavastre *et al.*, 2002). This was reversed by treatment with the pan caspase inhibitor z-VAD-fmk. Interestingly, vinculin was not degraded by VAA-I in PLB-985D cells (Fig 2C). This suggests that, at least for the tested MFAPs, PLB-985D cells responded similarly to VAA-I when compared with human neutrophils. As it was recently identified that the IF lamin B₁ is a novel target to VAA-I (Lavastre *et al.*, 2005a), we verified the possibility that VAA-I cleaved both lamin B₁ and vimentin in PLB-985D cells, the two only members of IF proteins known to be expressed in neutrophils (Bruel *et al.*, 2001). As illustrated

in Fig 3A and B, VAA-I induced the degradation of both lamin B₁ and vimentin. Interestingly, lamin B₁ was cleaved into a fragment of 46 kDa (p46), which was previously observed in undifferentiated PLB-985 and in mature neutrophil cells (Lavastre *et al.*, 2005a). Although VAA-I is known to cleave several cytoskeletal proteins, it did not cleave the MFAP vinculin (Lavastre *et al.*, 2002; present study) nor α - and β -tubulin in PLB-985, AML-14.3D10, neutrophil and eosinophil cells (Lavastre *et al.*, 2005a,b). As illustrated in Fig 3C, α -tubulin was not cleaved by VAA-I after 4 or 22 h of treatment when compared with untreated cells.

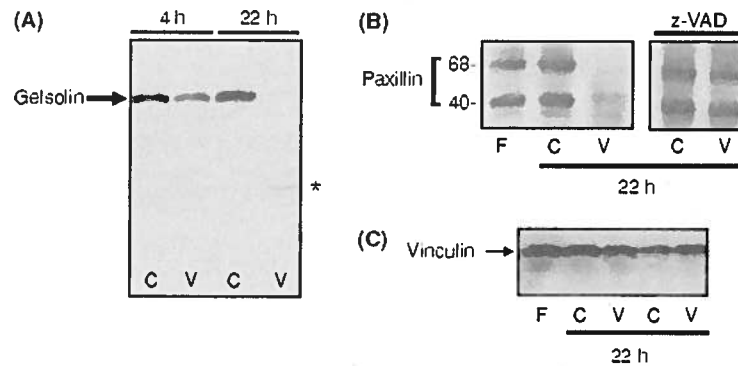


Fig 2. *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) induces the degradation of the microfilament-associated proteins gelsolin and paxillin, but not vinculin in apoptotic PLB-985D cells. PLB-985D cells were treated with buffer (C) or 1000 ng/ml VAA-I (V) for 22 h and potential degradation of the cytoskeletal MFAP gelsolin (A), paxillin (B) and vinculin (C) was monitored by immunoblotting as described in *Methods*. Note the degradation of gelsolin after treatment with VAA-I and the appearance of a faint fragment (*). The degradation of paxillin was reversed by treatment with the pan caspase inhibitor (z-VAD). As expected, vinculin was not cleaved by VAA-I (Lavastre *et al.*, 2002). F, fresh cells. Results are representative of at least three different experiments.

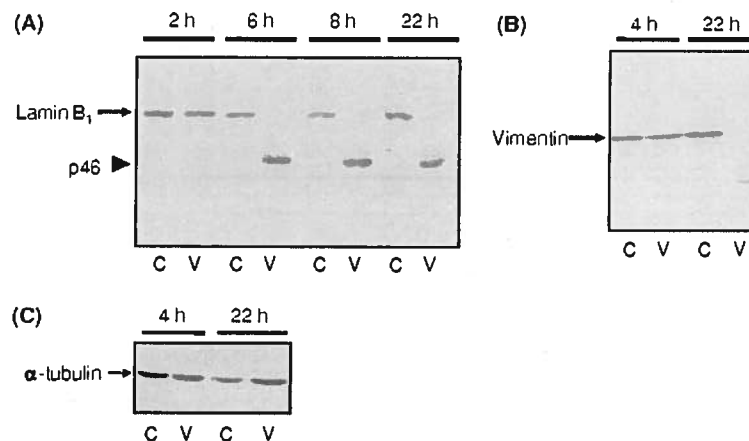


Fig 3. *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) induces the degradation of the intermediate filament proteins lamin B₁ and vimentin but not the major microtubule protein, α -tubulin, in apoptotic PLB-985D cells. PLB-985D cells were treated as indicated in Fig 2, and potential cleavage of the two IF proteins lamin B₁ (A) and vimentin (B) and one of the major constituent of microtubules, α -tubulin (C) was assessed by immunoblotting as described in *Methods*. Panel A, note the disappearance of the native lamin B₁ and the apparition of the characteristic p46 fragment when apoptosis was induced by VAA-I (V) when compared with control cells (C). Panel B, vimentin was cleaved by VAA-I but not α -tubulin (Panel C). Results are representative of at least three different experiments.

Identification of myosin heavy chain-IIA as a novel cytoskeletal protein cleaved via a caspase-dependent mechanism in VAA-I-induced human granulocyte apoptosis

Recently, two studies reported that NMHC degradation occurred during apoptosis in bovine aortic endothelial and human Jurkat T cells (Suarez-Huerta *et al*, 2000; Kato *et al*, 2005). Because we are interested in the identification of potential novel cytoskeletal proteins that could be cleaved by VAA-I during granulocyte apoptosis, and as MFAPs represent the most susceptible candidates for cleavage, we investigated the potential degradation of NMHC-IIA, the sole myosin isoform expressed in human neutrophils and platelets (Patel *et al*, 2005). As illustrated in Fig 4A, NMHC-IIA was cleaved in VAA-I-induced PLB-985D cells. The native *c.* 200 kDa myosin band disappeared after VAA-I treatment and was cleaved into a major fragment of *c.* 60 kDa (F60) recognised by the anti-NMHC-IIA antibody. NMHC-IIA was also cleaved into another fragment of *c.* 95 kDa (F95) that was recognised by the antibody. Interestingly, the proteolysis of myosin was reversed when cells were treated with the pan caspase z-VAD-fmk. This indicated that cleavage of NMHC-IIA occurred by a caspase-dependent mechanism. The degradation of NMHC-IIA was confirmed by immunofluorescence, in which VAA-I treatment of cells led to aggregation of myosin and a weaker

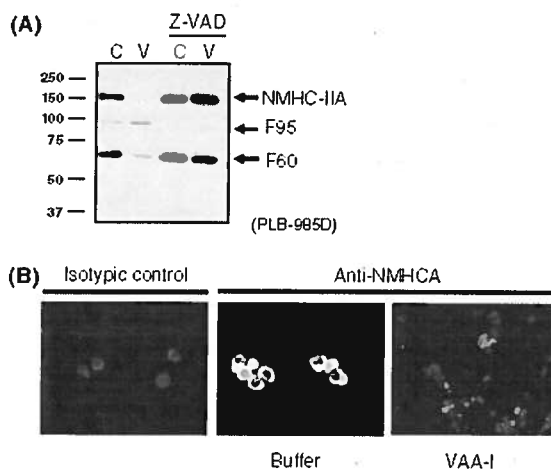


Fig 4. Identification of non-muscle myosin heavy chain IIA (NMHC-IIA) as a new cytoskeletal target of *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) cleaved by caspases in apoptotic PLB-985D cells. PLB-985D cells were treated as indicated in Fig 2 and potential cleavage of the MFAP NMHC-IIA was assessed by immunoblotting (A) and confirmed by immunofluorescence (B). Note the disappearance of the native form of NMHC-IIA (*c.* 200 kDa) and the F60 fragment detected by the antibody in apoptotic cells (V) when compared with control cells (C). Cleavage of NMHC-IIA was prevented when a pan caspases inhibitor was added (Z-VAD). (B) Distribution of NMHC-IIA by immunofluorescence in control non-apoptotic (middle panel) and in apoptotic VAA-I-induced PLB-985D cells. Results are representative of at least three different experiments.

signal intensity when compared with control cells (Fig 4B). As it was the first time that myosin was found to be cleaved in granulocytes, we investigated whether or not such NMHC-IIA cleavage occurring in 'neutrophil-like' PLB-985D cells could also occur in primary mature human neutrophils. As illustrated in Fig 5A, myosin was cleaved in apoptotic neutrophils. Of note, because neutrophils are known to undergo spontaneous apoptosis, NMHC-IIA was cleaved not only in VAA-I-induced cells, but also in spontaneous or 22-h-aged neutrophils, as evidenced by the appearance of the F95 fragment. The detection of the native form of NMHC-II during spontaneous neutrophil apoptosis can vary from donor to donor, but was always almost undetectable in VAA-I-induced neutrophils. Figure 5A shows that the native form was weakly detectable. Interestingly, in contrast to PLB-985D, F95 was the major fragment recognised by the antibody while that of the F60 was faintly detected. Another fragment (F75) was also barely detectable. Addition of z-VAD-fmk reversed the cleavage of NMHC-IIA in spontaneous- and in VAA-I-induced neutrophil apoptosis. Because the different fragments of NMHC-IIA could be detected and as we had recently demonstrated that VAA-I activated caspase-3 and caspase-8 in PLB-985 cells (Lavastre *et al*, 2005a), we then investigated caspase expression during DMSO-induced differentiation toward neutrophils as well as in mature neutrophils. As illustrated in Fig 5B, fully differentiated PLB-985D cells expressed *CASP1*, *CASP2*, *CASP3*, *CASP4*, *CASP7*, *CASP8* and *CASP10*. Only *CASP1* expression was reproducibly ($n = 3$) increased following DMSO treatment, whereas *CASP2* expression decreased. This latter observation concurs with the maturation state of PLB-985D toward neutrophils, as neutrophils do not express caspase-2 (Santos-Beneit & Mollinedo, 2000).

It was recently documented that some cytoskeletal proteins were expressed on the cell surface of apoptotic human neutrophils (Moisan & Girard, 2006); we therefore investigated whether or not NMHC-IIA would be at the cell surface in this situation. Unlike the IF protein lamin B₁, NMHC-IIA was not detected on the neutrophil cell surface during spontaneous apoptosis (SA) in neutrophils (Fig 6). In addition, no cell surface expression of myosin was detected when apoptosis was induced by VAA-I (*data not shown*).

Discussion

This study demonstrated that VAA-I induced apoptosis in neutrophil-like PLB-985D cells by a caspase-dependent mechanism. These results were in agreement with the observation that VAA-I induced apoptosis in PLB-985, neutrophils, AML-14.3D10 and eosinophils (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002, 2005a,b). The ability of VAA-I to induce cell apoptosis via caspases is not limited to granulocytes, as this was previously shown in human leukaemic T and B cell lines (Bantel *et al*, 1999). Of note, although several leukaemia cell lines have been used to study the pro-apoptotic activity of VAA-I, it is important to mention that our studies

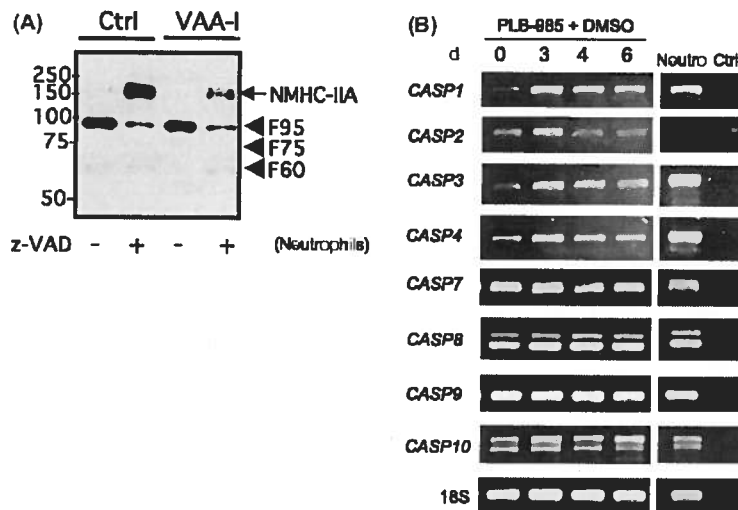


Fig 5. *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) induces cleavage of NMHC-IIA in mature human neutrophils: role of caspases. (A) Freshly isolated human neutrophils were isolated as described in *Methods* and were incubated for 22 h with buffer (Ctrl) or 1000 ng/ml VAA-I in the presence or absence of the pan caspase inhibitor z-VAD-fmk (z-VAD). Results are representative of three different experiments. (B) Expression of *CASP1*, *CASP2*, *CASP3*, *CASP4*, *CASP7*, *CASP8*, *CASP9* and *CASP10* mRNA was investigated in PLB-985D cells during their differentiation toward neutrophil-like phenotype by RT-PCR as described in *Methods*. Note that unlike neutrophils (neutro), PLB-985D cells express *CASP2*. Results are representative of three different experiments. ctrl, negative technical control.

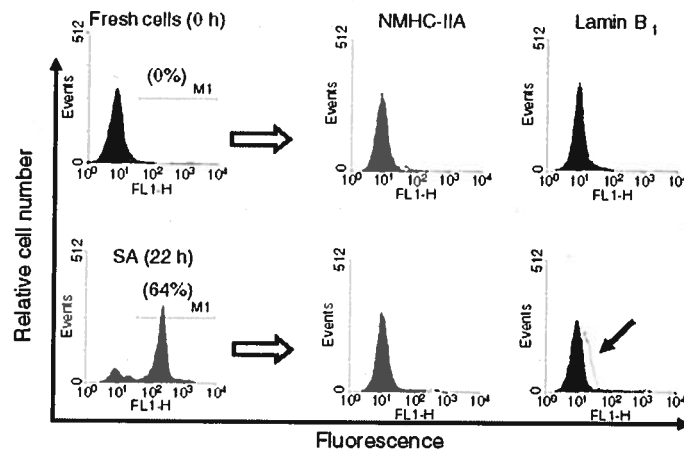


Fig 6. Non-muscle myosin heavy chain IIa (NMHC-IIA) is not expressed on the cell surface of apoptotic human neutrophils. Freshly isolated human neutrophils were aged *in vitro* for 22 h to undergo spontaneous apoptosis and cell surface expression of NMHC-IIA and lamin B₁ was investigated by flow cytometry as described in *Methods*. The number in parentheses indicates the % of apoptotic cells evaluated by flow cytometry after staining with FITC-annexin-V. Note the detection of lamin B₁ (arrow) and not of NMHC-IIA during spontaneous apoptosis (SA) when compared with fresh cells. Results are representative of four different experiments.

demonstrate that this plant lectin induced apoptosis in mature non-dividing cells, such as neutrophils (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002, 2005a) and eosinophils (Lavastre *et al*, 2005b). Thus, in these latter mature cells, we could not induce cell cycle arrest followed by apoptosis, suggesting that different mechanisms might occur between leukaemia cells and circulating neutrophils and eosinophils. Nevertheless, the present

study demonstrated that, in neutrophil-like PLB-985D cells, VAA-I induced cleavage of the tested cytoskeletal proteins, namely paxillin, gelsolin, vimentin and lamin B₁, as was previously demonstrated in promyelocytic PLB-985 cells (Lavastre *et al*, 2005b) and neutrophils (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002). In addition, we further found that VAA-I did not induce cleavage of vinculin and α -tubulin in PLB-

985D cells, indicating that these cells represent an excellent model for studying apoptosis and cytoskeletal protein degradation occurring in VAA-I-induced neutrophils. Moreover, using PLB-985D cells, NMHC-IIA was identified as a novel target of VAA-I and then confirmed in neutrophils. Thus, PLB-985D cells could be used in screening experiments for identification of potential new caspase substrates, preventing extensive neutrophil cell isolation.

Myosins are MFAPs belonging to a superfamily of actin-based motor proteins comprising several classes. The two main groups of myosins are the conventional (class II) and the unconventional myosins. The conventional myosins found in non-muscle cells are referred to as NMHC, and because they arise from at least two genes, two proteins are named NMHC-IIA and NMHC-IIB (Sellers, 2000). The expression of these two isoforms varies from cell to cell. This study specifically investigated NMHC-IIA, because this isoform is the only one expressed in human neutrophils (Patel *et al*, 2005). Recently, a fragment named p95 was identified as the carboxyl-terminal fragment of NMHC-IIA in apoptotic human Jurkat T cells (Kato *et al*, 2005). In these cells, apoptosis was induced by anti-Fas antibody + staurosporine, a natural product that inhibits several protein kinases and which was isolated almost 30 years ago from the bacterium *Streptomyces staurosporeus* (Omura *et al*, 1977). Cleavage of NMHC-IIA into a fragment of c. 97 kDa was also observed in apoptotic bovine aortic endothelial cells, where apoptosis was induced by treatment with the cytokine tumour necrosis factor- α + the protein synthesis inhibitor cycloheximide (Suarez-Huerta *et al*, 2000). The present study used VAA-I, a 63 kDa galactoside-specific plant lectin belonging to the family of type II ribosome-inactivating proteins, including ricin, to induce apoptosis and NMHC-IIA degradation in PLB-985D and neutrophils. VAA-I is an inhibitor of protein synthesis, due to a RNA glycosidase activity inhibiting *N*-glycosylation of a single adenine within a universally conserved GAGA sequence on the 28S rRNA (Endo *et al*, 1988). Interestingly, in our study, cleavage of NMHC-IIA was also observed during spontaneous (22-h-aged) neutrophil apoptosis, a condition that occurs when any exogenous agents are added into the culture. Taken together, the above observations indicate that degradation of NMHC-IIA occurs in response to different proapoptotic signals and in different cell types.

In the present study, cleavage of NMHC-IIA occurred via caspases, because treatment of cells with the pan caspases inhibitor z-VAD-fmk reversed the process. This was observed in VAA-I-induced PLB-985D and VAA-I-induced neutrophil cells as well as during spontaneous neutrophil apoptosis. These results are in agreement with those of Kato *et al* (2005) where the inhibition of caspases resulted in the disappearance of a p95 fragment, which they identified. However, we did not observe the fragment of c. 110 kDa, which was detected by Kato *et al* (2005) using their antibodies raised against different NMHC-IIA residues. We identified the native form of NMHC-IIA (c. 200 kDa) and fragments denoted F95 and F60 in

PLB-985D cells and native NMHC-IIA, F95, F75 and F60 in neutrophils, suggesting involvement of different caspases in the two cell types. However, except for *CASP2*, the expression of all caspases was similar in both cell types. Although this study did not investigate the potential activity of all caspases, it was previously documented that VAA-I can activate caspase-3 and caspase-8 in PLB-985 cells (Lavastre *et al*, 2005a). As VAA-I can also activate these caspases in mature neutrophils (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2005b), the differences observed regarding the cleavage of NMHC-IIA cannot be related to inactivation of these two major caspases. Although it is clear that caspases are involved in the ability of VAA-I to induce PLB-985D cell apoptosis and cleavage of cytoskeletal proteins, including NMHC-IIA, the possibility that other proteases could be involved were not eliminated. In this respect, when z-VAD was added in VAA-I induced neutrophils, the intensity of the detected NMHC-IIA did not return to the basal level observed when z-VAD was added to prevent spontaneous apoptosis, thus supporting the role of proteases other than caspases.

The gene *MYH9* encodes for NMHC-IIA, and mutations in this gene cause *MYH9* disorders that are autosomal dominant macrothrombocytopenias with leucocyte inclusions (Seri *et al*, 2000; Pecci *et al*, 2002; Kunishima *et al*, 2005). These rare disorders include May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome and Fechtner syndrome, and are all characterised by a triad of giant platelets, thrombocytopenia and characteristic Döhle body-like cytoplasmic inclusions in granulocytes (Seri *et al*, 2000; Pecci *et al*, 2002; Kunishima *et al*, 2005). Immunofluorescent analysis of neutrophil NMHC-IIA was reported to be useful as a screening test for the clear haematopathological classification of *MYH9* disorders (Kunishima *et al*, 2003). Knowing that NMHC-IIA is cleaved by caspases in apoptotic granulocytes, especially in neutrophils (this report), it would be interesting to investigate the potential altered cleavage of this cytoskeletal protein in neutrophils isolated from patients suffering of *MYH9* disorders in future studies.

In addition to the *MYH9* disorders, myosin is also associated with autoimmune diseases, including rheumatic heart disease, systemic lupus erythematosus, Sjogren's syndrome and rheumatoid arthritis (Girard & Senecal, 1995; Shrivastav *et al*, 2002; Warraich *et al*, 2006), as it has been characterised as an autoantigen. Apoptotic cells have been reported to be an important source of autoantigens (Levine & Koh, 1999). In this respect, two studies have demonstrated that injection of apoptotic cells into normal mice resulted in the production of various autoantibodies (Casciola-Rosen *et al*, 1994; Hall *et al*, 2004), including antibodies directed against the cytoskeletal protein vimentin. Using flow cytometry, we recently found that the two IF proteins vimentin and lamin B₁, but not the MFAPs paxillin, gelsolin and vinculin, or the microtubule proteins α - and β -tubulin, were expressed on the cell surface of human apoptotic neutrophils (Moisan & Girard, 2006). Knowing this, in addition to their high cell turnover and the fact that these cells are known to undergo spontaneous apoptosis that can

be accelerated by several agents, neutrophils represent a good source of cytoskeletal autoantigens. However, the present study demonstrated that NMHC-IIA was not expressed on the cell surface of apoptotic neutrophils. This indicates that, unlike vimentin and lamin B₁, the presence of anti-myosin autoantibodies in several disorders does not originate from NMHC IIA expression on apoptotic neutrophils.

In summary, PLB-985D cells were found to represent a good model for extrapolating data regarding the cleavage of cytoskeletal proteins and the role of caspases during neutrophil apoptosis, although some minor differences were observed between the two cell types, especially with respect to the detection of distinct fragments of a given cytoskeletal protein, such as NMHC-IIA. Nevertheless, the results of this study clearly establish for the first time that the cytoskeletal protein NMHC-IIA is a novel target of VAA-I, inducing granulocyte apoptosis and caspase activation. The fact that NMHC-IIA is not expressed on the cell surface of apoptotic neutrophils further supports our previous conclusion that, among different members of the three classes of cytoskeletal filaments, only those of the IFs are detected on the cell surface of apoptotic neutrophils.

Acknowledgements

This study was partly supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and Canadian Institutes of Health Research (CIHR)(MOP-89534). FB and EM hold a PhD FRSQ studentship awards; VL holds a PhD studentship award from Canadian Institutes of Health Research and DG is a Scholar from FRSQ. We thank Mary Gregory for reading this manuscript.

References

- Anderson, S.I., Hotchin, N.A. & Nash, G.B. (2000) Role of the cytoskeleton in rapid activation of CD11b/CD18 function and its subsequent downregulation in neutrophils. *Journal of Cell Sciences*, **113** (Pt 15), 2737–2745.
- Bantel, H., Engels, I.H., Voelter, W., Schulze-Osthoff, K. & Wesselborg, S. (1999) Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Research*, **59**, 2083–2090.
- Bengtsson, T., Jaconi, M.E., Gustafson, M., Magnusson, K.E., Theler, J.M., Lew, D.P. & Stendahl, O. (1993) Actin dynamics in human neutrophils during adhesion and phagocytosis is controlled by changes in intracellular free calcium. *European Journal of Cell Biology*, **62**, 49–58.
- Bengtsson, T., Orselius, K. & Wettero, J. (2006) Role of the actin cytoskeleton during respiratory burst in chemoattractant-stimulated neutrophils. *Cell Biology International*, **30**, 154–163.
- Bhatia, M., Kirkland, J.B. & Meckling-Gill, K.A. (1995) Modulation of poly(ADP-ribose) polymerase during neutrophilic and monocytic differentiation of promyelocytic (NB4) and myelocytic (HL-60) leukaemia cells. *Biochemical Journal*, **308** (Pt 1), 131–137.
- Brancolini, C., Benedetti, M. & Schneider, C. (1995) Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases. *EMBO Journal*, **14**, 5179–5190.
- Bruel, A., Paschke, S., Jainta, S., Zhang, Y., Vassy, J., Rigaut, J.P. & Beil, M. (2001) Remodeling of vimentin cytoskeleton correlates with enhanced motility of promyelocytic leukemia cells during differentiation induced by retinoic acid. *Anticancer Research*, **21**, 3973–3980.
- Bussing, A., Suzart, K., Bergmann, J., Pfuller, U., Schietzel, M. & Schweizer, K. (1996) Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album* L. is mediated by the mistletoe lectins. *Cancer Letters*, **99**, 59–72.
- Byun, Y., Chen, F., Chang, R., Trivedi, M., Green, K.J. & Cryns, V.L. (2001) Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, **8**, 443–450.
- Casciola-Rosen, L.A., Anhalt, G. & Rosen, A. (1994) Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *Journal of Experimental Medicine*, **179**, 1317–1330.
- Chen, F., Chang, R., Trivedi, M., Capetanaki, Y. & Cryns, V.L. (2003) Caspase proteolysis of desmin produces a dominant-negative inhibitor of intermediate filaments and promotes apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 6848–6853.
- Cho, J.H. & Johnson, G.V. (2004) Glycogen synthase kinase 3 beta induces caspase-cleaved tau aggregation in situ. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 54716–54723.
- Endo, Y., Tsurugi, K. & Franz, H. (1988) The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein. *FEBS Letters*, **231**, 378–380.
- Girard, D. & Senecal, J.L. (1995) Anti-microfilament IgG antibodies in normal adults and in patients with autoimmune diseases: immunofluorescence and immunoblotting analysis of 201 subjects reveals polyreactivity with microfilament-associated proteins. *Clinical Immunology and Immunopathology*, **74**, 193–201.
- Grzanka, A., Grzanka, D. & Orlikowska, M. (2003) Cytoskeletal reorganization during process of apoptosis induced by cytostatic drugs in K-562 and HL-60 leukemia cell lines. *Biochemical Pharmacology*, **66**, 1611–1617.
- Hajto, T., Berki, T., Boldizsar, F. & Nemeth, P. (2003) Galactoside-specific plant lectin, *Viscum album* agglutinin-I induces enhanced proliferation and apoptosis of murine thymocytes in vivo. *Immunology Letters*, **86**, 23–27.
- Hajto, T., Berki, T., Palinkas, L., Boldizsar, F. & Nemeth, P. (2006) Investigation of the effect of mistletoe (*Viscum album* L.) extract Iscador on the proliferation and apoptosis of murine thymocytes. *Arzneimittelforschung*, **56**, 441–446.
- Hall, J.C., Casciola-Rosen, L. & Rosen, A. (2004) Altered structure of autoantigens during apoptosis. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, **30**, 455–471, vii.
- Harmsma, M., Gromme, M., Ummelen, M., Dignef, W., Tusenius, K.J. & Ramaekers, F.C. (2004) Differential effects of *Viscum album* extract IscadorQu on cell cycle progression and apoptosis in cancer cells. *International Journal of Oncology*, **25**, 1521–1529.
- Hostanska, K., Hajto, T., Weber, K., Fischer, J., Lentzen, H., Sutterlin, B. & Saller, R. (1996) A natural immunity-activating plant lectin, *Viscum album* agglutinin-I, induces apoptosis in human lymphocytes, monocytes, monocytic THP-1 cells and murine thymocytes. *Nature Immunology*, **15**, 295–311.

- Kato, M., Fukuda, H., Nonaka, T. & Imajoh-Ohmi, S. (2005) Cleavage of nonmuscle myosin heavy chain-A during apoptosis in human Jurkat T cells. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, **137**, 157–166.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kothis, K., Kwiatkowski, D.J. & Williams, L.T. (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*, **278**, 294–298.
- Kunishima, S., Matsushita, T., Kojima, T., Sako, M., Kimura, F., Jo, E.K., Inoue, C., Kamiya, T. & Saito, H. (2003) Immunofluorescence analysis of neutrophil nonmuscle myosin heavy chain-A in MYH9 disorders: association of subcellular localization with MYH9 mutations. *Laboratory Investigation*, **83**, 115–122.
- Kunishima, S., Matsushita, T., Shiratsuchi, M., Ikuta, T., Nishimura, J., Hamaguchi, M., Naoe, T. & Saito, H. (2005) Detection of unique neutrophil non-muscle myosin heavy chain-A localization by immunofluorescence analysis in MYH9 disorder presented with macrothrombocytopenia without leukocyte inclusions and deafness. *European Journal of Haematology*, **74**, 1–5.
- Lavastre, V., Pelletier, M., Saller, R., Hostanska, K. & Girard, D. (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. *Journal of Immunology*, **168**, 1419–1427.
- Lavastre, V., Chiasson, S., Cavalli, H. & Girard, D. (2005a) *Viscum album* agglutinin-I induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins via caspases in human leukaemia eosinophil AML14.3D10 cells: differences with purified human eosinophils. *British Journal of Haematology*, **130**, 527–535.
- Lavastre, V., Chiasson, S., Cavalli, H. & Girard, D. (2005b) *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins in human leukemia PLB-985 and X-CGD cells via caspases: lamin B1 is a novel target of VAA-I. *Leukemia Research*, **29**, 1443–1453.
- Levine, J.S. & Koh, J.S. (1999) The role of apoptosis in autoimmunity: immunogen, antigen, and accelerant. *Seminars in Nephrology*, **19**, 34–47.
- Moisan, E. & Girard, D. (2006) Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology*, **79**, 489–498.
- Moulding, D.A., Akgul, S., Derouet, M., White, M.R. & Edwards, S.W. (2001) BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology*, **70**, 783–792.
- Nicholson, D.W. (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation*, **6**, 1028–1042.
- Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchya, H., Takahashi, Y. & Masuma, R. (1977) A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*, **30**, 275–282.
- Patel, S.R., Hartwig, J.H. & Italiano, Jr, J.E. (2005) The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *Journal of Clinical Investigation*, **115**, 3348–3354.
- Pecci, A., Noris, P., Invernizzi, R., Savoia, A., Seri, M., Ghiggeri, G.M., Sartore, S., Gangarossa, S., Bizzaro, N. & Balduini, C.L. (2002) Immunocytochemistry for the heavy chain of the non-muscle myosin IIA as a diagnostic tool for MYH9-related disorders. *British Journal of Haematology*, **117**, 164–167.
- Robinson, J.M. & Badwey, J.A. (2002) Rapid association of cytoskeletal remodeling proteins with the developing phagosomes of human neutrophils. *Histochemistry and Cell Biology*, **118**, 117–125.
- Sanghavi, D.M., Thelen, M., Thornberry, N.A., Casciola-Rosen, L. & Rosen, A. (1998) Caspase-mediated proteolysis during apoptosis: insights from apoptotic neutrophils. *FEBS Letters*, **422**, 179–184.
- Santos-Beneit, A.M. & Mollinedo, F. (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*, **67**, 712–724.
- Savoia, A., Lavastre, V., Pelletier, M., Hajto, T., Hostanska, K. & Girard, D. (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*, **68**, 845–853.
- Sellers, J.R. (2000) Myosins: a diverse superfamily. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1496**, 3–22.
- Seri, M., Cusano, R., Gangarossa, S., Caridi, G., Bordo, D., Lo Nigro, C., Ghiggeri, G.M., Ravazzolo, R., Savino, M., Del Vecchio, M., d'Apolito, M., Iolascon, A., Zelante, L.L., Savoia, A., Balduini, C.L., Noris, P., Magrini, U., Belletti, S., Heath, K.E., Babcock, M., Glucksman, M.J., Aliprandis, E., Bizzaro, N., Desnick, R.J. & Martignetti, J.A. (2000) Mutations in MYH9 result in the May-Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes. The May-Hegglin/Fechtner Syndrome Consortium. *Nature Genetics*, **26**, 103–105.
- Shrivastav, M., Mittal, B., Aggarwal, A. & Misra, R. (2002) Autoantibodies against cytoskeletal proteins in rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*, **21**, 505–510.
- Suarez-Huerta, N., Lecocq, R., Mosselmans, R., Galand, P., Dumont, J.E. & Robaye, B. (2000) Myosin heavy chain degradation during apoptosis in endothelial cells. *Cell Proliferation*, **33**, 101–114.
- Veselska, R., Zitterbart, K., Jelinkova, S., Neradil, J. & Svoboda, A. (2003) Specific cytoskeleton changes during apoptosis accompanying induced differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells. *Oncology Reports*, **10**, 1049–1058.
- Warraich, R.S., Griffiths, E., Falconar, A., Pabbathi, V., Bell, C., Angelini, G., Suleiman, M.S. & Yacoub, M.H. (2006) Human cardiac myosin autoantibodies impair myocyte contractility: a cause-and-effect relationship. *FASEB Journal*, **20**, 651–660.

Références

- AKGUL, C., D. A. Moulding et S. W. Edwards. 2001. "Molecular control of neutrophil apoptosis". FEBS Letters, vol. 487, no. 3, p. 318-322.
- ALBERT, M. L. 2004. "Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation?". Nature Reviews Immunology, vol. 4, no. 3, p. 223-231.
- ALBERTS, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson. 1994 Molecular Biology of the Cell. New-York : Garland Publishing Inc., 1294 p.
- ASAGA, H., M. Yamada et T. Senshu. 1998. "Selective deimination of vimentin in calcium ionophore-induced apoptosis of mouse peritoneal macrophages". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 243, no. 3, p. 641-646.
- ATENCIA, R., A. Asumendi et M. Garcia-Sanz. 2000. "Role of cytoskeleton in apoptosis". Vitamins and Hormones, vol. 58, p. 267-297.
- AVRAM, D., E. P. Romijn, E. H. Pap, A. J. Heck et K. W. Wirtz. 2004. "Identification of proteins in activated human neutrophils susceptible to tyrosyl radical attack. A proteomic study using a tyrosylating fluorophore". Proteomics, vol. 4, no. 8, p. 2397-2407.
- BABIOR, B. M. 1999. "NADPH oxidase: an update". Blood, vol. 93, no. 5, p. 1464-1476.
- BACHVAROFF, R. J., F. Miller et F. T. Rapaport. 1980. "Appearance of cytoskeletal components on the surface of leukemia cells and of lymphocytes transformed by mitogens and Epstein-Barr virus". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 77, no. 8, p. 4979-4983.
- BANNIKOVA, S., D. B. Zorov, R. L. Shoeman, G. V. Tolstonog et P. Traub. 2005. "Stability and association with the cytomatrix of mitochondrial DNA in spontaneously immortalized mouse embryo fibroblasts containing or lacking the intermediate filament protein vimentin". DNA and Cell Biology, vol. 24, no. 11, p. 710-735.
- BARIBAULT, H., J. Price, K. Miyai et R. G. Oshima. 1993. "Mid-gestational lethality in mice lacking keratin 8". Genes and Development, vol. 7, no. 7A, p. 1191-202.
- BARTUNKOVA, J., V. Tesar et A. Sediva. 2003. "Diagnostic and pathogenetic role of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies". Clinical Immunology, vol. 106, no. 2, p. 73-82.
- BEINERT, T., S. Munzing, K. Possinger et F. Krombach. 2000. "Increased expression of the tetraspanins CD53 and CD63 on apoptotic human neutrophils". Journal of Leukocyte Biology, vol. 67, no. 3, p. 369-373.

- 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, no. 1, p. 57-63.
- BICKERSTAFF, M. C., M. Botto, W. L. Hutchinson, J. Herbert, G. A. Tennent, A. Bybee, D. A. Mitchell, H. T. Cook, P. J. Butler, M. J. Walport et M. B. Pepys. 1999. "Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity". Nature Medicine, vol. 5, no. 6, p. 694-697.
- BINET, F., H. Cavalli, E. Moisan et D. Girard. 2006. "Arsenic trioxide (AT) is a novel human neutrophil pro-apoptotic agent: effects of catalase on AT-induced apoptosis, degradation of cytoskeletal proteins and de novo protein synthesis". British Journal of Haematology, vol. 132, no. 3, p. 349-358.
- BOES, M., T. Schmidt, K. Linkemann, B. C. Beaudette, A. Marshak-Rothstein et J. Chen. 2000. "Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 97, no. 3, p. 1184-1189.
- BOILARD, E., S. G. Bourgoin, C. Bernatchez et M. E. Surette. 2003. "Identification of an autoantigen on the surface of apoptotic human T cells as a new protein interacting with inflammatory group IIA phospholipase A2". Blood, vol. 102, no. 8, p. 2901-2909.
- BOSE, J., A. D. Gruber, L. Helming, S. Schiebe, I. Wegener, M. Hafner, M. Beales, F. Kontgen et A. Lengeling. 2004. "The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal". Journal of Biology, vol. 3, no. 4, p. 15.
- BOTTO, M., C. Dell'Agnola, A. E. Bygrave, E. M. Thompson, H. T. Cook, F. Petry, M. Loos, P. P. Pandolfi et M. J. Walport. 1998. "Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies". Nature Genetics, vol. 19, no. 1, p. 56-59.
- BOUCHARD, A., C. Ratthe et D. Girard. 2004. "Interleukin-15 delays human neutrophil apoptosis by intracellular events and not via extracellular factors: role of Mcl-1 and decreased activity of caspase-3 and caspase-8". Journal of Leukocyte Biology, vol. 75, no. 5, p. 893-900.
- BRINKMANN, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch et A. Zychlinsky. 2004. "Neutrophil extracellular traps kill bacteria". Science, vol. 303, no. 5663, p. 1532-1535.
- BROWN, M. J., J. A. Hallam, E. Colucci-Guyon et S. Shaw. 2001. "Rigidity of circulating lymphocytes is primarily conferred by vimentin intermediate filaments". Journal of Immunology, vol. 166, no. 11, p. 6640-6646.

- BROWN, S., I. Heinisch, E. Ross, K. Shaw, C. D. Buckley et J. Savill. 2002. "Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment". Nature, vol. 418, no. 6894, p. 200-203.
- BROWN, S. B., K. Bailey et J. Savill. 1997. "Actin is cleaved during constitutive apoptosis". Biochemical Journal, vol. 323 (Pt 1), p. 233-237.
- BRUEL, A., S. Paschke, S. Jainta, Y. Zhang, J. Vassy, J. P. Rigaut et M. Beil. 2001. "Remodeling of vimentin cytoskeleton correlates with enhanced motility of promyelocytic leukemia cells during differentiation induced by retinoic acid". Anticancer Research, vol. 21, no. 6A, p. 3973-3980.
- BUENDIA, B., J. C. Courvalin et P. Collas. 2001. "Dynamics of the nuclear envelope at mitosis and during apoptosis". Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 58, no. 12-13, p. 1781-1789.
- BYUN, Y., F. Chen, R. Chang, M. Trivedi, K. J. Green et V. L. Cryns. 2001. "Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis". Cell Death and Differentiation, vol. 8, no. 5, p. 443-450.
- CARMAN, C. V. et T. A. Springer. 2004. "A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them". Journal of Cell Biology, vol. 167, no. 2, p. 377-388.
- CASIANO, C. A., S. J. Martin, D. R. Green et E. M. Tan. 1996. "Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/APO-1)-mediated T cell apoptosis". Journal of Experimental Medicine, vol. 184, no. 2, p. 765-770.
- CAULIN, C., G. S. Salvesen et R. G. Oshima. 1997. "Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis". Journal of Cell Biology, vol. 138, no. 6, p. 1379-1394.
- CEPINSKAS, G., M. Sandig et P. R. Kvietys. 1999. "PAF-induced elastase-dependent neutrophil transendothelial migration is associated with the mobilization of elastase to the neutrophil surface and localization to the migrating front". Journal of Cell Science, vol. 112 (Pt 12), p. 1937-1945.
- CHANG, X., R. Yamada, A. Suzuki, T. Sawada, S. Yoshino, S. Tokuhiro et K. Yamamoto. 2005. "Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis". Rheumatology, vol. 44, no. 1, p. 40-50.
- CHEN, F., R. Chang, M. Trivedi, Y. Capetanaki et V. L. Cryns. 2003. "Caspase proteolysis of desmin produces a dominant-negative inhibitor of intermediate filaments and promotes apoptosis". Journal of Biological Chemistry, vol. 278, no. 9, p. 6848-6853.

CHEN, H., A. Mocsai, H. Zhang, R. X. Ding, J. H. Morisaki, M. White, J. M. Rothfork, P. Heiser, E. Colucci-Guyon, C. A. Lowell, H. D. Gresham, P. M. Allen et E. J. Brown. 2003b. "Role for plastein in host defense distinguishes integrin signaling from cell adhesion and spreading". Immunity, vol. 19, no. 1, p. 95-104.

CHEN, Z., S. B. Koralov et G. Kelsoe. 2000. "Complement C4 inhibits systemic autoimmunity through a mechanism independent of complement receptors CR1 and CR2". Journal of Experimental Medicine, vol. 192, no. 9, p. 1339-1352.

CHOU, Y. H., K. L. Ngai et R. Goldman. 1991. "The regulation of intermediate filament reorganization in mitosis. p34cdc2 phosphorylates vimentin at a unique N-terminal site". Journal of Biological Chemistry, vol. 266, no. 12, p. 7325-7328.

CICCHETTI, G., P. G. Allen et M. Glogauer. 2002. "Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly". Critical Reviews in Oral Biology and Medicine, vol. 13, no. 3, p. 220-228.

COHEN, P. L., R. Caricchio, V. Abraham, T. D. Camenisch, J. C. Jennette, R. A. Roubey, H. S. Earp, G. Matsushima et E. A. Reap. 2002. "Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase". Journal of Experimental Medicine, vol. 196, no. 1, p. 135-140.

COLUCCI-GUYON, E., Y. Gimenez Ribotta M, T. Maurice, C. Babinet et A. Privat. 1999. "Cerebellar defect and impaired motor coordination in mice lacking vimentin". Glia, vol. 25, no. 1, p. 33-43.

COLUCCI-GUYON, E., M. M. Portier, I. Dunia, D. Paulin, S. Pournin et C. Babinet. 1994. "Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype". Cell, vol. 79, no. 4, p. 679-694.

COULOMBE, P. A., L. Ma, S. Yamada et M. Wawersik. 2001. "Intermediate filaments at a glance". Journal of Cell Science, vol. 114 (Pt 24), p. 4345-4347.

CROSS, T., G. Griffiths, E. Deacon, R. Sallis, M. Gough, D. Watters et J. M. Lord. 2000. "PKC-delta is an apoptotic lamin kinase". Oncogene, vol. 19, no. 19, p. 2331-2337.

DEJANA, E. 2006. "The transcellular railway: insights into leukocyte diapedesis". Nature Cell Biology, vol. 8, no. 2, p. 105-107.

DIEUDE, M., J. L. Senecal, J. Rauch, J. G. Hanly, P. Fortin, N. Brassard et Y. Raymond. 2002. "Association of autoantibodies to nuclear lamin B1 with thromboprotection in systemic lupus erythematosus: lack of evidence for a direct role of lamin B1 in apoptotic blebs". Arthritis and Rheumatism, vol. 46, no. 10, p. 2695-2707.

DINSDALE, D., J. C. Lee, G. Dewson, G. M. Cohen et M. E. Peter. 2004. "Intermediate filaments control the intracellular distribution of caspases during apoptosis". American Journal of Pathology, vol. 164, no. 2, p. 395-407.

DISANZA, A., A. Steffen, M. Hertzog, E. Frittoli, K. Rottner et G. Scita. 2005. "Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement". Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 62, no. 9, p. 955-970.

DOEING, D. C., J. L. Borowicz et E. T. Crockett. 2003. "Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods". BMC Clinical Pathology, vol. 3, no. 1, p. 3.

DONNELLY, S., W. Roake, S. Brown, P. Young, H. Naik, P. Wordsworth, D. A. Isenberg, K. B. Reid et P. Eggleton. 2006. "Impaired recognition of apoptotic neutrophils by the C1q/calreticulin and CD91 pathway in systemic lupus erythematosus". Arthritis and Rheumatism, vol. 54, no. 5, p. 1543-1556.

DRANSFIELD, I., S. C. Stocks et C. Haslett. 1995. "Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophil apoptosis". Blood, vol. 85, no. 11, p. 3264-3273.

ECKES, B., E. Colucci-Guyon, H. Smola, S. Nodder, C. Babinet, T. Krieg et P. Martin. 2000. "Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin". Journal of Cell Science, vol. 113 (Pt 13), p. 2455-2462.

ECKES, B., D. Dogic, E. Colucci-Guyon, N. Wang, A. Maniotis, D. Ingber, A. Merckling, F. Langa, M. Aumailley, A. Delouee, V. Kotliansky, C. Babinet et T. Krieg. 1998. "Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts". Journal of Cell Science, vol. 111 (Pt 13), p. 1897-1907.

EDWARDS, J. C., A. D. Sedgwick et D. A. Willoughby. 1981. "The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system". Journal of Pathology, vol. 134, no. 2, p. 147-156.

EDWARDS, S. W. 1994. Biochemistry and Physiology of the Neutrophil. New-York : Cambridge University Press., 299 p.

EDWARDS, S. W. et M. B. Hallett. 1997. "Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis". Immunology Today, vol. 18, no. 7, p. 320-324.

EHRENSTEIN, M. R., H. T. Cook et M. S. Neuberger. 2000. "Deficiency in serum immunoglobulin (Ig)M predisposes to development of IgG autoantibodies". Journal of Experimental Medicine, vol. 191, no. 7, p. 1253-1258.

ELWARD, K., M. Griffiths, M. Mizuno, C. L. Harris, J. W. Neal, B. P. Morgan et P. Gasque. 2005. "CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells". Journal of Biological Chemistry, vol. 280, no. 43, p. 36342-36354.

ENGELHARDT, B. et H. Wolburg. 2004. "Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house?". European Journal of Immunology, vol. 34, no. 11, p. 2955-2963.

- EVANS, R. M. 1998. "Vimentin: the conundrum of the intermediate filament gene family". Bioessays, vol. 20, no. 1, p. 79-86.
- FADOK, V. A. et G. Chimini. 2001. "The phagocytosis of apoptotic cells". Seminars in Immunology, vol. 13, no. 6, p. 365-372.
- FAURSCHOU, M. et N. Borregaard. 2003. "Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation". Microbes and Infection, vol. 5, no. 14, p. 1317-1327.
- FENG, D., J. A. Nagy, K. Pyne, H. F. Dvorak et A. M. Dvorak. 1998. "Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP". Journal of Experimental Medicine, vol. 187, no. 6, p. 903-915.
- FEUK-LAGERSTEDT, E., C. Movitz, S. Pellme, C. Dahlgren et A. Karlsson. 2007. "Lipid raft proteome of the human neutrophil azurophil granule". Proteomics, vol. 7, no. 2, p. 194-205.
- FRANCH, A., C. Castellote, J. L. Vila, S. Vilaro et M. Castell. 1994. "Anticytoskeletal autoantibody development in adjuvant arthritis". Journal of Rheumatology, vol. 21, no. 3, p. 489-497.
- FUCHS, E. et D. W. Cleveland. 1998. "A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease". Science, vol. 279, no. 5350, p. 514-519.
- FUCHS, E. et K. Weber. 1994. "Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease". Annual Review of Biochemistry, vol. 63, p. 345-382.
- FUCHS, T. A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann et A. Zychlinsky. 2007. "Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps". Journal of Cell Biology, vol. 176, no. 2, p. 231-241.
- GALOU, M., E. Colucci-Guyon, D. Ensergueix, J. L. Ridet, y. Gimenez Ribotta M, A. Privat, C. Babinet et P. Dupouey. 1996. "Disrupted glial fibrillary acidic protein network in astrocytes from vimentin knockout mice". Journal of Cell Biology, vol. 133, no. 4, p. 853-863.
- GARDAI, S. J., D. L. Bratton, C. A. Ogden et P. M. Henson. 2006. "Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective". Journal of Leukocyte Biology, vol. 79, no. 5, p. 896-903.
- GARDAI, S. J., K. A. McPhillips, S. C. Frasch, W. J. Janssen, A. Starefeldt, J. E. Murphy-Ullrich, D. L. Bratton, P. A. Oldenborg, M. Michalak et P. M. Henson. 2005. "Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte". Cell, vol. 123, no. 2, p. 321-334.
- GENSLER, T. J., M. Hottelet, C. Zhang, S. Schlossman, P. Anderson et P. J. Utz. 2001. "Monoclonal antibodies derived from BALB/c mice immunized with apoptotic Jurkat T cells recognize known autoantigens". Journal of Autoimmunity, vol. 16, no. 1, p. 59-69.

- GEORGATOS, S. D. et G. Blobel. 1987. "Two distinct attachment sites for vimentin along the plasma membrane and the nuclear envelope in avian erythrocytes: a basis for a vectorial assembly of intermediate filaments". Journal of Cell Biology, vol. 105, no. 1, p. 105-115.
- GILLARD, B. K., R. Clement, E. Colucci-Guyon, C. Babinet, G. Schwarzmann, T. Taki, T. Kasama et D. M. Marcus. 1998. "Decreased synthesis of glycosphingolipids in cells lacking vimentin intermediate filaments". Experimental Cell Research, vol. 242, no. 2, p. 561-572.
- GILLIGAN, H. M., B. Bredy, H. R. Brady, M. J. Hebert, H. S. Slayter, Y. Xu, J. Rauch, M. A. Shia, J. S. Koh et J. S. Levine. 1996. "Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies interact with primary granule constituents on the surface of apoptotic neutrophils in the absence of neutrophil priming". Journal of Experimental Medicine, vol. 184, no. 6, p. 2231-2241.
- 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.
- GIRARD, D., R. Paquin, P. H. Naccache et A. D. Beaulieu. 1996. "Effects of interleukin-13 on human neutrophil functions". Journal of Leukocyte Biology, vol. 59, no. 3, p. 412-419.
- GOMI, H., T. Yokoyama, K. Fujimoto, T. Ikeda, A. Katoh, T. Itoh et S. Itohara. 1995. "Mice devoid of the glial fibrillary acidic protein develop normally and are susceptible to scrapie prions". Neuron, vol. 14, no. 1, p. 29-41.
- GONZALES, M., B. Weksler, D. Tsuruta, R. D. Goldman, K. J. Yoon, S. B. Hopkinson, F. W. Flitney et J. C. Jones. 2001. "Structure and function of a vimentin-associated matrix adhesion in endothelial cells". Molecular Biology of the Cell, vol. 12, no. 1, p. 85-100.
- GUILLY, M. N., F. Danon, J. C. Brouet, M. Bornens et J. C. Courvalin. 1987. "Autoantibodies to nuclear lamin B in a patient with thrombopenia". European Journal of Cell Biology, vol. 43, no. 2, p. 266-272.
- GUZIK, K., M. Bzowska, J. Smagur, O. Krupa, M. Sieprawska, J. Travis et J. Potempa. 2007. "A new insight into phagocytosis of apoptotic cells: proteolytic enzymes divert the recognition and clearance of polymorphonuclear leukocytes by macrophages". Cell Death and Differentiation, vol. 14, no. 1, p. 171-182.
- HAMPTON, M. B., A. J. Kettle et C. C. Winterbourn. 1998. "Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing". Blood, vol. 92, no. 9, p. 3007-3017.

- 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, no. 5, p. 493-503.
- HASAN, A. A., T. Zisman et A. H. Schmaier. 1998. "Identification of cytokeratin 1 as a binding protein and presentation receptor for kininogens on endothelial cells". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, no. 7, p. 3615-3620.
- HASHIMOTO, M., S. Inoue, S. Ogawa, C. Conrad, M. Muramatsu, D. Shackelford et E. Masliah. 1998. "Rapid fragmentation of vimentin in human skin fibroblasts exposed to tamoxifen: a possible involvement of caspase-3". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 247, no. 2, p. 401-406.
- HEMBROUGH, T. A., L. Li et S. L. Gonias. 1996. "Cell-surface cytokeratin 8 is the major plasminogen receptor on breast cancer cells and is required for the accelerated activation of cell-associated plasminogen by tissue-type plasminogen activator". Journal of Biological Chemistry, vol. 271, no. 41, p. 25684-25691.
- HENRION, D., F. Terzi, K. Matrougui, M. Duriez, C. M. Boulanger, E. Colucci-Guyon, C. Babinet, P. Briand, G. Friedlander, P. Poitevin et B. I. Levy. 1997. "Impaired flow-induced dilation in mesenteric resistance arteries from mice lacking vimentin". Journal of Clinical Investigation, vol. 100, no. 11, p. 2909-2914.
- HENSON, P. M. 2005. "Dampening inflammation". Nature Immunology, vol. 6, no. 12, p. 1179-1181.
- HOFFMANN, K., C. K. Dreger, A. L. Olins, D. E. Olins, L. D. Shultz, B. Lucke, H. Karl, R. Kaps, D. Muller, A. Vaya, J. Aznar, R. E. Ware, N. Sotelo Cruz, T. H. Lindner, H. Herrmann, A. Reis et K. Sperling. 2002. "Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huet anomaly)". Nature Genetics, vol. 31, no. 4, p. 410-414.
- HOFFMANN, K., K. Sperling, A. L. Olins et D. E. Olins. 2007. "The granulocyte nucleus and lamin B receptor: avoiding the ovoid". Chromosoma, vol. 116, no. 3, p. 227-235.
- HOLMER, L. et H. J. Worman. 2001. "Inner nuclear membrane proteins: functions and targeting". Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 58, no. 12-13, p. 1741-1747.
- HOMBURG, C. H., M. de Haas, A. E. von dem Borne, A. J. Verhoeven, C. P. Reutelingsperger et D. Roos. 1995. "Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro". Blood, vol. 85, no. 2, p. 532-540.

HUANG, C. K., J. F. Devanney et S. P. Kennedy. 1988. "Vimentin, a cytoskeletal substrate of protein kinase C". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 150, no. 3, p. 1006-1011.

IVASKA, J., H. M. Pallari, J. Nevo et J. E. Eriksson. 2007. "Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling". Experimental Cell Research, vol. 313, no. 10, p. 2050-2062.

JONES, J. et B. P. Morgan. 1995. "Apoptosis is associated with reduced expression of complement regulatory molecules, adhesion molecules and other receptors on polymorphonuclear leucocytes: functional relevance and role in inflammation". Immunology, vol. 86, no. 4, p. 651-660.

KAO, W. W., C. Y. Liu, R. L. Converse, A. Shiraishi, C. W. Kao, M. Ishizaki, T. Doetschman et J. Duffy. 1996. "Keratin 12-deficient mice have fragile corneal epithelia". Investigative Ophthalmology and Visual Science, vol. 37, no. 13, p. 2572-2584.

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, no. 5, p. 2234-2238.

KOBAYASHI, S. D. et F. R. Deleo. 2004. "An apoptosis differentiation programme in human polymorphonuclear leucocytes". Biochemical Society Transactions, vol. 32 (Pt 3), p. 474-476.

KOTHAKOTA, S., T. Azuma, C. Reinhard, A. Klippel, J. Tang, K. Chu, T. J. McGarry, M. W. Kirschner, K. Koths, D. J. Kwiatkowski et L. T. Williams. 1997. "Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis". Science, vol. 278, no. 5336, p. 294-298.

KRYSZKE, M. H. et P. Vicart. 1998. "Regulation of the expression of the human vimentin gene: application to cellular immortalization". Pathologie Biologie (Paris), vol. 46, no. 1, p. 39-45.

KU, N. O., J. Liao et M. B. Omary. 1997. "Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins". Journal of Biological Chemistry, vol. 272, no. 52, p. 33197-33203.

KU, N. O. et M. B. Omary. 2001. "Effect of mutation and phosphorylation of type I keratins on their caspase-mediated degradation". Journal of Biological Chemistry, vol. 276, no. 29, p. 26792-26798.

KUNISAKI, Y., S. Masuko, M. Noda, A. Inayoshi, T. Sanui, M. Harada, T. Sasazuki et Y. Fukui. 2004. "Defective fetal liver erythropoiesis and T lymphopoiesis in mice lacking the phosphatidylserine receptor". Blood, vol. 103, no. 9, p. 3362-3364.

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, no. 42, p. 4807-4814.

KVIETYS, P. R. et M. Sandig. 2001. "Neutrophil diapedesis: paracellular or transcellular?". News in Physiological Sciences, vol. 16, p. 15-19.

LANGA, F., C. Kress, E. Colucci-Guyon, H. Khun, S. Vandormael-Pourmin, M. Huerre et C. Babinet. 2000. "Teratocarcinomas induced by embryonic stem (ES) cells lacking vimentin: an approach to study the role of vimentin in tumorigenesis". Journal of Cell Science, vol. 113 (Pt 19), p. 3463-3472.

LAVASTRE, V., S. Chiasson, H. Cavalli et D. Girard. 2005. "Viscum album agglutinin-I (VAA-I) induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins in human leukemia PLB-985 and X-CGD cells via caspases: lamin B1 is a novel target of VAA-I". Leukemia Research, vol. 29, no. 12, p. 1443-1453.

LAVASTRE, V. et D. Girard. 2002. "Tributyltin induces human neutrophil apoptosis and selective degradation of cytoskeletal proteins by caspases". Journal of Toxicology and Environmental Health A, vol. 65, no. 14, p. 1013-1024.

LAVASTRE, V., M. Pelletier, R. Saller, K. Hostanska et 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". Journal of Immunology, vol. 168, no. 3, p. 1419-1427.

LAVASTRE, V., C. J. Roberge, M. Pelletier, M. Gauthier et D. Girard. 2002b. "Toxaphene, but not beryllium, induces human neutrophil chemotaxis and apoptosis via reactive oxygen species (ROS): involvement of caspases and ROS in the degradation of cytoskeletal proteins". Clinical Immunology, vol. 104, no. 1, p. 40-48.

LEONG, H. S., B. M. Mahesh, J. R. Day, J. D. Smith, A. D. McCormack, G. Ghimire, T. J. Podor et M. L. Rose. 2008. "Vimentin autoantibodies induce platelet activation and formation of platelet-leukocyte conjugates via platelet-activating factor". Journal of Leukocyte Biology, vol. 83, p. 263-71.

LEY, K. 2002. "Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils". Immunological Reviews, vol. 186, p. 8-18.

LEY, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky et S. Nourshargh. 2007. "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated". Nat Rev Immunol, vol. 7, no. 9, p. 678-689.

LI, M. O., M. R. Sarkisian, W. Z. Mehal, P. Rakic et R. A. Flavell. 2003. "Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells". Science, vol. 302, no. 5650, p. 1560-1563.

- LI, Z., E. Colucci-Guyon, M. Pincon-Raymond, M. Mericskay, S. Pournin, D. Paulin et C. Babinet. 1996. "Cardiovascular lesions and skeletal myopathy in mice lacking desmin". Developmental Biology, vol. 175, no. 2, p. 362-366.
- LIEDTKE, W., W. Edelmann, P. L. Bieri, F. C. Chiu, N. J. Cowan, R. Kucherlapati et C. S. Raine. 1996. "GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination". Neuron, vol. 17, no. 4, p. 607-615.
- LOMINADZE, G., D. W. Powell, G. C. Luerman, A. J. Link, R. A. Ward et K. R. McLeish. 2005. "Proteomic analysis of human neutrophil granules". Molecular & Cellular Proteomics, vol. 4, no. 10, p. 1503-1521.
- LUSTER, A. D., R. Alon et U. H. von Andrian. 2005. "Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets". Nature Immunology, vol. 6, no. 12, p. 1182-1190.
- MAJAI, G., G. Petrovski et L. Fesus. 2006. "Inflammation and the apopto-phagocytic system". Immunology Letters, vol. 104, no. 1-2, p. 94-101.
- MANFREDI, A. A., M. Iannacone, F. D'Auria et P. Rovere-Querini. 2002. "The disposal of dying cells in living tissues". Apoptosis, vol. 7, no. 2, p. 153-161.
- MARCEAU, N., B. Schutte, S. Gilbert, A. Loranger, M. E. Henfling, J. L. Broers, J. Mathew et F. C. Ramaekers. 2007. "Dual roles of intermediate filaments in apoptosis". Experimental Cell Research, vol. 313, no. 10, p. 2265-2281.
- MASHIMA, T., M. Naito et T. Tsuruo. 1999. "Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis". Oncogene, vol. 18, no. 15, p. 2423-2430.
- MCCALL, M. A., R. G. Gregg, R. R. Behringer, M. Brenner, C. L. Delaney, E. J. Galbreath, C. L. Zhang, R. A. Pearce, S. Y. Chiu et A. Messing. 1996. "Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 93, no. 13, p. 6361-6366.
- MENARD, H. A., E. Lapointe, M. D. Rochdi et Z. J. Zhou. 2000. "Insights into rheumatoid arthritis derived from the Sa immune system". Arthritis Research, vol. 2, no. 6, p. 429-432.
- MERIANE, M., S. Mary, F. Comunale, E. Vignal, P. Fort et C. Gauthier-Rouviere. 2000. "Cdc42Hs and Rac1 GTPases induce the collapse of the vimentin intermediate filament network". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, no. 42, p. 33046-33052.
- MESSING, A. et M. Brenner. 2003. "GFAP: functional implications gleaned from studies of genetically engineered mice". Glia, vol. 43, no. 1, p. 87-90.

- MEVORACH, D., J. L. Zhou, X. Song et K. B. Elkon. 1998. "Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production". Journal of Experimental Medicine, vol. 188, no. 2, p. 387-392.
- MIGLIORINI, P., F. Pratesi, C. Tommasi et C. Anzilotti. 2005. "The immune response to citrullinated antigens in autoimmune diseases". Autoimmunity Reviews, vol. 4, no. 8, p. 561-564.
- MILLAN, J., L. Hewlett, M. Glyn, D. Toomre, P. Clark et A. J. Ridley. 2006. "Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains". Nat Cell Biol, vol. 8, no. 2, p. 113-123.
- MILLER, W. H. Jr, H. M. Schipper, J. S. Lee, J. Singer et S. Waxman. 2002. "Mechanisms of action of arsenic trioxide". Cancer Research, vol. 62, no. 14, p. 3893-3903.
- MILNER, D. J., G. Weitzer, D. Tran, A. Bradley et Y. Capetanaki. 1996. "Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin". Journal of Cell Biology, vol. 134, no. 5, p. 1255-1270.
- MOCCI, S., K. Lafferty et M. Howard. 2000. "The role of autoantigens in autoimmune disease". Current Opinion in Immunology, vol. 12, no. 6, p. 725-730.
- MOFFATT, O. D., A. Devitt, E. D. Bell, D. L. Simmons et C. D. Gregory. 1999. "Macrophage recognition of ICAM-3 on apoptotic leukocytes". Journal of Immunology, vol. 162, no. 11, p. 6800-6810.
- MOIR, R. D. et T. P. Spann. 2001. "The structure and function of nuclear lamins: implications for disease". Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 58, no. 12-13, p. 1748-1757.
- MOISAN, E., S. Arbour, N. Nguyen, M. J. Hebert, D. Girard, J. Bernier, M. Fournier et E. Kouassi. 2002. "Prolongation of human neutrophil survival by low-level mercury via inhibition of spontaneous apoptosis". Journal of Toxicology and Environmental Health A, vol. 65, no. 2, p. 183-203.
- MOISAN, E., E. Kouassi et D. Girard. 2003. "Mechanisms involved in methylmercuric chloride (MeHgCl)-induced suppression of human neutrophil apoptosis". Human and Experimental Toxicology, vol. 22, no. 12, p. 629-637.
- MOR-VAKNIN, N., A. Punturieri, K. Sitwala et D. M. Markovitz. 2003. "Vimentin is secreted by activated macrophages". Nature Cell Biology, vol. 5, no. 1, p. 59-63.
- MORISHIMA, N. 1999. "Changes in nuclear morphology during apoptosis correlate with vimentin cleavage by different caspases located either upstream or downstream of Bcl-2 action". Genes to Cells, vol. 4, no. 7, p. 401-414.

- MOSS, D. K. et J. D. Lane. 2006. "Microtubules: forgotten players in the apoptotic execution phase". Trends in Cell Biology, vol. 16, no. 7, p. 330-338.
- MOULDING, D. A., C. A. Hart et S. W. Edwards. 1999. "Regulation of neutrophil FcγRIIIb (CD16) surface expression following delayed apoptosis in response to GM-CSF and sodium butyrate". Journal of Leukocyte Biology, vol. 65, no. 6, p. 875-882.
- MULLER, K., S. Dulku, S. J. Hardwick, J. N. Skepper et M. J. Mitchinson. 2001. "Changes in vimentin in human macrophages during apoptosis induced by oxidised low density lipoprotein". Atherosclerosis, vol. 156, no. 1, p. 133-144.
- NAHM, D. H., C. Tkaczyk, N. Fukuishi, E. Colucci-Guyon, A. M. Gilfillan et D. D. Metcalfe. 2003. "Identification of Fyn-binding proteins in MC/9 mast cells using mass spectrometry". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 310, no. 1, p. 202-208.
- NAKANISHI, K., M. Maruyama, T. Shibata et N. Morishima. 2001. "Identification of a caspase-9 substrate and detection of its cleavage in programmed cell death during mouse development". Journal of Biological Chemistry, vol. 276, no. 44, p. 41237-41244.
- NESHER, G., R. Margalit et Y. J. Ashkenazi. 2001. "Anti-nuclear envelope antibodies: Clinical associations". Seminars in Arthritis and Rheumatism, vol. 30, no. 5, p. 313-320.
- NIEMELA, H., K. Elima, T. Henttinen, H. Irjala, M. Salmi et S. Jalkanen. 2005. "Molecular identification of PAL-E, a widely used endothelial-cell marker". Blood, vol. 106, no. 10, p. 3405-3409.
- NIEMINEN, M., T. Henttinen, M. Merinen, F. Marttila-Ichihara, J. E. Eriksson et S. Jalkanen. 2006. "Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration". Nature Cell Biology, vol. 8, no. 2, p. 156-162.
- NUSBAUM, P., C. Laine, M. Bouaouina, S. Seveau, E. M. Cramer, J. M. Masse, P. Lesavre et L. Halbwachs-Mecarelli. 2005. "Distinct signaling pathways are involved in leukosialin (CD43) down-regulation, membrane blebbing, and phospholipid scrambling during neutrophil apoptosis". Journal of Biological Chemistry, vol. 280, no. 7, p. 5843-5853.
- NUSBAUM, P., C. Laine, S. Seveau, P. Lesavre et L. Halbwachs-Mecarelli. 2004. "Early membrane events in polymorphonuclear cell (PMN) apoptosis: membrane blebbing and vesicle release, CD43 and CD16 down-regulation and phosphatidylserine externalization". Biochemical Society Transactions, vol. 32 (Pt 3), p. 477-479.
- O'NEILL, A., M. C. Greenan, B. Doyle, J. M. Fitzpatrick et R. W. Watson. 2004. "Gene profiling of in vitro and in vivo models of delayed neutrophil apoptosis: a common pathway?". Biochemical Society Transactions, vol. 32 (Pt 3), p. 470-473.

- OHTSU, M., N. Sakai, H. Fujita, M. Kashiwagi, S. Gasa, S. Shimizu, Y. Eguchi, Y. Tsujimoto, Y. Sakiyama, K. Kobayashi et N. Kuzumaki. 1997. "Inhibition of apoptosis by the actin-regulatory protein gelsolin". EMBO Journal, vol. 16, no. 15, p. 4650-4656.
- OLINS, A. L., H. Herrmann, P. Lichter, M. Kratzmeier, D. Doenecke et D. E. Olins. 2001. "Nuclear envelope and chromatin compositional differences comparing undifferentiated and retinoic acid- and phorbol ester-treated HL-60 cells". Experimental Cell Research, vol. 268, no. 2, p. 115-127.
- OLINS, A. L. et D. E. Olins. 2004. "Cytoskeletal influences on nuclear shape in granulocytic HL-60 cells". BMC Cell Biology, vol. 5, p. 30.
- OWEN, P. J., G. D. Johnson et J. M. Lord. 1996. "Protein kinase C-delta associates with vimentin intermediate filaments in differentiated HL60 cells". Experimental Cell Research, vol. 225, no. 2, p. 366-373.
- PADIATH, Q. S., K. Saigoh, R. Schiffmann, H. Asahara, T. Yamada, A. Koeppen, K. Hogan, L. J. Ptacek et Y. H. Fu. 2006. "Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy". Nature Genetics, vol. 38, no. 10, p. 1114-1123.
- PARAMIO, J. M. et J. L. Jorcano. 2002. "Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling?". Bioessays, vol. 24, no. 9, p. 836-844.
- PAULIN, D. et Z. Li. 2004. "Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle". Experimental Cell Research, vol. 301, no. 1, p. 1-7.
- PEKNY, M., C. B. Johansson, C. Eliasson, J. Stakeberg, A. Wallen, T. Perlmann, U. Lendahl, C. Betsholtz, C. H. Berthold et J. Frisen. 1999. "Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin". Journal of Cell Biology, vol. 145, no. 3, p. 503-514.
- PEKNY, M., P. Leveen, M. Pekna, C. Eliasson, C. H. Berthold, B. Westermarck et C. Betsholtz. 1995. "Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally". EMBO Journal, vol. 14, no. 8, p. 1590-1598.
- PELLETIER, M., A. Bouchard et D. Girard. 2004. "In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation". Journal of Immunology, vol. 173, no. 12, p. 7521-7530.
- PERIDES, G., C. Harter et P. Traub. 1987. "Electrostatic and hydrophobic interactions of the intermediate filament protein vimentin and its amino terminus with lipid bilayers". Journal of Biological Chemistry, vol. 262, no. 28, p. 13742-13749.
- PERLSON, E., S. Hanz, K. Ben-Yaakov, Y. Segal-Ruder, R. Seger et M. Fainzilber. 2005. "Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve". Neuron, vol. 45, no. 5, p. 715-726.

- PERRETTI, M., A. Ahluwalia, J. G. Harris, N. J. Goulding et R. J. Flower. 1993. "Lipocortin-1 fragments inhibit neutrophil accumulation and neutrophil-dependent edema in the mouse. A qualitative comparison with an anti-CD11b monoclonal antibody". Journal of Immunology, vol. 151, no. 8, p. 4306-4314.
- PETERS, B., J. Kirfel, H. Bussow, M. Vidal et T. M. Magin. 2001. "Complete cytolysis and neonatal lethality in keratin 5 knockout mice reveal its fundamental role in skin integrity and in epidermolysis bullosa simplex". Molecular Biology of the Cell, vol. 12, no. 6, p. 1775-1789.
- PETRI, B. et M. G. Bixel. 2006. "Molecular events during leukocyte diapedesis". FEBS Journal, vol. 273, no. 19, p. 4399-4407.
- PHILLIPSON, M., B. Heit, P. Colarusso, L. Liu, C. M. Ballantyne et P. Kubes. 2006. "Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade". Journal of Experimental Medicine, vol. 203, no. 12, p. 2569-2575.
- PICKERING, M. C., S. Fischer, M. R. Lewis, M. J. Walport, M. Botto et H. T. Cook. 2001. "Ultraviolet-radiation-induced keratinocyte apoptosis in C1q-deficient mice". Journal of Investigative Dermatology, vol. 117, no. 1, p. 52-58.
- PODOR, T. J., D. Singh, P. Chindemi, D. M. Foulon, R. McKelvie, J. I. Weitz, R. Austin, G. Boudreau et R. Davies. 2002. "Vimentin exposed on activated platelets and platelet microparticles localizes vitronectin and plasminogen activator inhibitor complexes on their surface". Journal of Biological Chemistry, vol. 277, no. 9, p. 7529-7539.
- POPE, R. M. 2002. "Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis". Nature Reviews Immunology, vol. 2, no. 7, p. 527-535.
- POR, S. B., M. A. Cooley, S. N. Breit, R. Penny et P. W. French. 1991. "Antibodies to tubulin and actin bind to the surface of a human monocytic cell line, U937". Journal of Histochemistry and Cytochemistry, vol. 39, no. 7, p. 981-985.
- PORTER, R. M. et E. B. Lane. 2003. "Phenotypes, genotypes and their contribution to understanding keratin function". Trends in Genetics, vol. 19, no. 5, p. 278-285.
- POSEY, S. C., M. P. Martelli, T. Azuma, D. J. Kwiatkowski et B. E. Bierer. 2000. "Failure of gelsolin overexpression to regulate lymphocyte apoptosis". Blood, vol. 95, no. 11, p. 3483-3488.
- PROPATO, A., G. Cutrona, V. Francavilla, M. Ulivi, E. Schiaffella, O. Landt, R. Dunbar, V. Cerundolo, M. Ferrarini et V. Barnaba. 2001. "Apoptotic cells overexpress vinculin and induce vinculin-specific cytotoxic T-cell cross-priming". Nature Medicine, vol. 7, no. 7, p. 807-813.

- PRYZWANSKY, K. B. et E. P. Merricks. 1998. "Chemotactic peptide-induced changes of intermediate filament organization in neutrophils during granule secretion: role of cyclic guanosine monophosphate". Molecular Biology of the Cell, vol. 9, no. 10, p. 2933-2947.
- PRYZWANSKY, K. B., T. A. Wyatt et T. M. Lincoln. 1995. "Cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase is targeted to intermediate filaments and phosphorylates vimentin in A23187-stimulated human neutrophils". Blood, vol. 85, no. 1, p. 222-230.
- REEVES, W. H. et S. A. Ali. 1989. "Preferential use of lambda L chain in lamin B autoantibodies". Journal of Immunology, vol. 143, no. 11, p. 3614-3618.
- REEVES, W. H., N. Chaudhary, A. Salerno et G. Blobel. 1987. "Lamin B autoantibodies in sera of certain patients with systemic lupus erythematosus". Journal of Experimental Medicine, vol. 165, no. 3, p. 750-762.
- REICHEL, J., H. Bussow, C. Grund et T. M. Magin. 2001. "Formation of a normal epidermis supported by increased stability of keratins 5 and 14 in keratin 10 null mice". Molecular Biology of the Cell, vol. 12, no. 6, p. 1557-1568.
- RODRIGUEZ-MAHOU, M., F. J. Lopez-Longo, S. Sanchez-Ramon, A. Estechea, A. Garcia-Segovia, J. J. Rodriguez-Molina, L. Carreno et E. Fernandez-Cruz. 2006. "Association of anti-cyclic citrullinated peptide and anti-Sa/citrullinated vimentin autoantibodies in rheumatoid arthritis". Arthritis and Rheumatism, vol. 55, no. 4, p. 657-661.
- ROGERS, K. R., C. J. Morris et D. R. Blake. 1992. "The cytoskeleton and its importance as a mediator of inflammation". Annals of the Rheumatic Diseases, vol. 51, no. 4, p. 565-571.
- ROOS, A., W. Xu, G. Castellano, A. J. Nauta, P. Garred, M. R. Daha et C. van Kooten. 2004. "Mini-review: A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells". European Journal of Immunology, vol. 34, no. 4, p. 921-929.
- RUNEMBART, I., G. Queffeuilou, P. Federici, F. Vrtovsnik, E. Colucci-Guyon, C. Babinet, P. Briand, G. Trugnan, G. Friedlander et F. Terzi. 2002. "Vimentin affects localization and activity of sodium-glucose cotransporter SGLT1 in membrane rafts". Journal of Cell Science, vol. 115 (Pt 4), p. 713-724.
- SANCHEZ, A., C. Ossorio, J. M. Alvaro-Gracia, R. Padilla et J. Avila. 1990. "A subset of antibodies from the sera of patients with systemic lupus erythematosus react with vimentin and DNA". Journal of Rheumatology, vol. 17, no. 2, p. 205-209.
- SANGHAVI, D. M., M. Thelen, N. A. Thornberry, L. Casciola-Rosen et A. Rosen. 1998. "Caspase-mediated proteolysis during apoptosis: insights from apoptotic neutrophils". FEBS Letters, vol. 422, no. 2, p. 179-184.

- SAVILL, J., I. Dransfield, C. Gregory et C. Haslett. 2002. "A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses". Nature Reviews Immunology, vol. 2, no. 12, p. 965-975.
- 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, no. 6, p. 845-853.
- SCANNELL, M., M. B. Flanagan, A. Destefani, K. J. Wynne, G. Cagney, C. Godson et P. Maderna. 2007. "Annexin-1 and Peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages". Journal of Immunology, vol. 178, no. 7, p. 4595-4605.
- SCHIETKE, R., D. Brohl, T. Wedig, N. Mucke, H. Herrmann et T. M. Magin. 2006. "Mutations in vimentin disrupt the cytoskeleton in fibroblasts and delay execution of apoptosis". European Journal of Cell Biology, vol. 85, no. 1, p. 1-10.
- SCHIFFERS, P. M., D. Henrion, C. M. Boulanger, E. Colucci-Guyon, F. Langa-Vuves, H. van Essen, G. E. Fazzi, B. I. Levy et J. G. De Mey. 2000. "Altered flow-induced arterial remodeling in vimentin-deficient mice". Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, vol. 20, no. 3, p. 611-616.
- SCHILTZ, C., F. Liote, F. Prudhommeaux, A. Meunier, R. Champy, J. Callebert et T. Bardin. 2002. "Monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation in vivo: quantitative histomorphometric analysis of cellular events". Arthritis and Rheumatism, vol. 46, no. 6, p. 1643-1650.
- SCHUTTE, B., M. Henfling, W. Kolgen, M. Bouman, S. Meex, M. P. Leers, M. Nap, V. Bjorklund, P. Bjorklund, B. Bjorklund, E. B. Lane, M. B. Omary, H. Jornvall et F. C. Ramaekers. 2004. "Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis". Experimental Cell Research, vol. 297, no. 1, p. 11-26.
- SCHUTZ, W., M. Alsheimer, R. Ollinger et R. Benavente. 2005. "Nuclear envelope remodeling during mouse spermiogenesis: postmeiotic expression and redistribution of germline lamin B3". Experimental Cell Research, vol. 307, no. 2, p. 285-291.
- SCOTT, R. S., E. J. McMahon, S. M. Pop, E. A. Reap, R. Caricchio, P. L. Cohen, H. S. Earp et G. K. Matsushima. 2001. "Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER". Nature, vol. 411, no. 6834, p. 207-211.
- SEDGWICK, A. D., Y. M. Sin, A. R. Moore, J. C. Edwards et D. A. Willoughby. 1984. "Effects of local administration of hydrocortisone on cartilage degradation in vivo". Annals of the Rheumatic Diseases, vol. 43, no. 3, p. 418-420.
- SEELY, A. J., J. L. Pascual et N. V. Christou. 2003. "Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance". Critical Care, vol. 7, no. 4, p. 291-307.

- SELYE, H. 1953. "On the mechanism through which hydrocortisone affects the resistance of tissues to injury; an experimental study with the granuloma pouch technique". Journal of the American Medical Association, vol. 152, no. 13, p. 1207-1213.
- SERHAN, C. N. et J. Savill. 2005. "Resolution of inflammation: the beginning programs the end". Nature Immunology, vol. 6, no. 12, p. 1191-1197.
- SERRANDER, L., P. Skarman, B. Rasmussen, W. Witke, D. P. Lew, K. H. Krause, O. Stendahl et O. Nusse. 2000. "Selective inhibition of IgG-mediated phagocytosis in gelsolin-deficient murine neutrophils". Journal of Immunology, vol. 165, no. 5, p. 2451-2457.
- SHARIAT-MADAR, Z., F. Mahdi et A. H. Schmaier. 1999. "Mapping binding domains of kininogens on endothelial cell cytokeratin 1". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, no. 11, p. 7137-7145.
- SHEPPARD, F. R., M. R. Kelher, E. E. Moore, N. J. McLaughlin, A. Banerjee et C. C. Silliman. 2005. "Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation". Journal of Leukocyte Biology, vol. 78, no. 5, p. 1025-1042.
- SHERIFF, A., U. S. Gaipf, S. Franz, P. Heyder, R. E. Voll, J. R. Kalden et M. Herrmann. 2004. "Loss of GM1 surface expression precedes annexin V-phycoerythrin binding of neutrophils undergoing spontaneous apoptosis during in vitro aging". Cytometry A, vol. 62, no. 2, p. 75-80.
- SHIM, S. R., S. Kook, J. I. Kim et W. K. Song. 2001. "Degradation of focal adhesion proteins paxillin and p130cas by caspases or calpains in apoptotic rat-1 and L929 cells". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 286, no. 3, p. 601-608.
- SIHAG, R. K., M. Inagaki, T. Yamaguchi, T. B. Shea et H. C. Pant. 2007. "Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments". Experimental Cell Research, vol. 313, no. 10, p. 2098-2109.
- SIMON, H. U. 2003. "Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation". Immunological Reviews, vol. 193, p. 101-110.
- SULLIVAN, T., D. Escalante-Alcalde, H. Bhatt, M. Anver, N. Bhat, K. Nagashima, C. L. Stewart et B. Burke. 1999. "Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy". Journal of Cell Biology, vol. 147, no. 5, p. 913-920.
- SURIA, H., L. A. Chau, E. Negrou, D. J. Kelvin et J. Madrenas. 1999. "Cytoskeletal disruption induces T cell apoptosis by a caspase-3 mediated mechanism". Life Sciences, vol. 65, no. 25, p. 2697-2707.

TAYLOR, P. R., A. Carugati, V. A. Fadok, H. T. Cook, M. Andrews, M. C. Carroll, J. S. Savill, P. M. Henson, M. Botto et M. J. Walport. 2000. "A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo". Journal of Experimental Medicine, vol. 192, no. 3, p. 359-366.

TERJUNG, B., V. Herzog, H. J. Worman, I. Gestmann, C. Bauer, T. Sauerbruch et U. Spengler. 1998. "Atypical antineutrophil cytoplasmic antibodies with perinuclear fluorescence in chronic inflammatory bowel diseases and hepatobiliary disorders colocalize with nuclear lamina proteins". Hepatology, vol. 28, no. 2, p. 332-340.

TERZI, F., D. Henrion, E. Colucci-Guyon, P. Federici, C. Babinet, B. I. Levy, P. Briand et G. Friedlander. 1997. "Reduction of renal mass is lethal in mice lacking vimentin. Role of endothelin-nitric oxide imbalance". Journal of Clinical Investigation, vol. 100, no. 6, p. 1520-1528.

TESSIER, P. A., P. H. Naccache, I. Clark-Lewis, R. P. Gladue, K. S. Neote et S. R. McColl. 1997. "Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha". Journal of Immunology, vol. 159, no. 7, p. 3595-3602.

THEBAULT, S., D. Gilbert, M. Hubert, L. Drouot, N. Machour, C. Lange, R. Charlionet et F. Tron. 2002. "Orderly pattern of development of the autoantibody response in (New Zealand White x BXSB)F1 lupus mice: characterization of target antigens and antigen spreading by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry". Journal of Immunology, vol. 169, no. 7, p. 4046-4053.

TOLSTONOG, G. V., I. V. Belichenko-Weitzmann, J. P. Lu, R. Hartig, R. L. Shoeman, U. Traub et P. Traub. 2005. "Spontaneously immortalized mouse embryo fibroblasts: growth behavior of wild-type and vimentin-deficient cells in relation to mitochondrial structure and activity". DNA and Cell Biology, vol. 24, no. 11, p. 680-709.

TSURUTA, D. et J. C. Jones. 2003. "The vimentin cytoskeleton regulates focal contact size and adhesion of endothelial cells subjected to shear stress". Journal of Cell Science, vol. 116 (Pt 24), p. 4977-4984.

TUROWSKI, P., T. Myles, B. A. Hemmings, A. Fernandez et N. J. Lamb. 1999. "Vimentin dephosphorylation by protein phosphatase 2A is modulated by the targeting subunit B55". Molecular Biology of the Cell, vol. 10, no. 6, p. 1997-2015.

VAN GAALEN, F., A. Ioan-Facsinay, T. W. Huizinga et R. E. Toes. 2005. "The devil in the details: the emerging role of anticitrulline autoimmunity in rheumatoid arthritis". Journal of Immunology, vol. 175, no. 9, p. 5575-5580.

VANDIVIER, R. W., C. A. Ogden, V. A. Fadok, P. R. Hoffmann, K. K. Brown, M. Botto, M. J. Walport, J. H. Fisher, P. M. Henson et K. E. Greene. 2002. "Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex". Journal of Immunology, vol. 169, no. 7, p. 3978-3986.

- VARON, D., S. Linder, E. Gembom, L. Guedg, H. Langbeheim, A. Berrebi et Z. Eshhar. 1990. "Human monoclonal antibody derived from an autoimmune thrombocytopenic purpura patient, recognizing an intermediate filament's determinant common to vimentin and desmin". Clinical Immunology and Immunopathology, vol. 54, no. 3, p. 454-468.
- VERGNES, L., M. Péterfy, M. O. Bergo, S. G. Young et K. Reue. 2004. "Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 101, no. 28, p. 10428-10433.
- VICENTE-MANZANARES, M. et F. Sanchez-Madrid. 2004. "Role of the cytoskeleton during leukocyte responses". Nature Reviews Immunology, vol. 4, no. 2, p. 110-122.
- VIVERS, S., S. J. Heasman, S. P. Hart et I. Dransfield. 2004. "Divalent cation-dependent and -independent augmentation of macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils by CD44 antibody". Clinical and Experimental Immunology, vol. 138, no. 3, p. 447-452.
- VLCEK, S., T. Dechat et R. Foisner. 2001. "Nuclear envelope and nuclear matrix: interactions and dynamics". Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 58, no. 12-13, p. 1758-1765.
- VOSSENAAR, E. R., N. Despres, E. Lapointe, A. van der Heijden, M. Lora, T. Senshu, W. J. van Venrooij et H. A. Menard. 2004. "Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin". Arthritis Research & Therapy, vol. 6, no. 2, p. R142-150.
- VOSSENAAR, E. R., T. R. Radstake, A. van der Heijden, M. A. van Mansum, C. Dieteren, D. J. de Rooij, P. Barrera, A. J. Zendman et W. J. van Venrooij. 2004b. "Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages". Annals of the Rheumatic Diseases, vol. 63, no. 4, p. 373-381.
- WAGNER, J. G. et R. A. Roth. 2000. "Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature". Pharmacological Reviews, vol. 52, no. 3, p. 349-374.
- WEBB, P. R., K. Q. Wang, D. Scheel-Toellner, J. Pongracz, M. Salmon et J. M. Lord. 2000. "Regulation of neutrophil apoptosis: a role for protein kinase C and phosphatidylinositol-3-kinase". Apoptosis, vol. 5, no. 5, p. 451-458.
- WELLS, M. J., M. W. Hatton, B. Hewlett, T. J. Podor, W. P. Sheffield et M. A. Blajchman. 1997. "Cytokeratin 18 is expressed on the hepatocyte plasma membrane surface and interacts with thrombin-antithrombin complexes". Journal of Biological Chemistry, vol. 272, no. 45, p. 28574-28581.
- WHYTE, M., S. Renshaw, R. Lawson et C. Bingle. 1999. "Apoptosis and the regulation of neutrophil lifespan". Biochemical Society Transactions, vol. 27, no. 6, p. 802-807.

- 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, no. 11, p. 5124-5134.
- WILKINSON, R., A. B. Lyons, D. Roberts, M. X. Wong, P. A. Bartley et D. E. Jackson. 2002. "Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) acts as a regulator of B-cell development, B-cell antigen receptor (BCR)-mediated activation, and autoimmune disease". Blood, vol. 100, no. 1, p. 184-193.
- WILLIAMS, R. C. Jr. 2007. "Autoimmune disease etiology-a perplexing paradox or a turning leaf?". Autoimmunity Reviews, vol. 6, no. 4, p. 204-208.
- WILLIAMSON, P. et R. A. Schlegel. 2004. "Hide and seek: the secret identity of the phosphatidylserine receptor". Journal of Biology, vol. 3, no. 4, p. 14.
- WINDER, S. J. et K. R. Ayscough. 2005. "Actin-binding proteins". Journal of Cell Science, vol. 118 (Pt 4), p. 651-654.
- WITKE, W., A. H. Sharpe, J. H. Hartwig, T. Azuma, T. P. Stossel et D. J. Kwiatkowski. 1995. "Hemostatic, inflammatory, and fibroblast responses are blunted in mice lacking gelsolin". Cell, vol. 81, no. 1, p. 41-51.
- 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, no. 5, p. 617-653.
- WOJCIK, S. M., D. S. Bundman et D. R. Roop. 2000. "Delayed wound healing in keratin 6a knockout mice". Molecular and Cellular Biology, vol. 20, no. 14, p. 5248-5255.
- WOLFNER, M. F. et K. L. Wilson. 2001. "The nuclear envelope: emerging roles in development and disease". Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 58, no. 12-13, p. 1737-1740.
- WOLOSEWICK, J. J. 1984. "Distribution of actin in migrating leukocytes in vivo". Cell and Tissue Research, vol. 236, no. 3, p. 517-525.
- WORMAN, H. J. et G. Bonne. 2007. "'Laminopathies': A wide spectrum of human diseases". Experimental Cell Research, vol. 313, no. 10, p. 2121-2133.
- WYATT, T. A., T. M. Lincoln et K. B. Pryzwansky. 1991. "Vimentin is transiently co-localized with and phosphorylated by cyclic GMP-dependent protein kinase in formyl-peptide-stimulated neutrophils". Journal of Biological Chemistry, vol. 266, no. 31, p. 21274-21280.
- XU, B., R. M. deWaal, N. Mor-Vaknin, C. Hibbard, D. M. Markovitz et M. L. Kahn. 2004. "The endothelial cell-specific antibody PAL-E identifies a secreted form of vimentin in the blood vasculature". Molecular and Cellular Biology, vol. 24, no. 20, p. 9198-9206.

YABUKI, M., T. Miyake, Y. Doi, T. Fujiwara, K. Hamazaki, T. Yoshioka, A. A. Horton et K. Utsumi. 1999. "Role of nuclear lamins in nuclear segmentation of human neutrophils". Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR, vol. 31, no. 2, p. 77-84.

YOSHIDA, H., T. Murachi et I. Tsukahara. 1984. "Degradation of actin and vimentin by calpain II, a Ca²⁺-dependent cysteine proteinase, in bovine lens". FEBS Letters, vol. 170, no. 2, p. 259-262.

ZHANG, J., D. Henrion, T. Ebrahimian, J. Benessiano, E. Colucci-Guyon, F. Langa, B. I. Levy et C. M. Boulanger. 2001. "Increased contribution of L-arginine-nitric oxide pathway in aorta of mice lacking the gene for vimentin". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 38, no. 4, p. 552-560.

