

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

ACTIVATION DES NEUTROPHILES PAR LE TRIOXYDE D'ARSENIC :
LE RÔLE DE LA PROTÉINE KINASE SYK

Par
Francis Antoine

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

Jury d'évaluation

Examineur interne

Patrick Devine
INRS-Institut-Armand-Frappier

Examineur externe

Tamas Fulop
Université de Sherbrooke

Directeur de recherche

Denis Girard
INRS-Institut-Armand-Frappier

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier très chaleureusement mon directeur de recherche, Denis Girard, pour sa motivation contagieuse et son dynamisme exemplaire, mais surtout pour la confiance qu'il m'a accordée pendant les deux dernières années à travailler sur le projet. Sans lui, rien n'aurait été possible. Il a cru en moi et je lui en suis infiniment reconnaissant.

Je ne pourrai jamais oublier les collègues qui ont partagés temps et savoir durant ces années. Je remercie François Binet pour m'avoir transmis ses connaissances et techniques de façon rigoureuse mais agréablement humaine. Un remerciement spécial pour Sonia Chiasson et Jamila Ennaciri qui ont largement participé à mon éducation dans le laboratoire. Merci à David Gonçalves et Jean-Christophe Simard qui ont inspiré, mais surtout enduré, mes calembours quotidiens.

Je ne peux pas omettre de remercier l'Institut-Armand-Frappier de m'avoir permis de poursuivre un cursus académique de haut niveau scientifique, et maintenant d'avant-garde. Dans le même esprit, je remercie très humblement le musée Armand-Frappier pour m'avoir donné la chance d'œuvrer dans la vulgarisation scientifique. Merci donc à toute l'équipe du musée, mais plus particulièrement à Julie Potvin Barakatt pour m'avoir ouvert les yeux à ce sujet.

Le plus gros merci revient à mon père, Patrick, parce que son soutien m'est aujourd'hui très précieux. C'est une chance inouïe que de participer au développement de la société de cette façon. Cette chance, elle est donnée directement par le soutien financier, d'une part, mais surtout par le soutien moral qui incite à se surpasser. Je lui en serai éternellement reconnaissant. Merci à ma mère, Ellen, elle m'a donné toutes les bonnes qualités dont j'avais besoin pour percer dans le domaine.

Un dernier merci, mais non le moindre, à tous mes proches et amis, pour l'être et le rester. Merci aussi parce qu'ils ont tous su, à leur façon, contribuer au maintien de ma santé mentale et affective. Merci à ma Geneviève qui a enduré tous mes petits défauts durant les trois dernières années.

Table des matières

Remerciements.....	ii
Liste des abréviations.....	v
Liste des tableaux.....	vi
Sommaire.....	vii
Introduction.....	viii
Première partie.....	1
1. Le système immunitaire (SI).....	2
1.1 Le SI inné.....	2
1.1.1 Les barrières physiologiques.....	2
1.1.2 L'origine du système immunitaire.....	4
1.1.3 Les constituants cellulaires de l'immunité innée.....	4
1.2 Le SI acquis.....	7
1.2.1 Les constituants cellulaires de l'immunité acquise.....	7
1.2.2 Le cours d'une réponse immunitaire.....	8
2. L'inflammation.....	10
2.1 Inflammation aiguë.....	10
2.1.1 Processus inflammatoire.....	10
2.1.2 Médiateurs de l'inflammation.....	11
2.2 Inflammation chronique.....	13
2.2.1 Mécanismes de régulation de l'inflammation.....	13
2.2.2 Le développement de l'inflammation chronique.....	14
2.3 Maladies inflammatoires chroniques.....	15
2.3.1 La Polyarthrite Rhumatoïde.....	15
2.3.2 Le Lupus.....	16
3. Les principales fonctions du neutrophile.....	18
3.1 L'apoptose.....	18
3.1.1 Voie extrinsèque.....	19
3.1.2 Voie intrinsèque.....	19
3.1.3 Voie du réticulum endoplasmique.....	20
3.2 La phagocytose.....	21
3.3 La migration.....	23
3.3.1 L'extravasation du neutrophile.....	24
3.4 La dégranulation.....	25

4. La protéine kinase Syk.....	28
4.1 Structure.....	28
4.2 Fonctions.....	28
4.3 Régulation négative de Syk.....	30
4.4 Le rôle de Syk chez les cellules non hématopoïétiques.....	31
5. Le trioxyde d'arsenic.....	32
5.1 Historique d'une panacée.....	32
5.2 Un agent chimiothérapeutique.....	33
5.3 Mécanismes d'actions	33
Deuxième partie.....	35
1.1 Résumé français de l'article.....	36
1.2 Article : <i>Syk is a novel target of arsenic trioxide (ATO) and is involved in ATO-induced human neutrophil function.</i>	36
Troisième partie.....	66
Discussion/Conclusion.....	67
Bibliographie.....	74

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor-1
ARN	Acide Ribonucléique
ATF6	Activating Transcription Factor-6
ATRA	All-Trans Retinoic Acid
CD	Cluster of Differentiation
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COX	Cyclooxygénase
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
ERAD	ER Associated Degradation
fMLP	formyl-Methionine-Leucine-Phenylalanine
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GTP	Guanosine Triphosphate
HSP	Heat Shock Protein
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IRE-1	Inositol Requiring protein-1
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motif
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
LES	Lupus Erythémateux Systémique
MAP	Mitogen Activated Protein kinase
MPTP	Mitochondrial membrane Permeability Transition Pore
NK	Natural Killer
NSAID	Non-Steroidale Anti-Inflammatoire Drug
PAF	Platelet Activating Factor
PERK	protein kinase RNA (PKR)-like ER Kinase
PLA ₂	Phospholipase A2
PMC	Progéniteur Myéloïde Commun
PMN	Polymorphonuclear Neutrophil
PTK	Protéine Tyrosine Kinase
PTP	Protéine Tyrosine Phosphatase
RE	Réticulum Endoplasmique
ROS	Reactive Oxygen Species
SH2	Src Homology 2
SRBC	Sheep Red Blood Cell
Syk	Spleen Tyrosine Kinase
TA	Trioxyde d'Arsenic
TCR	T cell Receptor
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
UPR	Unfolded Protein Response
UV	Ultra Violet

Liste des tableaux

Tableau I : Les médiateurs de l'inflammation.....	13
Tableau II : Les récepteurs de phagocytose dans l'immunité innée.....	24
Tableau III : Le contenu des granules des neutrophiles.....	27
Tableau IV : Les motifs ITAM dans les immunorécepteurs.....	31

Sommaire

Le trioxyde d'arsenic (TA) est un nouvel agent chimiothérapeutique. Il traite avec succès les leucémies promyélocytopiques aiguës. Plusieurs recherches ont mené à des découvertes sur les mécanismes d'actions de cet agent sur les cellules cancéreuses. Cependant, très peu de recherches ont été effectuées sur des cellules primaires et en santé comme les neutrophiles humains fraîchement isolés. Les neutrophiles sont de bons modèles pour vérifier l'impact clinique, inflammatoire et environnemental de l'arsenic. L'objectif de cette étude était de vérifier l'impact de cet agent sur la physiologie des neutrophiles, mais plus particulièrement au niveau de la protéine kinase Syk. Cette kinase est impliquée dans la plupart des fonctions des neutrophiles et représente une cible potentielle pour traiter des cas d'inflammations chroniques variés. Son inhibition pharmacologique par le piceatannol a permis de déterminer son implication dans l'activation des neutrophiles par le TA. Avec les neutrophiles de donneurs sains fraîchement isolés, il a été possible de vérifier le rôle de Syk dans plusieurs fonctions cellulaires comme la phagocytose, la dégranulation et l'apoptose. Cette approche expérimentale *in vitro* a été faite en comparaison avec des neutrophiles stimulés par l'interleukine-4. Les résultats ont montrés que Syk possède un rôle important dans l'activation des neutrophiles par le TA. Son inhibition renverse l'activation des neutrophiles par le TA au niveau de la phagocytose, de la dégranulation et de l'apoptose. En conclusion, une nouvelle kinase a fait son entrée dans le palmarès des mécanismes d'actions du TA. Cette découverte ouvre la voie à de nouvelles investigations en rapport avec cette kinase. Syk a un rôle dans les propriétés effectrices des neutrophiles, mais elle possède aussi un rôle de régulation car son inhibition influence l'apoptose. Induire l'apoptose des neutrophiles dans les cas d'inflammations chroniques est une approche clinique présentant un fort potentiel thérapeutique. Le TA possède cette capacité d'induire l'apoptose des neutrophiles et de biens d'autres cellules. À chaque fois qu'on ajoute une pièce dans le puzzle des mécanismes d'actions du TA on se rapproche du jour où on utilisera cet agent de façon courante et bénigne pour traiter une vaste gamme de complications cancéreuses ou inflammatoires. L'arsenic est un vieux remède qui commence à être compris.

Étudiant

Directeur de recherche

Introduction

Le trioxyde d'arsenic (TA) est une molécule qui présente un fort potentiel dans la résolution des maladies inflammatoires chroniques causées par les neutrophiles. Le TA induit l'activation des neutrophiles et ultimement leur apoptose. Induire l'apoptose des neutrophiles est une avenue non-négligeable dans la résolution de maladies inflammatoires chroniques causées par les neutrophiles. Durant l'activation des neutrophiles par le TA, des processus de signalisation cellulaire prennent place, notamment l'activation des «mitogen-activated protein» (MAP) kinases p38 et c-Jun N-terminal kinase (JNK). Cette signalisation active les neutrophiles et module leurs propriétés effectrices. La phagocytose, la dégranulation, la production de H₂O₂, l'adhésion, la migration, la synthèse de novo des protéines, l'induction de l'apoptose augmentent durant l'activation des neutrophiles par le TA. Quelques unes de ces fonctions sont régulées par une kinase en amont des MAP kinases, la protéine kinase cytoplasmique Syk (Spleen tyrosine kinase). La phagocytose, la dégranulation, la production de «reactive oxygen species» (ROS), l'adhésion et la migration sont des fonctions qui sont régulées par Syk. Il est devenu très intéressant de vérifier l'implication de cette kinase dans l'activation des neutrophiles par le TA depuis que ce dernier augmente les fonctions ci-haut mentionnées. Dans un premier temps, l'activation de Syk par le TA a été vérifiée. Dans un deuxième temps, la réversibilité de son activation a été vérifiée par l'ajout d'un inhibiteur spécifique de Syk, le piceatannol. Puisqu'il s'est avéré que son activation était réversible par le piceatannol, il est devenu logique de poursuivre les recherches sur les fonctions et de voir si les fonctions induites par le TA étaient réversibles elles aussi. Grâce à l'inhibition pharmacologique de Syk il a été possible de déterminer son rôle dans les différentes fonctions induites par le TA chez les neutrophiles. Ces travaux sont les premiers qui démontrent que Syk est une cible du TA, malgré les nombreuses recherches effectuées autant sur Syk que sur le TA. Syk est une kinase nécessaire au développement de l'organisme qui transmet les signaux de récepteurs des cellules immunitaires, les immunorécepteurs. Son expression est pourtant très répandue dans une variété de cellules, hématopoïétiques ou non. Elle est aussi une cible thérapeutique potentielle pour les cas d'inflammations chroniques, notamment l'inflammation pulmonaire. L'arsenic est aussi un contaminant naturel de l'environnement et le fait d'élucider ses mécanismes d'actions favorise une meilleure compréhension de la santé humaine et environnementale.

Première partie
Revue de la littérature

1. Le système immunitaire

1.1 Le système immunitaire inné

1.1.1 Les barrières physiologiques

Le corps humain possède des barrières physiques et physiologiques qui empêchent l'entrée des pathogènes dans l'organisme (Goldsby, 2000). Ces barrières anatomiques et homéostatiques représentent une première ligne de défense face aux pathogènes. Parmi celles-ci on retrouve la peau. La peau est constituée de cellules et de tissu conjonctif contenant des vaisseaux sanguins, des glandes sébacées et sudoripares. Les glandes sébacées sécrètent un liquide huileux appelé le sébum. Le sébum est composé d'acides gras permettant de maintenir un pH entre 3 et 5 sur la surface de la peau. Ce pH acide inhibe la croissance de la plupart des micro-organismes (Goldsby, 2000). Malgré cela, quelques bactéries métabolisent le sébum et vivent de façon commensale sur la peau. La peau empêche donc jusqu'à un certain point la pénétration et la croissance des micro-organismes, puisqu'il peut arriver qu'une lésion, une coupure ou une abrasion, devienne une porte d'entrée aux infections. Aussi, les morsures d'insectes ou d'animaux sont d'excellents vecteurs de micro-organismes. Ces derniers facteurs aident la pénétration de l'agent infectieux à travers la première barrière physiologique, qu'est la peau, jusqu'à l'intérieur de l'hôte (Murphy, 2008).

Notre peau est le premier bouclier contre les agents infectieux. Malgré tout, certains pathogènes peuvent pénétrer l'organisme par les tractus gastro-intestinal, respiratoire et urogénital. Ces portes d'entrées sont tapissées d'une membrane de cellules épithéliales qui recouvre les parois de ces différents tunnels (Goldsby, 2000). Même si la plupart des micro-organismes tendent à s'y adhérer et à y pénétrer, il existe plusieurs mécanismes de défense aspécifiques contrant ces invasions. Par exemple, la salive, les larmes, et les sécrétions mucoales agissent comme nettoyeurs de surface. Elles contiennent aussi des substances antimicrobiennes. Le liquide visqueux sécrété par les cellules épithéliales des membranes muqueuses sert à enrober les micro-organismes étrangers et à les excréter (Goldsby, 2000). De plus, il existe beaucoup de micro-organismes inoffensifs qui colonisent et adhèrent de façon naturelle la surface de ces tissus empêchant ainsi l'adhésion et l'invasion d'autres micro-organismes pathogènes. Quelques micro-organismes ont évolué de façon à contourner ces mécanismes de défense augmentant ainsi leur potentiel infectieux. Par exemple, certains

virus sont capables de s'attacher fermement à la surface de l'épithélium, les empêchant ainsi de se faire excréter (Goldsby, 2000). Les bactéries possèdent des molécules de surface appelées fimbriae ou pili. Ce sont des glycoprotéines leur permettant de s'attacher fermement sur un épithélium. La spécificité des protéines d'adhésions ainsi que les différents phénotypes des épithéliums rend les tissus plus ou moins susceptibles aux différents microbes (Murphy, 2008).

En plus des barrières physiques (ou épithéliales), certaines barrières physiologiques contribuent à une immunité innée efficace. La température, le pH et les protéines solubles contribuent à un environnement pouvant inhiber la croissance de micro-organismes particuliers (Goldsby, 2000). À cause de cette différence de paramètres physiologiques, certaines espèces animales sont plus susceptibles que d'autres à différents agents infectieux. Le même phénomène peut s'appliquer de façon intra espèce. Finalement, tout l'ensemble des nombreux facteurs qu'ils soient solubles, enzymes, cytokines ou médiateurs chimiotactiques constitue la dernière barrière physiologique de l'immunité innée d'un individu face à une infection par un micro-organisme étranger (Goldsby, 2000). Plusieurs dérèglements peuvent survenir à différents niveaux des barrières physiologiques mentionnées précédemment. Ils peuvent être directement ou indirectement liés à la cause d'une déficience immunitaire ou d'une infection menant à des complications pouvant aboutir à une maladie (Murphy, 2008). Quelques-uns de ces éléments seront élaborés plus en détails dans les chapitres suivants, notamment dans le chapitre sur l'inflammation.

Une barrière immunitaire innée est habituellement accompagnée d'une réponse inflammatoire. La réponse inflammatoire est instaurée par le système immunitaire inné de concert avec les tissus touchés par une infection ou une lésion. Elle consiste, dans un premier temps, à limiter la propagation des pathogènes dans l'organisme et à attirer le plus rapidement possible les acteurs principaux de l'immunité innée et éventuellement adaptative ou de mémoire (Goldsby, 2000). Les quatre symptômes majeurs d'une réponse inflammatoire sont les suivants : i) chaleur, provenant de l'apport sanguin augmenté sur le site d'inflammation, ii) rougeur, dû à la vasodilatation des vaisseaux sanguins ; iii) oedème, causé par l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins ; iv) douleur, suite à la stimulation des cellules nerveuses par les médiateurs sécrétés (Rather, 1971). Cette situation est bénéfique pour l'hôte à court terme. Elle peut néanmoins générer des complications à long terme si elle n'est pas bien régulée, puisqu'il y a aussi cinquième symptôme ; v) la perte de fonction du

tissu (Girard, 2008). Ce processus est surtout le résultat du changement de phénotype de l'endothélium vasculaire en réponse aux médiateurs sécrétés par les cellules de l'immunité innée résidentes dans les tissus. Suite à l'instauration d'un milieu pro-inflammatoire, l'endothélium vasculaire subit des changements qui favorisent l'adhésion des cellules immunitaires circulantes (DeFranco, 2007). Les cellules adhérentes poursuivront leur migration vers le site d'inflammation. La réponse inflammatoire fait parti des barrières physiologiques car elle est déclenchée par les constituants cellulaires de l'immunité innée sans discrimination à l'égard du pathogène ou d'une blessure (Goldsby, 2000).

1.1.2 L'origine du système immunitaire inné

L'immunité innée est constituée d'une diversité de cellules tirant leur origine de la moelle osseuse. Toutes les cellules immunitaires proviennent de la maturation des cellules souches hématopoïétiques. Certaines cellules subissent leur maturation complète dans la moelle osseuse alors que d'autres vont subir une différenciation supplémentaire une fois dans la circulation (DeFranco, 2007). Par exemple, les lymphocytes ne deviennent pleinement activés qu'après avoir rencontré un antigène. Après maturation, les cellules immunitaires deviennent effectrices et sont capables d'activer et/ou de détruire d'autres cellules. Les cellules souches pluripotentes hématopoïétiques peuvent évoluer en deux branches principales appelées lignée myéloïde et lignée lymphoïde (DeFranco, 2007). Presque toutes les cellules de l'immunité innée sont issues de la lignée myéloïde, à l'exception des cellules tueuses naturelles (cellules NK) (Goldsby, 2000). Les cellules souches pluripotentes à partir desquelles sont formées les cellules de l'immunité innée sont appelées «progéniteur myéloïde commun» (PMC) (DeFranco, 2007). La différenciation des PMC est dirigée par une grande classe de cytokines appelées hématopoïétines. Selon la nature des hématopoïétines sécrétées dans la moelle osseuse, un PMC peut se transformer en cellule dendritique, en macrophage, ou en granulocyte (Kondo, 2003).

1.1.3 Les constituants cellulaires de l'immunité innée

Les macrophages sont résidents dans la plupart des tissus. Ils sont la forme mature des monocytes circulant du sang vers les tissus où ils se différencient en macrophages. Ensemble, les monocytes et les macrophages constituent un premier groupe de cellules phagocytaires. Les autres phagocytes sont des granulocytes (neutrophiles) et les cellules dendritiques. Les

macrophages ont une durée de vie assez longue et exercent plusieurs fonctions importantes autant au niveau de l'immunité innée qu'adaptative. La première, une fonction innée, est d'englober et de tuer les micro-organismes envahissants. Ils sont capables d'ingérer toutes sortes de micro-organismes (virus, bactéries, algues, moisissures et protozoaires) et de particules par phagocytose. Ils sont aussi capables d'ingérer des cellules, notamment des neutrophiles, en apoptose (Lawrence, 2009). Ils jouent un rôle dans la reconstruction et le remodelage du tissu (Varin, 2009), autant en condition normale qu'en cas de blessure. Un sous-type de macrophage, appelé les microglies, se retrouve dans le cerveau et possèdent de longs pseudopodes. Ils s'accumulent aux sites de lésions neuronales où on croit qu'ils participent, comme les autres macrophages, au remodelage du tissu. Dans le poumon, les macrophages jouent un rôle très important. Les macrophages alvéolaires sont constamment exposés à des particules infectieuses et non-infectieuses. Leur fonction principale est de disposer des particules non-infectieuses et de contrôler l'inflammation pour qu'elle ne progresse qu'en cas d'infection (Lucatelli, 2003). Le foie abrite une autre classe de macrophage que l'on appelle les cellules de Kupffer. Leur but premier est de se charger de façon routinière des érythrocytes morts ou endommagés et d'éliminer les micro-organismes présents dans la circulation sanguine (DeFranco, 2007). Dans la rate il y a trois types de macrophages. Les deux premiers sont responsables de la disponibilité du fer en récupérant l'hémoglobine des érythrocytes morts ou endommagés. Le troisième type de macrophage se situe dans les zones marginales. Stratégiquement placé près des sinus, ce dernier type est en contact avec le flot sanguin. Ensemble, ces derniers types de macrophages dans la rate ainsi que les cellules de Kupffer préviennent contre la venue des infections sanguines (DeFranco, 2007). Les macrophages sont aussi impliqués dans une réponse adaptative. Ils sont capables d'orchestrer une réponse immunitaire en présentant des antigènes aux cellules T naïves. Par contre, pour remplir cette fonction ils doivent être activés (DeFranco, 2007). Ce qui fait d'eux de moins bonnes cellules présentatrice d'antigènes que les cellules dendritiques. De plus, la plupart des antigènes ingérés par les macrophages sont dégradés puis éliminés. Dans un autre ordre d'idée, les macrophages ont un rôle dans l'inflammation puisqu'ils sécrètent des cytokines comme l'interleukine-1 (IL-1), le TNF- α (Tumor necrosis factor) et l'interleukine-6 (IL-6). Les macrophages produisent également des protéines du complément étant un groupe de protéines assistant dans l'élimination d'un pathogène et favorisant l'inflammation. Finalement, les macrophages peuvent aussi stimuler l'hématopoïèse en sécrétant des facteurs de croissance comme le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) (DeFranco, 2007).

«Les granulocytes» est un groupe de leucocytes comprenant quatre types de cellules : les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles et les mastocytes. Les quatre contiennent des granules dans leur cytoplasme. Les trois premiers sont aussi appelés : les leucocytes polymorphonucléaires. Les trois types de polymorphonucléaires sont différenciables par la coloration de leurs granules. Des trois, le «polymorphonucléaire neutrophile» (PMN) est le plus important, il est aussi le plus abondant. Les neutrophiles représentent plus de la moitié de tous les leucocytes présent chez un individu (DeFranco, 2007). Ils se chargent d'une grande variété de micro-organismes, majoritairement les bactéries et les champignons, par phagocytose et les détruisent grâce à leurs vésicules intracellulaires contenant des substances antimicrobiennes et des enzymes. Les neutrophiles ont une durée de vie très courte d'environ deux à trois jours. Ils entrent en apoptose lorsqu'ils ne sont pas stimulés, on appelle ce processus l'apoptose spontanée du neutrophile (Kobayashi, 2005). Les neutrophiles sont des cellules circulantes. Ils sont parmi les premiers types de cellule à être attirés vers un site d'infection ou de blessure d'un tissu. Ils sont capables de quitter la circulation sanguine par un processus appelé extravasation (Goldsby, 2000). Ils peuvent aussi amplifier ce processus en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires attirant un plus grand nombre de cellules et augmentant leur durée de vie. À cause de leur grand nombre et de leurs fonctions les neutrophiles sont importants dans la réponse inflammatoire. Leurs fonctions seront discutées plus en détails dans le chapitre 3. Les basophiles, les éosinophiles et les mastocytes jouent un rôle spécial dans la protection des surfaces épithéliales, notamment les muqueuses des voies digestive, respiratoire et uro-génitale. Les mastocytes jouent un rôle sentinelle dans les tissus, alors que les basophiles et les éosinophiles sont des cellules circulantes recrutées sur un site en cas de besoin (Goldsby, 2000). Contrairement aux neutrophiles, qui tuent leurs cibles par phagocytose, ces granulocytes interviennent plutôt chez les micro-organismes qui ne peuvent pas se faire phagocyter à cause de leur trop grande taille. Ils libèrent alors le contenu de leur granule dans le milieu, favorisant ainsi la destruction du parasite et l'instauration d'un milieu pro-inflammatoire. Ces derniers contiennent dans leurs granules des substances actives, comme l'histamine, jouant un rôle majeur dans certains cas d'allergies (DeFranco, 2007).

Les cellules dendritiques font parties du troisième groupe de phagocytes. La plupart des cellules dendritiques sont résidentes dans les tissus. Elles peuvent phagocyter par un processus appelé macropinocytose, mais leur fonction principale n'est pas la clairance de l'infection. Leur but premier est de présenter des antigènes aux cellules T naïves et de les

activer (DeFranco, 2007). De ce fait, on les appelle aussi les cellules présentatrices d'antigène (CPA). En absence d'infection ces cellules se retrouvent dans les tissus. Elles vont porter plusieurs noms selon le tissu qu'elles occupent. Par exemple, les cellules de Langerhans ont été trouvées pour la première fois dans l'épiderme, et peuvent occuper l'endroit pour plusieurs mois (Goldsby, 2000). Une seconde population de cellules dendritiques que l'on retrouve dans le derme s'appelle les cellules dendritiques interstitielles. Dans les muqueuses du tube digestif, les cellules dendritiques sont concentrées à des sites spécifiques de collecte d'antigènes interconnectés aux tissus lymphatiques (DeFranco, 2007). Ceci permet aux cellules d'être en contact continu avec les bactéries commensales de l'hôte ainsi qu'aux antigènes ingérés. Elles auraient un rôle pour prévenir les réponses inflammatoires contre les millions de bactéries inoffensives présentes dans l'intestin (DeFranco, 2007). Une troisième population de cellules dendritiques se retrouve dans les organes lymphoïdes secondaires et se nomme les cellules dendritiques interdigitales. Une dernière population est circulante dans le sang et représente 0,1% de la population totale de cellules dendritiques (DeFranco, 2007). Chaque population de cellules dendritiques est différente et présente ses caractéristiques propres, mais elles ont toutes un point en commun qui est de présenter des antigènes aux cellules T naïves et de stimuler leur différenciation pour l'instauration d'une réponse immunitaire adaptative. Elles font le relais entre l'immunité innée et acquise (Shortman, 2002).

1.2 Le système immunitaire acquis

1.2.1 Les constituants cellulaires de l'immunité acquise

Les lymphocytes sont les principaux acteurs de l'immunité acquise. Il existe deux types majeurs de lymphocytes. Les lymphocytes B deviennent matures dans la moelle osseuse et leur principale fonction est de sécréter des anticorps. Les lymphocytes T deviennent matures dans le thymus et possèdent deux fonctions principales. La première est de tuer les cellules infectées par des virus ou des bactéries spécialisées, et est exercée par les lymphocytes T cytotoxiques. La deuxième est d'activer les autres cellules immunitaires. Cette dernière fonction est assurée par les lymphocytes T auxiliaires (DeFranco, 2007). Les lymphocytes sont capables de reconnaître les antigènes grâce à leur récepteur généré par un mécanisme unique de recombinaison génétique (Johnson, 2009). Chaque lymphocyte possède un récepteur unique reconnaissant spécifiquement un seul antigène. Cependant, la population

totale de lymphocytes chez un individu est capable de reconnaître virtuellement n'importe quel antigène. Les lymphocytes matures qui n'ont pas été en contact avec un antigène sont appelés les lymphocytes naïfs. La différenciation des cellules naïves en cellules effectrices est stimulée par la rencontre d'un antigène et est précédée par une robuste prolifération augmentant sélectivement le nombre de lymphocytes possédant le récepteur capable de reconnaître spécifiquement l'antigène (DeFranco, 2007). Cette «sélection clonale» s'effectue dans le thymus. Une cellule B naïve, dont le récepteur membranaire est une immunoglobuline, se différencie en plasmocyte après activation par un antigène. Le plasmocyte sécrètera ensuite des anticorps de même spécificité que son récepteur de cellule B naïve (Goldsby, 2000). Une dernière cellule de la lignée lymphoïde est appelée cellule «tueuse naturelle» (NK). Cette dernière ne possède pas de récepteur spécifique aux antigènes et est souvent comptée parmi les cellules de l'immunité innée. Les cellules NK sont capables de reconnaître les cellules infectées par des virus par un mécanisme d'inhibition par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) présent sur chaque cellule normale (DeFranco, 2007).

1.2.2 Le cours d'une réponse immunitaire

L'immunité innée, ainsi que certaines classes spécialisées de lymphocytes, forment la première ligne de défense contre les micro-organismes envahissants. Nous cohabitons de façon naturelle avec une multitude de micro-organismes pour la plupart inoffensifs. Généralement, ces micro-organismes ne traversent pas les barrières physiologiques de l'hôte et peuvent même procurer une défense additionnelle contre les autres micro-organismes pathogènes (Goldsby, 2000). Cependant, il arrive parfois que les micro-organismes traversent les barrières épithéliales et envahissent les tissus. Certains sont directement nocifs pour l'hôte, soit qu'ils produisent des toxines ou bien qu'ils tuent les cellules qui les abritent (DeFranco, 2007). D'autres vont agir indirectement par le biais de la réponse immunitaire qui serait, dans ce cas-ci, dommageable pour l'hôte (Rittirsch, 2008). Les micro-organismes peuvent entrer de façon accidentelle par des blessures ou des lésions tissulaires, mais certains pathogènes sont spécialement équipés pour entrer dans les tissus qu'ils envahissent. Dès leur entrée, les micro-organismes sont pris en charge par les phagocytes et les leucocytes résidents. Pendant ce temps, les cellules dendritiques migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour présenter des antigènes aux lymphocytes. L'activation des lymphocytes T naïfs induit leur prolifération et leur différenciation en cellules T effectrices (DeFranco, 2007). Un changement

à leur surface se produit. Par exemple, les récepteurs de chimiokines dirigeant leur migration dans les organes lymphoïdes secondaires sont diminués alors que ceux relatifs à l'infection sont augmentés (Goldsby, 2000). De plus, des récepteurs favorisant les interactions avec les autres leucocytes s'expriment. Par exemple, les lymphocytes CD8 cytotoxiques sont capables de reconnaître les cellules infectées par un virus à cause des fragments de protéines (antigènes) exposés à leur surface (Holz, 2009). Les lymphocytes T auxiliaires sont capables de reconnaître des antigènes présentés à la surface des macrophages et de stimuler la sécrétion de cytokines favorisant le potentiel microbicide de ces derniers (DeFranco, 2007). D'autres lymphocytes T auxiliaires, après contact avec les immunoglobulines à la surface des lymphocytes B, peuvent stimuler la différenciation et la prolifération de ces derniers en plasmocytes sécréteurs d'anticorps. En plus des interactions et des effets directs que les lymphocytes T ont avec leurs «congénères», ils aident aussi au recrutement d'effecteurs de l'immunité innée spécifiquement aux types de micro-organismes qu'ils reconnaissent. Les lymphocytes B sont en circulation jusqu'à ce que leur récepteur reconnaisse un antigène. Ils se dirigent ensuite vers les organes secondaires où ils se font activer par les lymphocytes T. Leur activation, comme mentionner précédemment, induit leur différenciation et leur prolifération en plasmocytes (McHeyser-Williams, 2009). D'autres plasmocytes vont migrer vers des follicules où ils vont former des centres germinaux. Dans ces centres germinaux les plasmocytes prolifèrent et réarrangent les gènes d'immunoglobulines de façon à augmenter l'affinité des anticorps pour les antigènes en modifiant la partie variable des anticorps. On appelle ce processus la maturation d'affinité (DeFranco, 2007). Une autre sorte de changement au niveau des anticorps peut survenir suite à la stimulation des plasmocytes par les lymphocytes T. Ce changement vise plutôt la partie constante des anticorps et détermine leur isotype (Weber, 2009). Ils sont effectués pour adapter les propriétés effectrices des anticorps à différents sites et natures d'infections. Les réponses immunitaires sont destructrices et auto-amplifiantes (Rittirsch, 2008). Certaines maladies sont causées, non pas par le micro-organisme, mais par la réponse immunitaire qui l'accompagne. C'est pourquoi la réponse immunitaire a évolué pour s'auto-limiter et assurer que les mécanismes de destruction cessent après un certains temps (Rittirsch, 2008). Dans la plupart des cas, un lymphocyte B activé meurt dans les jours suivants par un programme de mort contrôlée nommée apoptose. Même si quelques plasmocytes migrent vers la moelle osseuse et persistent pendant plusieurs années, la plupart des plasmocytes meurent par apoptose dans les quelques jours suivants leur activation. Les plasmocytes qui survivent deviennent des cellules mémoires prêtes à effectuer leurs propriétés effectrices immédiatement après un second contact avec l'antigène

(DeFranco, 2007). La réponse mémoire est plus efficace que la réponse immunitaire primaire étant donné que les anticorps ont déjà subi leurs modifications génétiques (Weber, 2009). Un deuxième contact avec un pathogène ne conduit généralement pas au développement de la maladie. C'est pourquoi aujourd'hui le développement de vaccins assurant de façon sécuritaire et efficace une réponse immunitaire de mémoire est un des buts les plus importants des recherches en immunologie (DeFranco, 2007).

2. L'inflammation

2.1 Inflammation aigue

2.1.1 Le processus inflammatoire

Lorsqu'un micro-organisme pénètre dans un tissu il est reconnu par les cellules immunitaires résidentes, c'est-à-dire les macrophages les mastocytes et les cellules dendritiques. Les récepteurs présents sur la surface de ces cellules reconnaissent des motifs particuliers présents sur la paroi des bactéries. La stimulation de ces récepteurs induit la production de médiateurs lipidiques, de cytokines et de chimiokines provoquant une réponse coordonnée des cellules immunitaires et des vaisseaux sanguins pour favoriser l'arrivée locale de cellules immunitaires au site de l'infection (DeFranco, 2007). Cette réaction coordonnée des leucocytes et des vaisseaux sanguins s'appelle l'inflammation. Les médiateurs inflammatoires ont quatre objectifs principaux : i) ils augmentent la perméabilité vasculaire permettant la sortie du sang de cellules immunitaires et de facteurs solubles, ii) ils changent les propriétés adhésives de l'endothélium vasculaire pour attirer un plus grand nombre de phagocytes sur le site d'infection, iii) ils activent les phagocytes pour augmenter leur potentiel microbicide, iv) ils activent les cellules NK augmentant leur pouvoir cytolytique et favorisant la production de cytokines supplémentaires, v) et finalement, si l'inflammation est soutenue elle peut mener à la perte de fonction du tissu (Goldsby, 2000). L'activation de l'endothélium vasculaire déclenche deux cascades protéolytique : celle des kinines et celle de la coagulation sanguine. La cascade des kinines, via la production de bradykinine, augmente la perméabilité vasculaire et la cascade de la coagulation induit la formation d'un caillot sanguin qui limite la progression des micro-organismes ailleurs qu'au site de l'infection (DeFranco, 2007).

L'arrivée des composants du complément au site d'infection contribue davantage à l'inflammation suite à l'activation du complément et la formation du fragment C5a. Ce dernier fragment possède des effets pro-inflammatoires sur l'endothélium vasculaire et active les phagocytes et les mastocytes (Peng, 2009). Ce processus est un incontournable de la réponse innée et est essentiel à la résolution de l'infection. Quoique bénéfique pour l'hôte à court terme, l'inflammation est aussi dommageable, douloureuse et peut mener à des situations pathologiques si elle n'est pas bien régulée. Le contrôle pharmacologique de l'inflammation est donc une avenue importante de la recherche en santé (Murphy, 2008).

2.1.2 Les médiateurs de l'inflammation

Les cytokines et les médiateurs lipidiques sont d'importants inducteurs de l'inflammation. Le TNF et l'interleukine-1 (IL-1) sont les principales cytokines alors que les prostaglandines, les leucotriènes et le facteur d'activation des plaquettes (PAF) sont les plus importants médiateurs lipidiques (DeFranco, 2007). Les prostaglandines et les leucotriènes sont produits à partir de l'acide arachidonique (Kuehl, 1980). L'acide arachidonique est un produit d'hydrolyse des phospholipides membranaires par la phospholipase A₂ (PLA₂). L'acide arachidonique est converti soit en prostaglandines par les cyclo-oxygénases (COX-1 et COX-2) (Santovito, 2009) ou en leucotriènes par la 5-lipoxygénase. Les cyclo-oxygénases produisent la prostaglandine H₂ qui est ensuite convertie en plusieurs autres prostaglandines par des enzymes différenciellement exprimées dans les cellules. Chaque prostaglandine possède un récepteur par lequel elle exerce son action sur les cellules cibles. Alors que les prostaglandines ont des actions rapides, les leucotriènes sont de plus lents médiateurs et seraient impliqués en inflammation chronique, notamment dans les cas d'asthme (DeFranco, 2007). Les principaux médiateurs de l'inflammation et leurs actions sont résumés dans le tableau I.

Tableau I : Les médiateurs de l'inflammation

Médiateurs	Sources	Fonctions
Cytokines pro-inflammatoires		
TNF	MΦ, mast	Augmentation de : perméabilité vasculaire, adhésivité de l'endothélium, activation des leucocytes, cytotoxicité des cellules NK.
IL-1	MΦ, mast, KC, CE	Augmentation de : adhésivité de l'endothélium, production de chimiokines.
IL-6	MΦ, mast, FB	Recrutement de MC et effets systémiques
IL-12	MΦ	Production d'IFN-γ et augmentation de la cytotoxicité des cellules NK.
IFN-γ	NK	Augmente phagocytose et cytotoxicité des phagocytes
chimiokines	MΦ, mast, CE	Attraction de PMN, monocytes et cellule T effectrices
Médiateurs lipidiques		
PGI ₂	MΦ	Augmente la perméabilité vasculaire
PGE ₂	MΦ, mast	Augmente la dilatation vasculaire et inhibe la production de médiateurs lipidiques
Leucotriènes	MΦ, mast	Augmente la contraction musculaire lisse et la perméabilité vasculaire
PAF	MΦ, mast	Agrégation des plaquettes, adhésivité de l'endothélium
Dérivés du complément		
C3a	Activation du complément	Augmentation de la perméabilité et de la dilatation vasculaire
C5a	Activation du complément	Augmentation de la perméabilité et de la dilatation vasculaire, chemoattractant

* Inspiré de DeFranco, 2007

Légende : MΦ: macrophages ; mast: mastocytes ; MC: monocytes ; PMN: neutrophiles ; KC: kératinocytes ; CE: cellules endothéliales ; FB: fibroblastes ; NK : cellules tueuses naturelles.

Les chimiokines et les peptides chemoattractants dirigent la migration des leucocytes vers le site d'infection. Au début de la réponse inflammatoire, les chimiokines présentes sur l'endothélium vasculaire jouent un rôle critique pour diriger les leucocytes hors de la circulation vers le site de l'infection (Murphy, 2008). Le type de leucocyte attiré vers le site de l'infection dépend largement du type de chimiokine présente sur la surface de l'endothélium. Ensuite, les gradients de chimiokines dirigent la migration des leucocytes dans les tissus vers les plus fortes concentrations près du site de l'infection (Goldsby, 2000). L'infiltrat primaire de cellules immunitaires est généralement constitué de neutrophiles attirés principalement par l'interleukine-8 (IL-8), TNF et IL-1. Les neutrophiles migrent ensuite vers les gradients d'autres chemoattractants localisés au site d'infection. Ceux-ci incluent : le fragment C5a, généré par la cascade du complément ; les peptides antimicrobiens synthétisés par le neutrophile au contact de la bactérie ; et le tripeptide f-Met-Leu-Phe (fMLP), un

constituant conservé des bactéries (DeFranco, 2007). La migration des leucocytes est régulée par les intégrines ($\beta 2$ intégrine pour le neutrophile) permettant l'adhésion sur l'endothélium et la matrice extracellulaire (Ley, 2002).

2.2 Inflammation chronique

2.2.1 Mécanismes de régulation de l'inflammation

L'inflammation est normalement régulée à la baisse par une série de boucles rétro inhibitrices (DeFranco, 2007). Les réactions inflammatoires induites par le TNF et IL-1 génèrent une première réaction positive favorisant la production de TNF et d'IL-1 par les macrophages et cellules avoisinantes (Cerami, 1992). Cette boucle positive est un mécanisme de propagation de la réponse qui s'effectue jusqu'à l'obtention d'un nombre suffisant de leucocytes pour contrôler l'infection. Toutefois, cette réaction inflammatoire peut créer des dommages aux tissus environnants, et donc les mécanismes présents pour réguler à la baisse l'inflammation sont d'importance capitale pour la santé d'un individu (Rittirsch, 2008). Les processus d'inhibitions agissent autant au niveau local que systémique. Par exemple, le TNF induit la «desquamation» du récepteur de la surface des cellules ce qui a pour effet de réduire la sensibilité des cellules et de neutraliser le TNF qui n'atteint désormais plus ses cibles (DeFranco, 2007). Aussi, les macrophages synthétisent un antagoniste du récepteur de IL-1 (IL-1ra) qui compétitionne pour le récepteur de IL-1 mais qui n'envoie pas de signal dans les cellules. De plus, le niveau systémique de cytokines inflammatoires déclenche une réaction rétro inhibitrice de l'hypothalamus visant à stimuler la médullosurrénale pour qu'elle produise des glucocorticoïdes réduisant l'inflammation par plusieurs mécanismes dont l'inhibition de la production de cytokines. Les glucocorticoïdes synthétiques sont dès lors utilisés comme anti-inflammatoires mais leur usage est limité à cause des nombreux effets secondaires (DeFranco, 2007). Un autre mécanisme anti-inflammatoire est la production de cytokines anti-inflammatoires. Les plus importantes cytokines anti-inflammatoires sont IL-10 et TGF- β . Les souris déficientes en IL-10 souffrent d'inflammation excessive du tube digestif (Siegmond, 2004) alors que les déficientes en TGF- β développent des maladies inflammatoires sur plusieurs tissus (Javelaud, 2004). IL-10 et TGF- β sont toutes deux produites par les macrophages (mais seulement après la synthèse de TNF et d'IL-1) et induisent la reconstruction du tissu et l'arrêt des fonctions cytotoxiques des macrophages

(Goldsby, 2000). L'inflammation est aussi régulée par le système nerveux. Les neurones sensibles à la douleur fabriquent des neuropeptides, comme la substance P, induisant la production de médiateurs inflammatoires par les mastocytes. Inversement, l'acétylcholine produite par les neurones du nerf vague agissent via les récepteurs d'acétylcholine nicotinique sur les macrophages (mais non sur les monocytes) pour inhiber leur production de TNF et de IL-1 (DeFranco, 2007).

2.2.2 Le développement de l'inflammation chronique

L'inflammation chronique est souvent causée par la persistance d'un antigène. Certains micro-organismes ont des composants dans leur paroi qui leur permet de résister à la phagocytose. Ces derniers induisent souvent une inflammation chronique qui se termine avec des dommages tissulaires importants (DeFranco, 2007). D'autres types d'inflammations chroniques sont causés par des maladies auto-immunes qui se caractérisent par la présence d'auto-anticorps activant continuellement les lymphocytes T (Murphy, 2008). Aussi, la présence d'une tumeur cancéreuse peut provoquer des dommages tissulaires importants causés par l'inflammation chronique qu'elle induit (Goldsby, 2000). L'activation et l'accumulation des macrophages dans un tissu est un incontournable de l'inflammation chronique. Les cytokines produites par les macrophages activés stimulent la prolifération des fibroblastes et la production de collagène. Ce processus génère la formation d'un tissu «cicatrice» nommé fibrose. Même si la fibrose est un processus de reconstruction du tissu, elle peut compromettre la fonction de ce dernier. Aussi, l'inflammation chronique génère souvent la formation d'une masse «tumeur» appelée granulome (Goldsby, 2000). Cette masse cellulaire est constituée de macrophages activés entourés de lymphocytes. Deux cytokines, IFN- γ et TNF- α , jouent un rôle central dans le développement de l'inflammation chronique. Les lymphocytes T_H1, les cellules NK et les cellules T cytotoxiques produisent de l'IFN- γ alors que les macrophages activés produisent du TNF- α (DeFranco, 2007). Les macrophages activés par ces cytokines produisent des enzymes protéolytiques et des produits réactifs de l'oxygène et de l'azote responsables des dommages aux tissus environnants. Finalement, le TNF- α et l'IFN- γ agissent en synergie pour augmenter l'expression de molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM-1, selectine-E) et du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). L'augmentation de ces dernières protéines d'interaction cellule-cellule favorise l'arrivée de cellules sur le site d'inflammation (Goldsby, 2000).

2.3 Maladies inflammatoires chroniques

Les maladies inflammatoires chroniques commencent de plus en plus à être caractérisées. On comprend de plus en plus les mécanismes derrière ces complications du système immunitaire. Les neutrophiles sont parfois impliqués dans les maladies inflammatoires chroniques. Il existe plusieurs maladies auto-immunes impliquant les neutrophiles, mais l'idée n'est pas de les nommer de façon exhaustive. Ici, est présenté un aperçu des mécanismes qui prennent place lors de deux maladies auto-immunes très connues : la polyarthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux. Dans ces deux maladies les neutrophiles présentent un fort potentiel comme cible en thérapie. Dans les deux cas, la neutralisation des neutrophiles pourrait aider au maintien de l'homéostasie normale favorisant la diminution des symptômes pathologiques.

2.3.1 Polyarthrite rhumatoïde

Affectant entre 0,3 et 1,5% de la population des pays développés, la polyarthrite rhumatoïde est la maladie auto-immune la plus répandue. L'incidence de cette maladie augmente avec l'âge et le sexe, touchant plus fréquemment les femmes que les hommes (3:1) (DeFranco, 2007). La polyarthrite rhumatoïde est une inflammation des articulations caractérisée par des jointures enflées, douloureuses et rigides. Dans cette maladie, la réponse auto-immune serait dirigée par des lymphocytes T CD4 vers des autoantigènes se trouvant dans le synovium (Sakaguchi, 2003). Il y a une accumulation de fluide inflammatoire dans le synovium. Ce fluide contient beaucoup de neutrophiles accompagnés par une infiltration de lymphocyte T CD4, de macrophages et de lymphocytes B. Les cytokines des macrophages, TNF, IL-1 et IL-6, y sont particulièrement abondantes, et sont souvent accompagnés par une cytokine des cellules Th17, IL-17A. Les effets inflammatoires de ces cytokines semblent importants pour maintenir la réponse auto-immune dans le synovium (Firestein, 2004). Dans ce dernier, on voit l'apparition de follicules formés par des lymphocytes T et des macrophages ainsi que des centres germinaux où des lymphocytes B se différencient sous l'action des lymphocytes T. L'apparition de ces organes lymphoïdes tertiaires reflète la présence d'inflammation chronique présumé être dirigée contre des autoantigènes présents dans le synovium, mais ces autoantigènes ne sont pas encore bien définis (DeFranco, 2007). La présence chronique d'une réponse immune et d'une inflammation dans le synovium mène à l'érosion du cartilage et éventuellement des ligaments. Les causes de cette maladie ne sont pas encore tout à fait élucidées et, dès lors, plusieurs modèles sont proposés. Dans un premier modèle, on injecte du

collagène de type II et on induit une arthrite. Cette arthrite est dépendante de la production d'IL-17A par les cellules Th17, et ne semble pas impliquer des anticorps (Choi, 2010). Un deuxième modèle basé sur la surexpression de TNF induit l'arthrite, mais elle est accompagnée par la maladie inflammatoire de Bowel (Shih, 2009). Ceci indique l'importance du processus inflammatoire dans le développement de la maladie. Un autre processus implique un TCR transgénique reconnaissant un peptide de la glucose-6-phosphate isomérase lié au CMH de classe II. Ce modèle induit une sévère arthrite provoquée par les anticorps (Monach, 2008). Un dernier modèle implique une mutation ponctuelle dans la tyrosine kinase ZAP-70. Étant une kinase clé dans la transmission du signal par le TCR, ce modèle propose une déficience dans la sélection négative des lymphocytes T dans le thymus (Hsu, 2009), illustrant le rôle important de la sélection négative dans l'autoimmunité en général. Les thérapies ont focussé sur l'utilisation de drogues anti-inflammatoires et immunosuppressives. Dans les récentes années, les agents bloquant du TNF et d'IL-1 ont été approuvés. Parfois très efficaces, ces agents ne semblent malheureusement pas fonctionner chez tous les patients (DeFranco, 2007). Une autre approche est maintenant en cours aux Etats-Unis. Une protéine de fusion, appelée CTLA4-Ig, a une interaction de haute affinité avec B7-1 et B7-2. Elle bloque le récepteur de co-stimulation CD28, et de cette façon interfère dans l'activation des lymphocytes B par les lymphocytes T auxiliaires (Abrams, 1999).

2.3.2 Le Lupus

Le lupus érythémateux systémique (LES) est caractérisé par la forte production d'anticorps dirigés contre les composants nucléaires (Radic, 1994). Les patients atteints de LES peuvent présenter une variété de symptômes le plus souvent des rougeurs (érythèmes) sur la peau du visage, une inflammation des vaisseaux sanguins, des maladies rénales, de l'arthrite et des anomalies du système nerveux central. La plupart de ces symptômes seraient causés par les auto-anticorps, spécifiquement dirigés contre les composants nucléaires, notamment les ADN double brin (dsADN), les histones et les complexes protéine-ARN (DeFranco, 2007). Le plus souvent associées au lupus, les complications rénales sont caractérisées par la présence de complexe immun anti-dsADN-ADN dans le glomérule (DeFranco, 2007). Les forces hydrodynamiques du sang favorisent le dépôt des complexes immuns dans le glomérule et dans les articulations pour des raisons physiques. La sortie des composants nucléaires des cellules apoptotiques serait à l'origine de ces dépôts de complexes immuns (Cocca, 2002). La sortie locale de ces composants nucléaires par les cellules apoptotiques pourrait expliquer les

rougeurs de la peau dépendantes de l'exposition au soleil. L'apoptose des cellules serait, dans ce cas-ci, causée par les rayons ultraviolets (DeFranco, 2007). Une des caractéristiques propre des autoantigènes du LES est la présence de protéines associées à l'ADN dans les complexes immuns. Il a été suggéré récemment que les fragments de chromatines libérés par les cellules en apoptose pourraient stimuler la production d'anticorps par la reconnaissance simultanée de deux récepteurs des lymphocytes B: TLR9, qui reconnaît les motifs CpG de l'ADN, et le récepteur d'ADN des cellules B spécifiques à l'ADN (Viglianti, 2003). La plupart des individus ne produisent pas des quantités élevées d'autoanticorps dirigés contre les composants nucléaires. De ce fait, le LES requiert des éléments additionnels lesquels incluent des mécanismes de tolérance des lymphocytes B compromis. Une autre particularité des autoantigènes du LES est qu'ils peuvent se retrouver à la surface des cellules apoptotiques (Cocca, 2002). En effet, une déficience dans la clairance des cellules apoptotiques induit le développement d'une maladie semblable au LES. Ceci pourrait expliquer la tendance bien documentée qu'on les individus avec des déficiences génétiques au niveau des composants du complément de développer le LES (Aggarwal, 2009). Par exemple, pratiquement tous les individus déficients en C1q développent le LES. C1q s'attache aux cellules apoptotiques et favorise leur clairance. Conséquemment, il se pourrait que parmi les prédispositions génétiques causant le LES, celles relatives à la clairance des cellules apoptotiques seraient inclues (Aggarwal, 2009). Avec les traitements d'aujourd'hui les patients atteints de LES ont approximativement 80% de chance de survivre 10 ans après le diagnostique. Le ralentissement de la maladie est malheureusement accompagné par de sévères effets secondaires causés par les agents stéroïdiens immunosuppresseurs et l'inhibiteur de la synthèse d'ADN double brin (cyclophosphamide) utilisés (DeFranco, 2007). Une autre thérapie utilise un anticorps monoclonal anti-CD20 éliminant les lymphocytes B. La déplétion des lymphocytes B réduit de 50% le niveau d'IgG sanguin. Cette baisse incomplète reflète probablement la production continue d'IgG par les plasmocytes de longue durée de vie n'exprimant pas le CD20 (Gorman, 2004). La protéine chimérique CTLA4-Ig est aussi utilisée pour traiter cette maladie en bloquant le récepteur de co-stimulation CD28 nécessaire à l'activation des lymphocytes B par les lymphocytes T auxiliaires (DeFranco, 2007).

3. Les principales fonctions du neutrophile

La maturation des neutrophiles est classiquement divisée en 6 étapes (myéloblaste, promyélocyte, myélocyte, métamyélocyte, «band» neutrophile, neutrophile). On peut caractériser chacune des étapes par l'apparition de granules et par la forme du noyau. Au stade promyélocyte, une seule sorte de granule dit azurophile est présent. Au stade myélocyte, on voit l'apparition d'un autre type de granule dit secondaire ou sécrétoire. Les deux types de granules cohabitent jusqu'à la fin de la maturation du neutrophile. Un autre stade de maturation, correspondant à l'état métamyélocyte, est caractérisé par le changement de forme du noyau. Ce processus continue et le métamyélocyte s'appelle désormais un «band-neutrophil». Après 14 jours de maturation dans la moelle osseuse, le neutrophile à un noyau polylobé, tous ses granules et il quitte la moelle osseuse pour circuler dans le sang durant quelques jours, ou plus si une infection se présente (Bainton, 1971). Le neutrophile est un granulocyte et aussi un phagocyte. Il est impliqué dans des processus d'inflammations aiguës et chroniques. Environ 50% des neutrophiles isolés de la circulation sanguine entrent en apoptose après 24 heures s'ils ne subissent aucune stimulation. Dans la circulation sanguine la quantité de neutrophile reste sensiblement la même chez un individu sain, mais en cas d'infection la quantité de neutrophile peut augmenter. Les neutrophiles sont parmi les premiers types de cellules à arriver sur les lieux d'infection ou de blessure. Ils sont en partie responsables de la réponse inflammatoire à cause de leur très grand nombre et de l'activité microbicide de leurs granules. L'apoptose spontanée des neutrophiles est essentielle à leur régulation. Un dérèglement dans la régulation de leur apoptose peut mener à des complications pathologiques ou inflammatoires (Monteseirin, 2009).

3.1 L'apoptose

La mort cellulaire peut survenir de deux façons principales, par nécrose ou par apoptose. La nécrose peut survenir à cause d'une blessure ponctuelle causant la rupture de la cellule. Les cellules nécrotiques libèrent leur contenu cytoplasmique dans l'espace extracellulaire alors que les cellules apoptotiques gardent le contenu cytoplasmique à l'intérieur de la cellule. Ceci empêche le contenu intracellulaire de déclencher une inflammation. Habituellement, les cellules en apoptose sont reconnues et internalisées par les phagocytes. L'apoptose survient dans le renouvellement normal d'un tissu, mais peut aussi être induit lors d'infections bactériennes ou virales. L'apoptose joue un rôle majeur dans le contrôle de la durée de vie des

cellules immunitaires. Le nombre de cellules immunitaires augmente suite à une infection. Il est par la suite rétabli par une hausse de l'apoptose des cellules immunitaires lorsque l'infection est terminée. L'apoptose joue aussi un rôle pour éliminer les lymphocytes qui réagissent trop fortement avec les antigènes du soi durant leur développement. L'apoptose est une fonction des plus importantes dans la régulation du système immunitaire. Elle est caractérisée par une séquence d'évènements stéréotypés incluant la perte de la fonction mitochondriale, la condensation nucléaire, l'attaque génomique par les nucléases, la fragmentation de l'ADN et la perte de l'asymétrie membranaire par exposition extérieure des phosphatidylsérines. Classiquement, l'apoptose peut être déclenchée par deux voies appelées voie intrinsèque et voie extrinsèque. Plus récemment, une nouvelle voie commence à se définir, la voie du réticulum endoplasmique. Toutes les voies d'apoptose convergent vers l'activation d'une petite famille de protéases appelées caspases. Leur nom vient du fait que ces protéases possèdent une cystéine dans leur site actif et qu'elles clivent après un résidu d'acide aspartique sur leurs protéines cibles. Toutes les voies déclenchent l'apoptose par l'activation de caspases initiateuses clivant et activant d'autres caspases dites effectrices. Les caspases effectrices clivent plusieurs cibles protéiques aboutissant à la mort cellulaire programmée ou autrement dit l'apoptose (DeFranco, 2007).

3.1.1 La voie extrinsèque

La voie extrinsèque est le mécanisme par lequel les cellules infectées par des virus sont tuées par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK. Cette voie est initiée par une famille de récepteur du TNF possédant des «domaines de mort» dans leur domaine intracellulaire. La reconnaissance du ligand par le récepteur induit la formation d'un complexe au domaine cytoplasmique comprenant des protéines adaptatrices et la procaspases-8 ou la procaspase-10. Ces procaspases ont une activité catalytique très faible mais l'instauration du complexe est suffisante pour leur activation en caspases initiateuses. Ces dernières viennent cliver d'autres procaspases en caspases effectrices générant une cascade protéolytique menant à l'apoptose (Harada, 2003).

3.1.2 La voie intrinsèque

La voie intrinsèque peut être déclenchée par une variété de stress ou de signaux externes. Par exemple, des désordres internes au niveau de la mitochondrie, du réticulum endoplasmique ou

dans la synthèse de l'ADN peut induire l'apoptose. Cette voie protège la cellule contre les problèmes pouvant survenir lors d'infections virales ou de néoplasmes présentant un dérèglement de régulation en induisant sa mort programmée. Elle peut aussi être déclenchée par la perte de signaux de survie transmis par les récepteurs de cytokines ou les intégrines. La régulation de la voie intrinsèque est plus complexe que celle de la voie extrinsèque. Une de ses caractéristiques principales est l'assemblage d'un complexe formé par la caspase initiateur procaspase-9, la molécule adaptatrice «apoptotic protease activating factor 1» (Apaf-1) et le cytochrome c. Ce complexe est appelé apoptosome et sa formation est déclenchée par l'association de l'Apaf-1 au cytochrome c. Ce dernier est libéré par la mitochondrie et est un événement précoce dans l'induction de l'apoptose. L'association de la caspase-9 au complexe Apaf-1/cytochrome c augmente grandement son activité et est suffisante pour activer les caspases effectrices induisant l'apoptose (Harada, 2003).

3.1.3 La voie du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est l'organelle où les protéines sont synthétisées et repliées. Après leur synthèse les protéines subissent des modifications post-traductionnelles au sein du RE. Les glycosylations, les lipidations et les formations de liens disulfures sont effectuées sur les protéines nouvellement synthétisées pour qu'elles acquièrent une conformation finale et spécifique appelée conformation native. Ce processus est opéré par des chaperonnes et des enzymes. Ces dernières peuvent soit glycosyler ou ajouter des groupements lipidiques ou favoriser le repliement ou la formation de liens disulfures des néoprotéines. Ce processus est constamment opérationnel lors de la synthèse protéique pour le maintien de l'homéostasie normale de la cellule. Néanmoins, il se peut que des conditions physiologiques changeantes peuvent causer l'augmentation et l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE causant un stress du RE. Ce stress génère une réponse qui active une machinerie visant à rétablir la conformation native des protéines et la saine homéostasie qui en résulte. Cette réponse est communément appelée la «unfolded protein response» (UPR) (Schroder, 2005). Cette réponse est caractérisée par l'arrêt temporaire de la synthèse des protéines et par l'activation de signalisations et de facteurs de transcriptions. La UPR est transmise par trois senseurs du stress du RE : «inositol-requiring protein-1» (IRE1), «activating transcription factor-6» (ATF6) et «protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase» (PERK). IRE1, ATF6 et PERK possèdent tous un domaine intraluminal du RE reconnaissant les protéines mal repliées et un domaine kinase cytosolique activant d'autres protéines de signalisations effectrices.

L'activation de la UPR mène ultimement à une variété de réponses cellulaires incluant l'atténuation de la traduction, la transcription de gènes codant des protéines chaperonnes et des enzymes requises pour le repliement des protéines ainsi que la transcription de gènes codant pour le «ER associated degradation» (ERAD) pour la reconnaissance et la dégradation des protéines mal repliées par le protéasome (Rasheva, 2009). Cette réponse est mise en place de façon temporaire pour palier au stress du RE et pour rétablir l'homéostasie normale. Cependant, si cette réponse ne peut correctement rétablir l'homéostasie, l'apoptose est déclenchée. Le mécanisme exact de l'induction de l'apoptose par le RE est encore largement méconnu et nécessite de plus amples investigations. Chez la souris, la caspase-12 a été démontrée comme étant très fortement impliquée. La caspase-12 est activée par les calpains (Nakagawa, 2000), des protéases cytoplasmiques activées par le calcium. Après son activation, la caspase-12 clive la caspase-9 menant à l'activation de la caspase-3 (Morishima, 2002). Chez l'homme la caspase-12 n'est pas fonctionnelle (Fischer, 2002), ce serait plutôt la caspase-4 (Hitomi, 2004) qui opérerait l'activation des caspases initiatrices et effectrices. Les cellules soumises à un stress du RE peuvent s'adapter et survivre grâce à la UPR, mais la décision entre la vie ou la mort programmée dépendrait plus largement de l'intensité du stress plutôt que de la spécificité de la voie de signalisation (Rasheva, 2009). Finalement, de nouvelles recherches sont nécessaires pour pleinement comprendre cette réponse qui peut soit résulter en la survie ou la mort de la cellule.

3.2 La phagocytose

La phagocytose est un mécanisme majeur de destruction des microbes. C'est un processus dans lequel la reconnaissance d'une particule par des récepteurs spécifiques à la surface des phagocytes déclenche la polymérisation de l'actine, l'internalisation de la particule et sa livraison dans des organelles intracellulaires spécialisées contenant des enzymes et des produits antimicrobiens. Les phagocytes possèdent une multitude de récepteurs de phagocytose. Quelques uns de ces récepteurs sont décrits dans le tableau II. L'internalisation d'une particule via un récepteur résulte en la formation d'une vésicule appelée phagosome. Le phagosome fusionne avec les granules primaires et/ou secondaires et finalement avec les lysosomes pour former une vésicule pleinement destructive appelée le phagolysosome. Cette dernière contient des peptides antimicrobiens, des enzymes digestives (élastase, Cathepsin G), et des réactifs de l'oxygène et de l'azote hautement toxiques. Un processus similaire se

produit pour les macrophages et les cellules dendritiques à l'exception des granules primaires et secondaires qui sont absentes chez ses derniers. La nature exacte du processus de phagocytose dépend du récepteur engagé par la particule. Tous les récepteurs de phagocytose activent la polymérisation de l'actine via des petites GTPases appartenant à la famille des Rho-GTPases. Lorsque la phagocytose est déclenchée par le récepteur du complément 3 (CR3), l'internalisation de la particule s'effectue de façon lente et douce. Ce processus est dépendant des petites Rho-GTPases, dans ce cas-ci la fusion avec le lysosome se fait lentement, mais peut-être accélérer par la reconnaissance d'autres récepteurs, comme le TLR et le C-type lectine récepteur. Aussi, les activités antimicrobiennes peuvent être exacerbées par la reconnaissance simultanée de iC3b (fragment du complément) et de β -glucans (composant de la paroi des bactéries). Lorsque la phagocytose implique un récepteur de type Fc γ , les particules sont opsonisées par des anticorps. Ce processus de phagocytose est aussi plus vigoureux et les membranes forment des extensions qui englobent la particule. Ces extensions membranaires sont formées à la suite d'une polymérisation de l'actine contrôlée par deux autres GTPases, Rac et Cdc42 (Forsberg, 2002). Cette phagocytose plus vigoureuse par les récepteurs Fc peut s'expliquer par le fait que le complément peut opsoniser des pathogènes et/ou des cellules apoptotiques, alors que les anticorps sont spécifiques pour les pathogènes (DeFranco, 2007).

Le tableau II : Les récepteurs de phagocytose dans l'immunité innée.

Récepteurs	Type	Expression	Ligands
Récepteurs de l'immunité innée			
Mannose	C-type lectin	MΦ, DC	Mannoses
DEC 205	C-type lectin	DC	Mannoses
Dectin-1	C-type lectin	MΦ	Polysaccharides riches en glucoses
CD14	Motifs riches en leucine	MΦ, PMN	Cellules apoptotiques, LPS
MARCO	SR-A	MΦ,	Parois bactériennes
Scavenger reporter A I	SR-A	MΦ	Cellules apoptotiques, LPS, LTA
CD36	SR-B	MΦ	Cellules apoptotiques, érythrocytes parasités
Récepteurs d'opsonines			
C1qRp (CD93)	C-type lectin	MΦ	C1q ; collectines
CR3 (CD11c/CD18)	Intégrine	MΦ, PMN	iC3b, b-glucanes, ICAM1/2
CR4 (CD11d/CD18)	Intégrine	MΦ, PMN, DC	iC3b, fibrinogène
FcγRI (CD64)	Ig, ITAM	MΦ, PMN	IgG, CRP, SAP
FcγRII (CD32)	Ig, ITAM	MΦ, PMN	IgG
FcγRIII (CD16)	Ig, ITAM	MΦ, PMN, NK	IgG, SAP
FcγRIV	Ig, ITAM	MΦ, PMN, DC	IgG2a, IgG2b
FcαR (CD89)	Ig, ITAM	MΦ, PMN, Éos	IgA
Intégrine αvβ3	Intégrine	MΦ, plaquettes	Cellules opsonisées à thrombospondine
Mer	RTK	MΦ	Cellules apoptotiques

*Inspiré de DeFranco, 2007

Légende : MΦ: macrophages ; DC: cellules dendritiques ; PMN: neutrophiles ; Éos: Éosinophiles ; NK : cellules tueuses naturelles ; LPS : Lipopolysaccharides ; ICAM : «Inter Cellular Adhesion Molecule» ; Ig : Immunoglobuline.

3.3 La migration

De nombreux types de leucocytes se déplacent d'une partie du corps à une autre. C'est particulièrement vrai pour les lymphocytes circulant dans le sang, dans la lymphe et migrant dans les tissus infectés ou lésés. Cette recirculation, non seulement augmente la probabilité que les lymphocytes spécifiques d'un antigène rencontrent ce dernier, mais aussi est essentielle au développement d'une réponse inflammatoire. L'inflammation est une réponse

complexe à une lésion locale ou à tout autre traumatisme. L'inflammation implique diverses cellules du système immunitaire et de nombreux médiateurs. L'assemblage et la régulation des réponses inflammatoires seraient impossibles sans la migration contrôlée des populations de leucocytes. L'endothélium vasculaire permet le mouvement des molécules et des cellules transportées par le sang vers les différents tissus de l'organisme. Les cellules circulantes qui désirent pénétrer dans un tissu doivent premièrement adhérer aux cellules endothéliales puis passer entre ces dernières. Ce dernier processus s'appelle l'extravasation. Les cellules endothéliales expriment des molécules d'adhésion cellulaire (ICAM) spécifiques aux leucocytes. Certaines de ces protéines membranaires sont exprimées de façon constitutive alors que d'autres ne le sont qu'en réponse aux cytokines produites par une réponse inflammatoire (Goldsby, 2000).

3.3.1 L'extravasation du neutrophile

Les neutrophiles sont généralement les premiers à se lier à l'endothélium activé et à passer à travers ce dernier. Le processus d'extravasation peut être divisé en quatre étapes successives : i) roulement, ii) activation, iii) arrêt et adhésion, et iv) migration. Dans la première étape, les neutrophiles s'attachent à l'endothélium par une interaction de faible affinité carbohydate-sélectine. Les molécules de sélectine-E et de sélectine-P se lient aux molécules d'adhésion cellulaire «mucine-like» de la membrane des neutrophiles ou avec un lactosaminoglycane sialylé, appelé sialyl Lewis. Cette interaction attache brièvement les neutrophiles aux cellules endothéliales et la force tangentielle du sang détache rapidement les neutrophiles. Les molécules de sélectines d'une autre cellule endothéliale fixent à nouveau le neutrophile. Ce processus se répète de telle façon que le neutrophile roule le long de l'endothélium. Ce type de liaison est appelé roulement. Lorsque le neutrophile roule, il est activé par divers chimioattractants. Ces chimioattractants sont des constituants permanents des cellules endothéliales ou des peptides sécrétés localement par une réponse inflammatoire. Les plus importants chimioattractants des neutrophiles sont deux chimiokines, l'interleukine-8 (IL-8) et la protéine inflammatoire des macrophages, MIP-1 β . La liaison de ces chimioattractants aux récepteurs de la membrane des neutrophiles déclenche un signal d'activation. L'activation des neutrophiles induit un changement conformationnel des molécules d'intégrines augmentant leur affinité pour les molécules d'adhésion de la superfamille des Ig à la surface des cellules endothéliales. L'interaction des intégrines avec les ICAM de la superfamille des

Ig stabilise les neutrophiles permettant une adhésion ferme avec les cellules endothéliales. Par la suite, les neutrophiles migrent vers les tissus. Le mécanisme précis par lequel la migration transendothéliale s'effectue est encore malheureusement largement méconnu (Goldsby, 2000).

3.4 La dégranulation

La dégranulation des neutrophiles est la cause de plusieurs désordres inflammatoires incluant l'inflammation pulmonaire, la polyarthrite rhumatoïde et le choc septique (Skubitz, 1999). La dégranulation est un processus qui s'effectue en 4 étapes. La première est le recrutement de la vésicule du cytoplasme à la membrane plasmique et requiert le remodelage du réseau d'actine et l'assemblage des microtubules (Burgoyne et Morgan, 2003). Cette étape est suivie par l'attachement de la vésicule à la surface interne de la membrane plasmique. La vésicule est alors prise en charge rapidement et un lien se développe entre la vésicule et la membrane plasmique. Ce lien mène à la formation d'un pore de fusion qui, en prenant de l'expansion, permet la pleine fusion entre la vésicule et la membrane plasmique. La fusion induit la sortie du contenu interne de la vésicule vers l'extérieur de la membrane plasmique. Durant l'exocytose des granules, il y a une augmentation de la surface membranaire de la cellule et une exposition de la surface membranaire interne des vésicules à l'extérieur. Les neutrophiles dégranulent en réponse aux concentrations internes de calcium. À mesure que la concentration interne de calcium augmente, les granules sont hiérarchiquement dégranulés. En premier, ce sont les vésicules sécrétoires, suivies des granules gélatinases (ou secondaires), suivis des granules spécifiques pour finir avec les granules azurophiles (ou primaires). Cette hiérarchie dans l'exocytose des granules, avec le fait que les granules ont différentes affinités pour le calcium (Nüsse et Lindau, 1988), suggère l'existence d'un mécanisme pour chaque type de granule (Lacy, 2005). Le tableau suivant résume le contenu des différents granules des neutrophiles.

Tableau III : Le contenu des granules des neutrophiles.

Granules azurophiles	Granules spécifiques	Granules gélatinases	Vésicules sécrétoires
Membrane			
CD63	CD11b/CD18	CD11b/CD18	Phosphatase alcaline
CD68	CD15	Cytochrome b ₅₅₈	CD10
Preseniline 1	CD66	DAG deacétylase	CD11b/CD18
Stomatine	CD67	fMLP-R	CD13
V-type H ⁺ -ATPase	Cytochrome b ₅₅₈	Leukolysine	CD14
	fMLP-R	Nramp-1	CD16
	Fibronectine-R	SCAMP	CD45
	G-protéin _α -subunit	SNAP-23, -25	CR1
	Laminine-R	uPA-R	C1q-R
	Leukolysine	VAMP-2	Cytochrome b ₅₅₈
	NB1 antigène	V-type H ⁺ -ATPase	DAF
	Rap1, Rap2		Leukolysine
	SCAMP		VAMP-2
	SNAP-23, -25		V-type H ⁺ -ATPase
	Stomatine		
	Thrombospondine-R		
	TNF-R		
	uPA-R		
	VAMP-2		
	Vitronectine-R		
Matrice			
β-glycérophosphatase	β2-Microglobuline	Acétyltransférase	Protéines plasmatiques
Mucopolysaccharide	Collagénase	β2-Microglobuline	
α1-Antitrypsine	Gélatinase	CRISP-3	
α-Mannosidase	hCAP-18	Gélatinase	
Azurocidine	Histaminase	Lysozyme	
BPI	Heparanase		
b-glucuronidase	Lactoferrine		

Cathepsines	Lysozyme		
Defensines	NGAL		
Élastase	uPA		
Lysozyme	Sialidase		
MPO	Transcobalamine-I		
Proteinase-3			
Sialidase			
Ubiquitine-protéine			

*Inspiré de Faurschou, 2003.

Légende: CRISP: «cystein-rich secretory protein»; uPA: «urokinase-type plasminogen activator»; MPO: myeloperoxidase; DAF: «decay-accelerating factor»; BPI: «Bacterial/Permeability-Increasing protein»; hCAP-18: «human cathelicidin protein-18»; VAMP: «Vesicle-Associated Membrane Protein»; SNAP: «Synaptosome-Associated protein»; SCAMP: «secretory carrier membrane protein»; NGAL: «Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin»; Nramp-1: «Natural resistance-associated macrophage protein 1».

Le recrutement des neutrophiles au site d'inflammation constitue un événement essentiel à la réponse aiguë face aux micro-organismes envahissants. Ce recrutement implique une série d'exocytose régulée modifiant l'état fonctionnel des neutrophiles (Faurschou, 2003). L'exocytose des granules gélatinases libère des métalloprotéases jouant un rôle significatif dans la dégradation de la membrane basale de l'endothélium vasculaire durant l'extravasation des neutrophiles (Delclaux, 1996). Pendant l'extravasation des neutrophiles dans le milieu interstitiel des tissus, les granules spécifiques et azurophiles ne subissent qu'une exocytose partielle (Sengelov, 1995). Lorsque les neutrophiles rencontrent les micro-organismes, ils activent les mécanismes antimicrobiens dépendants et indépendants de l'oxygène en dégranulant les granules spécifiques et azurophiles dans le phagosome ou dans le milieu extérieur (Joiner, 1989). Certains constituants granulaires agissent directement sur la paroi bactérienne (défensines, BPI, hCAP-18, lactoferrine, lysozyme), d'autres interfèrent avec le métabolisme bactérien dépendant du fer (NGAL, lactoferrine, Nramp1), et d'autres participent dans la production de réactifs oxygénés (cytochrome b_{558} , MPO). Une autre particularité des constituants granulaires (défensines, azurocidines, hCAP-18) est leur habileté à attirer les lymphocytes T CD4 et CD8 par chimiotaxie. Cette habileté amplifie la réponse inflammatoire et constitue un lien entre l'immunité innée et acquise (Faurschou, 2003).

4. Spleen tyrosine kinase (Syk)

4.1 Structure

Cette kinase cytoplasmique a, pour la première fois, été isolé d'une rate porcine. La structure et la fonction de Syk sont partagées par une autre kinase, ZAP-70. Ces deux kinases forment une famille de kinases appelée la «Syk family». La plus grande particularité de cette famille de kinase est la présence de deux domaines «Src homology 2» (SH2). Les deux domaines SH2 N-terminaux ainsi que le domaine kinase C-terminal sont séparés par des domaines intermédiaires (interdomaines) (Taniguchi, 1991). La différence majeure entre Syk et ZAP-70 est la présence d'un plus grand nombre de tyrosine phosphorylables sur ses «interdomaines» (Futterer, 1998). Ces dernières tyrosines régulent l'état d'activation et les interactions protéines-protéines de ces kinases, même si c'est surtout les deux domaines SH2 qui régulent l'état d'activation et les interactions protéines-protéines de ces kinases. Les deux domaines SH2 en tandem reconnaissent un motif d'activation des immunorécepteurs. Ce motif d'activation des immunorécepteurs est appelé «Immunoreceptor-Tyrosine-Activated-based-Motif» (ITAM) et est constitué par deux tyrosines (YXXI/L-X₆₋₁₂-YXXI/L) phosphorylées en tandem sur la région cytoplasmique des immunorécepteurs (Sada, 2001). Ces dernières tyrosines sont phosphorylées par un membre de la famille des Src kinase ou par autophosphorylation suite à la multimérisation des immunorécepteurs. Le motif ITAM et les deux domaines SH2 de Syk interagissent pour pleinement activée le domaine kinase de Syk maintenu constitutivement inactif par autorégulation. Syk peut alors soit s'autoactiver, c'est-à-dire, phosphoryler son domaine kinase (Tyr-525/526) ou être activé par une Src kinase. La kinase est maintenue dans une conformation active grâce aux répulsions électrostatiques du groupe phosphoryl ajouté sur les tyrosines des interdomaines et du site actif, ainsi que par ses interactions avec les motifs ITAM des immunorécepteurs (Tsang, 2008). À l'inverse, cette kinase est constitutivement maintenue dans une conformation inactive grâce aux interactions des domaines SH2 et kinase avec les interdomaines de la protéine. La disruption de ces interactions induit l'ouverture de la protéine et la pleine activation de son domaine kinase.

4.2 Fonctions

La tyrosine kinase Syk est essentielle pour initier les signalisations dépendantes des immunorécepteurs. Cette kinase est capable de s'associer à la portion cytoplasmique d'une

vaste gamme d'intégrines et de récepteurs Fc exprimés différemment chez une variété de cellules immunitaires. Ces derniers récepteurs immunologiques régulent une variété de fonctions hématopoïétiques comme la phagocytose, l'adhésion, la migration, l'apoptose, la dégranulation, la cytotoxicité dépendant des anticorps (ADCC), l'activation des plaquettes, la résorption osseuse des ostéoclastes, etc (Ortiz-Stern, 2003). Aussi, Syk régule la signalisation de cellules non hématopoïétiques utilisant des adaptateurs ou des récepteurs comprenant des motifs ITAM. Parmi ces adaptateurs, DAP12 est le plus important. Les fonctions apparentes de Syk sont très variées car plusieurs fonctions cellulaires sont dépendantes de la signalisation d'un «ITAM récepteur», mais son rôle principal est de phosphoryler et d'activer d'autres protéines intracellulaires. Parmi ces protéines, on retrouve des protéines impliquées dans la réorganisation du cytosquelette, dans l'amplification du signal médié par le calcium, dans la flambée oxydative et dans la réorganisation membranaire des intégrines. (Siaw Wei Ng, 2008 ; Takano, 2002 ; Willeke, 2003) Tous ces changements cytoplasmiques et membranaires reflètent la très vaste gamme de fonctions cellulaires affectées par Syk. Par exemple, la réorganisation du cytosquelette peut se caractériser par la formation de pseudopodes pour la phagocytose, par la polarisation de la cellule, par la migration, par la formation de complexes d'adhésion focale, par la dégranulation, par le transport de vésicule intracellulaire, par la formation/inhibition de fuseau mitotique, par la réorganisation intracellulaire des protéines d'échafaudages, etc. Dans le même ordre d'idées, l'amplification du signal médié par le calcium favorise une réponse cellulaire soutenue grâce à l'activation des protéines et des canaux calciques. Finalement, la flambée oxydative favorise la phagocytose, amplifie le signal du stress oxydatif, modifie l'expression génique, induit l'inflammation et l'apoptose, etc. Bref, Syk possède un grand pouvoir de répercussion sur la cellule qui l'utilise pour transmettre la signalisation dépendante des ITAMs. D'ailleurs son inhibition pharmacologique est une avenue de recherche prisée dans la résolution de plusieurs cas d'inflammations chroniques. Le tableau suivant résume les «ITAM-récepteurs» avec lesquels Syk interagit.

Tableau IV : Les motifs ITAM dans les immunorécepteurs

Récepteurs	Sous-unité ITAM	Fonctions
Fc γ RI, Fc γ RIV, FC α RI	FcR γ	Reconnaissance d'anticorps, phagocytose, dégranulation, réponse inflammatoire
Fc γ RIIIA	FcR γ , CD3 ζ	
Fc γ RIIA	Fc γ RIIA	
Fc ϵ RI	FcR γ , Fc ϵ R β	
TCR	CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 ζ	Présentation d'antigène au CMH, activation des lymphocytes T
BCR	Ig α , Ig β	Reconnaissance d'antigènes, activation des lymphocytes B
Dectin-1	Dectin-1	Phagocytose et reconnaissance des mycètes, réponse inflammatoire
CLEC2	CLEC2	Activation des plaquettes
Glycoprotéine VI	FcR γ	Activation des plaquettes
PIR-A	FcR γ	Reconnaissance par le CMH classe I
OSCAR	FcR γ	Activation des cellules myéloïdes
NFAM1	NFAM1	Développement des cellules B
Intégrines	DAP12, FcR γ	Adhésion cellulaire, migration
Siglec-H	DAP12	Régulation des cellules dendritiques
Ly49, NKG2D-S, NKp44	DAP12	Activation des cellules NK
NKp46	CD3 ζ	Activation des cellules NK
TREMs, SIRP- β , PILR- β	DAP12	Activation des cellules myéloïdes

*Inspiré de Underhill, 2006

Légende : CLEC: C-type lectin ; NFAM: «Nuclear Factor of Activated T cells activating Molecule»; OSCAR: «Osteoclast-Associated Receptor»; PILR: «Paired Immunoglobulin-Like Receptor»; PIR: «Paired Immunoglobulin-Like Receptor; SIRP: «Signal Regulatory Protein»; TREM: «Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells».

4.3 Régulation négative de Syk

Syk n'est pas phosphorylée ni associée au récepteur chez les cellules en repos. De plus, la surexpression ectopique de Syk induit son hyperphosphorylation. Il doit donc exister au sein de la cellule des mécanismes qui tendent à maintenir Syk dans un état inactif pour éviter un signal constitutif de la kinase. Un des mécanismes de régulation négative les plus probants est la présence de protéines tyrosines phosphatases (PTPs) spécifiques qui la déphosphorylent continuellement (Maeda, 1999). SHP1 est une des PTPs les plus susceptibles de jouer ce rôle de régulation négative pour Syk car elle possède deux domaines SH2 en tandem reconnaissant

les motifs ITAMs des immunorécepteurs. Un autre mécanisme est la régulation négative par l'ubiquitine E3-ligase Cbl car elle s'associe aux interdomaines de ZAP-70 par ses domaines SH2. Une déficience en Cbl augmente de façon marquée l'activité de ZAP-70 (Murphy, 1998), alors qu'une surexpression de Cbl supprime la signalisation des récepteurs FcERI chez les cellules RBL-2H3 (Ota, 1997). Ultiment, l'association de Cbl avec les complexes immunorécepteur/PTK (protéine tyrosine kinase) causerait leur ubiquitination promouvant leur endocytose et leur dégradation par le protéasome (Sada, 2001). Finalement, l'interdomaine A de Syk, une hélice alpha qui participe largement dans les interactions protéines/protéines, viendrait intramoléculairement inhiber le domaine catalytique de Syk en maintenant la kinase en position fermée (Hatada, 1995)

4.4 Le rôle de Syk chez les cellules non hématopoïétiques

Syk est présente dans une variété de tissu et joue un rôle multifonctionnel. Malheureusement, un modèle d'études de Syk utilisant des souris «knock-out» n'est pas possible puisque les souris déficientes présentent de sévères hémorragies internes et meurent peu après la naissance (Turner, 1995). Ce phénotype particulier serait dû à une mauvaise séparation des vaisseaux sanguins et lymphatiques causant l'accumulation de globules rouges dans la lymphe (Abtahian, 2003). Syk est retrouvé dans les cellules épithéliales mammaires, les hépatocytes, les fibroblastes, les cellules neuronales et dans les cellules endothéliales vasculaires. Chez ces dernières, Syk jouerait un rôle critique dans la croissance cellulaire, la morphogénèse, la migration, la survie et l'intégrité vasculaire. Syk jouerait aussi un rôle dans la réorganisation de ces cellules durant l'angiogénèse. Elle serait donc une cible potentielle pour l'inhibition de l'angiogénèse et la progression tumorale (Sada, 2001). Comme chez les cellules immunitaires Syk contribuerait à la mobilisation du calcium intracellulaire et à l'activation des MAPKs dans une variété des cellules. Syk modulerait des fonctions comme la réorganisation du cytosquelette, la croissance et l'apoptose lorsque régulées par les récepteurs de facteurs de croissance (Sada, 2001). De plus, de nombreuses molécules exprimées dans les cellules non hématopoïétiques possèdent des séquences de type ITAM. Les Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) étant impliqués dans de nombreuses fonctions du cytosquelette sont présentes dans une variété de cellule et comportent des séquences ITAM (Bretscher, 2002). PSGL-1, une molécule d'adhésion, active Syk et la transcription génétique par un mécanisme impliquant des interactions ITAM-dépendantes avec les domaines SH2 de Syk et la moesin (Urzainqui, 2002). Ceci suggère un mécanisme général basé sur les motifs ITAM pour la réorganisation

du cytosquelette. Plusieurs autres familles de protéines sont suggérées pour interagir avec Syk de façon ITAM-dépendante, mais leur association réelle n'a pas encore été reportée. Malgré cela, pour apprécier le nombre total de protéines pouvant interagir avec Syk via les motifs ITAM, un groupe (Fodor, 2005) a fait un criblage dans la base de données SwissProt. De la plus contraignante à la plus permissive séquence, le groupe a trouvé des correspondances allant de 48 à 368 protéines possédant un motif ITAM. Les résultats ont donné une majorité de protéines qui ne sont pas connues à ce jour pour être des protéines qui signalent par des ITAM. Ces protéines sont plutôt impliquées dans des fonctions cellulaires variées incluant des protéines de structure, des enzymes, des protéines motrices, des transporteurs membranaires, des récepteurs, des seconds messagers, des protéines qui s'associe à l'ADN, etc. Même si la plupart de ces protéines ne transmettent pas de signaux ITAM-dépendants, il est néanmoins possible qu'une fraction de celles-ci le fassent et donc élargissent encore plus le rôle de la signalisation dépendante des ITAM et la vision qu'on a de celle-ci (Fodor, 2005)

5. Le trioxyde d'arsenic (TA)

5.1 Historique d'une panacée

Surnommé «The Mule» à cause de la persistance aveuglée avec laquelle on l'utilisait malgré ses effets toxiques, l'arsenic est devenu très étudié depuis les dernières décennies. Son usage médicinal remonte à plus de 2000 ans en Grèce, en Italie et en Chine antique. Il était vu autant comme thérapeutique que comme poison. L'arsenic et ses dérivés étaient prescrits par les médecins de l'époque pour traiter des maux internes et externes. Plus d'une soixantaine de solutions et de toniques ont été développés et distribués depuis le début de l'existence de ce traitement. À partir du 18^e siècle, un dérivé d'arsenic soluble à l'eau a fait son apparition ; on en a fait une solution : la solution de Fowler. Cette solution a gagné en popularité et a été utilisée pour traiter plusieurs conditions. Cette solution servait à traiter les paralysies, les rhumatismes, les hypochondries, les épilepsies, les hystéries, les mélancolies, les oedèmes, les rachitismes, les palpitations cardiaques, les convulsions, les syphilis, les ulcères, les cancers, les dyspepsies, les anémies, les asthmes, les psoriasis et les eczémas (Haller 1975, Miller, 2002). Aujourd'hui, l'arsenic est utilisé pour traiter la leucémie promyélocytaire aiguë. Son utilisation induit et stabilise une rémission complète avec un minimum d'effets secondaires chez la grande majorité des patients (Shen, 1997).

5.2 Un agent chimiothérapeutique

Le trioxyde d'arsenic (TA) est une drogue très étudiée depuis sa venue sur le marché des agents chimiothérapeutiques. Le TA est étudié plus particulièrement sur un type de cancer, la leucémie promyélocytaire aiguë. Ce type de cancer est caractérisé par une translocation t(15;17) du génome. Cette translocation génère la fusion de deux gènes, PML et RAR α , codant pour un facteur de transcription (de Thé, 1990 ; Borrow, 1990) Ce nouveau facteur de transcription chimérique vient alors bloquer les gènes de différenciation normale des promyélocytes. Le décryptage de la séquence de PML a indiqué la présence d'une région riche en cystéine qu'on pense être la cible du TA car il est connu que l'arsenic a une forte affinité pour les groupements thiols, notamment les groupements dithiols formés par deux cystéines rapprochés. Un autre agent, le ATRA pour «all-trans rétinoïc acid», induit la différenciation des promyélocytes, mais en plus il dégrade le facteur de transcription PML-RAR α et relocalise le gène PML (Chen, 1996 ; Zhu, 1997). Le TA a été proposé comme agent alternatif chez les patients hypo ou hyper sensible au ATRA. Le ATRA induit la différenciation des promyélocytes alors que le TA induit plutôt l'apoptose des cellules cancéreuses, les deux agiraient donc par des mécanismes différents. L'arsenic cible la portion PML de la protéine, alors que ATRA cible la portion RAR α (Zhu, 1997). Dans cette lignée cellulaire, PML est reconnu pour interagir avec le suppresseur de tumeur p53, on a alors des raisons de croire que le TA empêcherait PML de s'associer à p53 inhibant ainsi la progression tumorale. Toutefois, la capacité du TA à stimuler d'autres voies pro-apoptotiques serait plus puissante que les effets d'un PML dégradé (Miller, 2002). Les études portées sur les cas de leucémies traitées par le ATRA et le TA, ont montré une baisse du nombre de leucocytes et de neutrophiles, donnant lieu à des leucopénies et des neutropénies. Ces résultats ont mené à de plus vastes investigations auprès des neutrophiles. Ces études ont montré que le TA est capable de stimuler des voies de signalisations impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires, ainsi que leur apoptose (Binet, 2008 ; Binet, 2006).

5.3 Mécanismes d'actions

Les cibles potentielles et avérées du TA sont nombreuses et variées. L'arsenic 3+ (arsenite ou TA) est capable d'altérer les enzymes, les protéines de signalisations et la transcription des gènes. Il active le facteur de transcription AP-1, et conséquemment ses produits c-fos et c-jun,

simultanément de l'activation de JNK. Il activerait JNK par l'inhibition d'une phosphatase (Cavigelli, 1996). Trois PKC, PKC α , PKC ϵ et PKC δ sont connues pour activer le facteur AP-1 et fonctionnent toutes par des MAP kinases différentes (Chen, 2000). L'arsenite modulerait la signalisation intracellulaire dépendante des radeaux lipidiques car l'utilisation de β -cyclodextrine, un agent déstabilisateur des radeaux lipidiques, empêche l'induction de la cascade proapoptotique incluant l'activation des MAP kinases, la production de superoxyde et l'activation des caspases (Hossain, 2000). Les phosphatases sont des cibles potentielles du TA. Elles ont un rôle très important dans la régulation des métabolismes cellulaires et possèdent souvent des groupements thiols vicinaux dans leurs sites actifs (Miller, 2002). La transduction des signaux inflammatoires est bloquée par le TA. Il inhibe IKK, un élément essentiel à l'activation du facteur de transcription NF κ B (Jing, 1999). L'apoptose est effectuée par les caspases, une famille de protéases à cystéines. Le TA augmente l'expression des procaspase 2 et 3 et l'activation des caspases 1 et 2 (Soignet, 1998). Il induit l'apoptose des myélomes par l'activation de la caspase-9 (Hayashi, 2002). Finalement, il active la caspase-3 des neuroblastomes (Akao, 1999) et des cellules myéloïdes leucémiques (Huang, 1999). L'arsenic perturbe l'équilibre redox des cellules. Les capacités redox de plusieurs enzymes sont dépendantes des cystéines. Autant les effets toxiques que thérapeutiques de l'arsenic sont dus à la régulation des protéines et enzymes «senseurs» du statut redox (Miller, 2002). La production de ROS suivant une exposition à l'arsenic mène à l'accumulation de H₂O₂ dans la cellule (Bernstam, 2000). L'apoptose induite par le TA est renversée par l'ajout de N-acetyl-cystéine (NAC) et de catalase, suggérant la forte implication des ROS (Daum, 2001). La réponse cellulaire à l'arsenic ressemble à un choc thermique. Les deux induisent l'expression des «heat shock proteins» (HSP) (Binet, 2006). Une autre protéine de stress est l'hème oxygénase (HO-1). Cette enzyme est surexprimée suite à l'exposition à l'arsenic des cellules HeLa (Taketani, 1991). L'arsenic peut s'associer avec les groupements thiols. Deux thiols rapprochés, formant des dithiols, sont souvent présents sur les sites de ligand des récepteurs, sur les sites actifs des enzymes, et sont même présent sur les composants du cytosquelette (Miller, 2002). Le TA inhibe la polymérisation GTP-dépendante des monomères de tubulines pour la formation des microtubules (Li, 1999). Finalement, le TA n'a pas une action ou une cible spécifique, mais plutôt agit de façon répandue sur plusieurs cibles causant des stress supplémentaires aux cellules. Les stress s'additionnant les cellules soumises à cet agent entrent en apoptose pour éviter de perdre le contrôle sur leur métabolisme.

Deuxième partie

Article

1.1 Résumé français de l'article

À cause du rôle et de l'implication de Syk dans la phagocytose des neutrophiles, et que les recherches qui ont portées sur l'activation des neutrophiles en réponse au trioxyde d'arsenic (TA) n'ont jamais été corrélées avec l'activation de Syk, nous avons décidé de vérifier l'activation de Syk en réponse au TA. Les neutrophiles fraîchement isolés de la circulation sanguine ont été utilisés comme source cellulaire et l'activation de Syk a été vérifiée par immunobuvardage. L'implication de Syk dans la phagocytose, la dégranulation et l'apoptose a été vérifiée par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique ainsi que par l'utilisation d'oligonucléotides antisens. Le TA augmente la phosphorylation de Syk et cette activation est réversible par l'ajout de piceatannol, un inhibiteur spécifique de Syk. De plus, le TA augmente la phagocytose et la dégranulation des neutrophiles par l'activation de Syk. Finalement, en utilisant les deux approches (inhibition pharmacologique et antisens) il a été possible de démontrer que Syk est impliqué dans l'apoptose spontanée et induite des neutrophiles. L'activation de Syk est une étape importante dans l'activation de cellules immunitaires primaires, telles que les neutrophiles, par le TA. Elle est impliquée dans une activation rapide et de longue durée. Ce nouveau mécanisme d'action du TA sur ces cellules de l'immunité innée ouvre la voie vers la possibilité de contrôler l'inflammation par le TA.

1.2 Article: *Syk is a novel target of arsenic trioxide (ATO) and is involved in ATO-induced human neutrophil functions.*

Accepté pour publication (In press) dans Toxicology In Vitro.

Syk is a novel target of arsenic trioxide (ATO) and is involved in ATO-induced human neutrophil functions.

Francis Antoine¹, Jamila Ennaciri¹, Denis Girard^{1*}

*¹Laboratoire de recherche en inflammation et physiologie des granulocytes,
Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Qc, Canada*

*Corresponding author

INRS-Institut Armand-Frappier

531 boul. des Prairies, Laval, QC, Canada

H7V 1B7

denis.girard@iaf.inrs.ca

Short title: Role of Syk in ATO-induced neutrophils

SUMMARY

Background and purpose: Due to the well-characterized role of Syk kinase in phagocytosis and because activation and involvement of Syk in response to ATO treatment has never been reported in any cells, we decided to determine whether or not Syk is a target of this drug.

Experimental approach: Human neutrophils were used as a cellular source and the activation of Syk was determined by immunoblotting. The role of Syk in ATO-induced neutrophil functions, including phagocytosis, degranulation and apoptosis, was investigated by pharmacological and/or antisense strategy approaches.

Key results: ATO increased phosphorylation of Syk in human neutrophils and this was reversed by piceatannol, a Syk-specific pharmacological inhibitor. In addition, we found that ATO increased the phagocytic ability of neutrophils and degranulation via Syk activation. Finally, using both pharmacological inhibition and cellular depletion of Syk via an antisense approach, we found that this kinase is also involved in apoptosis.

Conclusions and implications: Syk activation is an important step in the mode of action of ATO in mature immune cells such as neutrophils and is involved in rapid, intermediate and lengthy biological processes. This opens the possibility of using ATO for controlling inflammation.

Keywords: Apoptosis, phagocytosis, degranulation, anticancer drug, inflammation, neutrophils, Syk kinase

INTRODUCTION

Arsenic trioxide (As_2O_3 or ATO) is an anticancer drug used in the treatment of acute promyelocytic leukemia (Miller, 2002; Miller et al., 2002). There is increasing interest in expanding the use of ATO treatment to other types of cancers such as multiple myeloma, based on its ability to efficiently induce cell differentiation or apoptosis in many types of cancerous cells (Kajiguchi et al., 2006; Munshi et al., 2002). Most of the studies designed for elucidating the mode of action of ATO have been performed in cancer cell lines or in immature cancer cells isolated from patients. Recently, we have documented that ATO induced apoptosis in healthy primary mature human neutrophil cells, the final stage of promyelocyte maturation (Binet et al., 2006). We demonstrated that ATO induced apoptosis by caspase-, H_2O_2 - and protein synthesis-dependent mechanisms (Binet et al., 2006), and we identified annexin-1 and some heat-shock proteins as being among the proteins newly synthesized in ATO-induced neutrophils (Binet et al., 2008). However, using annexin-1 knockout mice, we discovered that this protein was associated to a heat shock-like response, rather than being involved in the proapoptotic activity of ATO. More recently, we reported that ATO is a wider neutrophil agonist than previously thought, since we found that it can modulate a variety of other neutrophil functions including phagocytosis, adhesion, migration and degranulation (Binet and Girard, 2008a). In addition, we demonstrated that activation of both p38 and the *c-Jun* amino-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein kinases (MAPKs), but not extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (Erk-1/2), is part of the mode of action of ATO in neutrophils.

Spleen tyrosine kinase (Syk) is a 72-kDa protein known to exert a central role in coupling immune recognition receptors to multiple downstream signaling pathways in different

hematopoietic cells (Girard et al., 1996; Mocsai et al., 2002; Sada et al., 2001; Zarbock et al., 2007). Once activated, Syk phosphorylates several substrates including PLC γ isoforms, Akt, and tubulins; and orchestrates a series of cellular responses such as proliferation, survival, migration and phagocytosis (Berton et al., 2005; Crowley et al., 1997; Majeed et al., 2001; Moon et al., 2005; Ratthe and Girard, 2004; Schymeinsky et al., 2005; Turner et al., 2000; Zarbock et al., 2007). In neutrophils, Syk is involved in a variety of functions including phagocytosis, adhesion, chemotaxis and transmigration (Berton et al., 2005; Kasper et al., 2006; Turner et al., 2000). The pleiotropic defects seen in mice lacking Syk confirm the importance of this kinase in general biology (Harnett, 1996; Mocsai et al., 2002). For example, studies with Syk-deficient murine PMNs revealed that this protein plays an indispensable role in β_2 integrin-mediated PMN functions such as respiratory burst and degranulation (Mocsai et al., 2002). Because of the importance of Syk in general neutrophil cell biology and given that we recently identified ATO as a novel potent neutrophil agonist, we decided to investigate the role of Syk in ATO-induced human neutrophils in order to better understand the mode of action of ATO. We found that ATO activated Syk in neutrophils and that the ability of the drug to induce phagocytosis, adhesion, degranulation and apoptosis occurs by a Syk-dependent mechanism.

METHODS

Neutrophil isolation. Neutrophils were isolated from venous blood from healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Inc., Quebec, Canada), as described previously (Ratthe and Girard, 2004). Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to institutionally approved procedures. Cell viability was monitored by trypan blue exclusion, and the purity (>98%) was verified by cytology from centrifuge preparations stained with Diff-Quick staining kit (Fisher Scientific, Ottawa, Canada). Cell viability was systematically evaluated before and after each treatment and mortality never exceeded 5%.

Cell culture. The human lung epithelial A549 cell line was purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). Cells were grown in RPMI-1640 (GIBCO BRL, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics.

Phosphorylation events. Neutrophils (40×10^6 cells/ml RPMI-HEPES-P/S) were stimulated with 5 μ M ATO for the indicated periods of time. In some cases, cells were pre-incubated for 45 min with the Syk inhibitor piceatannol at 10 or 30 μ M. Cells were lysed in 2X Laemmli's sample buffer, and aliquots corresponding to 1×10^6 cells were loaded onto 10% SDS-PAGE and transferred on polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were blocked for 1h at room temperature with Tris-buffered saline (TBS)-Tween containing 5% bovine serum albumin (BSA). After washing, the anti-phosphospecific Syk antibody, or the antibody directed against the corresponding unphosphorylated form was added at a final dilution of 1:1000 in TBS-Tween+ 5% BSA. The membranes were kept overnight at 4°C, washed with TBS-Tween and incubated for 1h at room temperature with rabbit anti-goat horseradish peroxidase (HRP) secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories) at 1:25000 in

TBS-Tween followed by several washes. Protein expression was revealed using an enhanced chemiluminescence Western Blot analysis detection system (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Phagocytosis. Sheep red blood cells (SRBCs) (Quelab, Montreal, Qc) were opsonized with a 1:200 dilution of rabbit IgG anti-SRBC antibody (Sigma) for 45 min at 37°C. Neutrophils (2×10^6 cells in RPMI-1640) pre-treated 15 min with the indicated agonists were incubated with 50×10^6 opsonized SRBCs for 30 min. The samples were centrifuged at 200g for 10 min at 4°C. Supernatants were discarded and osmotic shock was performed on the pellets by treatment with 300 μ l H₂O for 20 s, followed by addition of 4.5 ml of PBS. The samples were washed and the final pellets were suspended in 200 μ l of PBS. Phagocytosis was measured and expressed as the percentage of neutrophils ingesting at least one opsonized SRBC. IL-4 was used as a positive control (Girard et al., 1996).

Cell surface expression of granule markers. Cell surface expression of CD35 and CD66b was monitored for assessing degranulation of secretory or specific and gelatinase granules, respectively, by flow cytometry as previously published (Binet and Girard, 2008b). Non-specific binding of the antibodies was prevented by incubating the cells with PBS+20% autologous serum for 30 min on ice. After several washes, primary antibodies or an IgG₁ isotypic control antibody were added at a concentration of 0.5 μ g/ml for 30 min on ice. Cells were washed twice and incubated with 10 μ g/ml of FITC-conjugated goat anti-mouse secondary antibody for 30 min at 4°C. Analysis was performed with a FACScan (BD Biosciences).

Gelatin zymography. Neutrophils were incubated for 30 min under various conditions. Cells were then centrifuged at 13,000 rpm for 10 min and pellets were discarded. The supernatants (10 μ l corresponding to 0.1×10^6 cells) were mixed with a non-reducing buffer (40% glycerol, Tris-HCl 1M pH 6.8, SDS 8%) and run on 10% acrylamide gels containing 0.2% gelatin (Binet and Girard, 2008b). Gels were washed for 30 minutes twice with 2.5% Triton X-100 and incubated overnight in digestion buffer (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Gels were stained with Coomassie blue 0.1% and destained as described previously (Binet and Girard, 2008b).

Apoptosis. Freshly isolated human neutrophils (10×10^6 cells/ml suspension in RPMI 1640 supplemented with 10% autologous serum) were incubated for 24h in the presence or absence of the indicated agonist and apoptosis was evaluated by cytology as previously described (Girard et al., 1997). The results were expressed as the percentage of neutrophils in apoptosis.

Antisense experiments. PMNs (2×10^6 /ml) were incubated with a mixture of two Syk antisense oligonucleotides (ASO) previously used by others (Schymeinsky et al., 2005) (5'-CTCGGATCAGGAACTTTCCAT and 5'-CATGGAAACCTGATGAACCAG) or scrambled oligonucleotides (scr ODNs) (5'-TCGACA-AGTCGACTTTCATCG and 5'-GATGGAAACCTGCAGATACCA) with a phosphorothioate backbone (Operon Biotechnologies, Inc. Huntsville, AL) at a final concentration of 5 μ M each at 37°C in Opti-MEMI medium without serum for 6h, to increase uptake of the oligonucleotides. Subsequently, cells were cultured for 22h in Opti-MEMI medium supplemented with 5% heat-inactivated autologous serum in the presence or absence of ATO. Apoptosis was assessed as described previously and the level of Syk protein expression was verified by immunoprecipitation and immunoblotting.

RESULTS

Syk is activated by ATO in human neutrophil cells. In order to determine whether or not Syk was activated by ATO, we incubated freshly isolated human neutrophils with a clinically achievable concentration of ATO (5 μ M) known to be optimal in these cells (Binet et al., 2006; Binet et al., 2008) and verified the phosphorylation of Syk from 30 seconds to 60 min. As illustrated in **Fig. 1**, ATO induced rapid phosphorylation of Syk and this phosphorylation was maintained for a relatively long period of time (up to 140 min).

ATO enhances the ability of neutrophils to exert phagocytosis by a Syk-dependent mechanism.

We recently demonstrated that ATO enhanced the phagocytic ability of neutrophils. Because of the previous results indicating that Syk was activated by ATO, and given that this kinase is known to be involved in phagocytosis (Crowley et al., 1997), we then determined the role of Syk in ATO-induced neutrophil phagocytosis. Using a Syk pharmacological inhibitor, piceatannol, at a concentration that does not alter neutrophil cell physiology (Ratthe and Girard, 2004), the percentage of cells ingesting at least one SRBC significantly decreased from 34.8 ± 1.9 (mean \pm SEM, n=4) to $22.3 \pm 2\%$, a rate similar to the basal level of $20.4 \pm 1.6\%$ (**Fig. 2A**). As expected (Girard et al., 1996), IL-4 significantly enhanced the phagocytic ability of neutrophils ($31.0 \pm 3.5\%$). The role of Syk in ATO-induced cells was further demonstrated by the ability of piceatannol to reverse Syk phosphorylation (**Fig. 2B**).

Role of Syk in ATO-induced neutrophil degranulation. ATO was recently found to induce the degranulation of secretory and azurophil granules in human neutrophils (Binet and Girard, 2008b). To determine whether or not Syk was involved in ATO-induced degranulation, we first confirmed our previous data that ATO effectively increased the cell surface expression of CD35 and CD66b (**Fig. 3A** and **Fig. 3B**), respectively used for measuring degranulation of

secretory and specific and gelatinase granules (Binet and Girard, 2008b; Jog et al., 2007). Interestingly, treatment with piceatannol inhibited ATO-induced cell surface expression of both CD35 and CD66b but had no effect when used alone (Binet and Girard, 2008a). Because these results strongly suggested that degranulation products were released into the external milieu, we then verified gelatinase activity. Using the supernatants of ATO-induced neutrophils, we demonstrated that the gelatinase activity, as revealed by zymography, was reversed by piceatannol (Fig. 3C). Taken altogether, these results indicated that Syk was involved in ATO-induced neutrophil degranulation.

Involvement of Syk in ATO-induced neutrophil apoptosis. ATO is known to induce apoptosis in human neutrophils by a mechanism that is not fully understood (Binet et al., 2006; Binet et al., 2008). Therefore, to determine whether or not Syk was involved in the proapoptotic effect of ATO, we inhibited Syk with piceatannol, causing a decrease in the apoptotic rate from $72 \pm 11.6\%$ (mean \pm SEM, n=4) to $39.7 \pm 9.1\%$ (Fig. 4). The apoptotic rates were $41.9 \pm 2.0\%$ and 32.0 ± 4.25 for cells treated with the diluent or piceatannol alone, respectively.

Downregulation of Syk by antisense strategy demonstrates the importance of Syk in ATO-induced neutrophil cell physiology. To further support the role of Syk in ATO-induced neutrophils, we decided to use an antisense strategy in order to knockdown Syk expression, and then evaluated the ability of ATO to induce apoptosis. Because neutrophils are terminally mature non-dividing cells which undergo spontaneous apoptosis, it is not suitable to use an antisense strategy in these cells that would require several hours of incubation with oligonucleotides to evaluate rapid neutrophil functions such as phagocytosis or degranulation. Thus, we selected apoptosis as a meaningful process for the evaluation of the role of Syk in neutrophil cell physiology. As illustrated in Fig. 5A, the proapoptotic effect of ATO ($87.7 \pm$

2.1%, mean \pm SEM, n=7) was reversed by addition of Syk-ASO ($55.0 \pm 3.4\%$), whereas the addition of scr-ODN did not alter the proapoptotic effect of ATO ($80.4 \pm 2.1\%$). In addition to these experiments, we demonstrated, at the protein level, that the expression of Syk was markedly decreased when cells were treated with Syk-ASO but not when they were incubated without any oligonucleotides (**Fig. 5B**) or in the presence of scr-ODN (*data not shown*).

DISCUSSION AND CONCLUSION

ATO is known to induce cell differentiation and apoptosis via mitogen-activated protein kinases (MAPKs) activation in promyelocytes and cancer cells (Iwama et al., 2001; Potin et al., 2007; Ramos et al., 2006; Shim et al., 2002; Verma et al., 2002). We recently demonstrated that ATO activates p38 and *c-jun* NH₂-terminal (JNK) MAPK but not extracellular signal-regulated kinases-1/2 (Erk-1/2) in human neutrophils (Binet and Girard, 2008b). Interestingly, although activation of p38 and/or JNK was involved in the ability of ATO to enhance adhesion, migration, phagocytosis, release and activity of gelatinase and degranulation, its proapoptotic activity was not linked to MAPK activation.

In this study, we report for the first time that Syk is a novel target of ATO. Using human neutrophils, we demonstrated that ATO activated Syk, as judged by its ability to induce its phosphorylation. Interestingly, Syk was not only phosphorylated rapidly, but this phosphorylation was sustained for up to 140 min. In addition, ATO-induced Syk phosphorylation was reversed by treatment with piceatannol, a pharmacological inhibitor of Syk. Using this pharmacological approach, we demonstrated that Syk is part of the signaling events involved in ATO-induced neutrophil functions, including phagocytosis and degranulation. The role of Syk in neutrophil phagocytosis and degranulation is well-established (Abram and Lowell, 2007; Berton et al., 2005; Ortiz-Stern and Rosales, 2005; Raeder et al., 1999). In contrast, the involvement of Syk in neutrophil apoptosis is less understood and has been investigated more recently. One study reported that an IgM class anti-neutrophil cytoplasm antibody (ANCA) delayed human neutrophil apoptosis by a Syk-dependent mechanism (Hayes and Cambridge, 2004). More recently, we demonstrated that the ability of IL-4 to delay neutrophil apoptosis involved several cell signaling pathways, including Syk activation (Ratthe et al., 2007). Fudala and colleagues (2007), reported that Syk

is part of the cell signaling events involved in anti-IL-8:IL-8 immune complexes-induced suppression of human neutrophil apoptosis (Fudala et al., 2007). In addition, we also used an antisense strategy to establish the role of Syk in the proapoptotic activity of ATO. To our knowledge, this is the first time that the involvement of Syk in neutrophil cell apoptosis has been demonstrated by an approach other than the conventional use of the pharmacological inhibitor piceatannol. Interestingly, a similar strategy was used to demonstrate the role of Syk in the anti-apoptotic effect of the cytokine GM-CSF in eosinophils (Yousefi et al., 1996). Thus, the role of Syk in apoptosis appears to be both complex and also context-specific. On the one hand, Syk is involved in the antiapoptotic effect of different agents, including cytokines, ANCA and anti-IL-8:IL-8 immune complexes. In contrast, Syk is also implicated in the proapoptotic effect of ATO. Although we have shown the importance of Syk in ATO-induced neutrophil apoptosis, it is important to mention that the Syk signaling cascade is not the only event which contributes to the proapoptotic activity of ATO. We have previously demonstrated that induction of de novo protein synthesis (especially heat shock proteins), caspase activation and H₂O₂ production are all involved in ATO-induced apoptosis (Binet et al., 2006), and thus, the proapoptotic mode of action of ATO is complex (Binet et al., 2008).

It is important to note that the above experiments were conducted with mature non-dividing primary human neutrophils. The role of Syk in the proapoptotic effect of ATO in immature cancer cells is presently unknown and would need to be determined using a variety of cells of different cancer origin before drawing any conclusions. For the present purposes, the involvement of Syk in ATO-induced neutrophil apoptosis is of interest in inflammation, where neutrophils are known to be key players. Knowing that the resolution of inflammation can occur by phagocytosis of apoptotic neutrophils (Savill and Haslett, 1995; Walker et al., 2005; Ward et al., 1999), an activator of neutrophil apoptosis such as ATO represents an

interesting potential drug to control inflammation. Moreover, we demonstrate here that, in neutrophils, ATO activates Syk. Inhibition of this kinase represents an interesting avenue of research for the development and/or amelioration of treatment for asthma, allergic rhinitis, pulmonary inflammation and autoimmune diseases (Masuda and Schmitz, 2008; Stenton et al., 2000; Stenton et al., 2002; Wong et al., 2004; Wong and Leong, 2004).

Given the central role of neutrophils in inflammation, and the role of ATO in regulation of several important neutrophil processes, including apoptosis, we believe that ATO may have clinical implications in the treatment of inflammatory diseases. We have previously proposed a model of activation of ATO in human neutrophils, in which ATO induces two phenomena: 1) rapid activation of MAPKs involved in neutrophil processes and 2) longer term activation that is multiparametric but is independent of MAPKs resulting in apoptosis (Binet et al., 2006). Here we provide evidence that Syk activation is an important step in the signaling events involved in ATO-induced neutrophils (Fig. 6). We have refined our initial model by including the role of Syk in both rapid and long-term activation biological processes since, unlike p38 and JNK MAPKs, Syk is not only involved in neutrophil phagocytosis and degranulation, but also in apoptosis, as demonstrated using a pharmacological inhibition and antisense strategy approaches.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

- Abram CL, Lowell CA (2007). Convergence of immunoreceptor and integrin signaling. *Immunol Rev* **218**: 29-44.
- Berton G, Mocsai A, Lowell CA (2005). Src and Syk kinases: key regulators of phagocytic cell activation. *Trends Immunol* **26**: 208-214.
- Binet F, Cavalli H, Moisan E, Girard D (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. *Br J Haematol* **132**: 349-58.
- Binet F, Chiasson S, Girard D (2008). Arsenic trioxide induces de novo protein synthesis of annexin-1 in neutrophils: association with a heat shock-like response and not apoptosis. *Br J Haematol* **140**: 454-463.
- Binet F, Girard D (2008a). Novel human neutrophil agonistic properties of arsenic trioxide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and/or c-jun NH2-terminal MAPK but not extracellular signal-regulated kinases-1/2. *J Leukoc Biol* **84**: 1613-1622.
- Crowley MT, Costello PS, Fitzer-Attas CJ, Turner M, Meng F, Lowell C, et al. (1997). A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc γ receptors on macrophages. *J Exp Med* **186**: 1027-1039.
- Fudala R, Krupa A, Matthay MA, Allen TC, Kurdowska AK (2007). Anti-IL-8 autoantibody:IL-8 immune complexes suppress spontaneous apoptosis of neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**: L364-L374.
- Girard D, Paquet ME, Paquin R, Beaulieu AD (1996). Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton

rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood* **88**: 3176-3184.

Girard D, Paquin R, Beaulieu AD (1997). Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem J* **325 (Pt 1)**: 147-153.

Harnett M (1996). Syk deficiency--a knockout for B-cell development. *Immunol Today* **17**: 4.

Hayes MJ, Cambridge G (2004). An IgM class anti-neutrophil cytoplasm antibody inhibits neutrophil adhesion and apoptosis via a Syk dependent signaling cascade. *Mol Immunol* **41**: 457-468.

Iwama K, Nakajo S, Aiuchi T, Nakaya K (2001). Apoptosis induced by arsenic trioxide in leukemia U937 cells is dependent on activation of p38, inactivation of ERK and the Ca²⁺-dependent production of superoxide. *Int J Cancer* **92**: 518-526.

Jog NR, Rane MJ, Lominadze G, Luerman GC, Ward RA, McLeish KR (2007). The actin cytoskeleton regulates exocytosis of all neutrophil granule subsets. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**: C1690-C1700.

Kajiguchi T, Yamamoto K, Iida S, Ueda R, Emi N, Naoe T (2006). Sustained activation of c-jun-N-terminal kinase plays a critical role in arsenic trioxide-induced cell apoptosis in multiple myeloma cell lines. *Cancer Sci* **97**: 540-545.

Kasper B, Brandt E, Ernst M, Petersen F (2006). Neutrophil adhesion to endothelial cells induced by platelet factor 4 requires sequential activation of Ras, Syk, and JNK MAP kinases. *Blood* **107**: 1768-1775.

Majeed M, Cavegion E, Lowell CA, Berton G (2001). Role of Src kinases and Syk in Fc γ receptor-mediated phagocytosis and phagosome-lysosome fusion. *J Leukoc Biol*

70: 801-811.

Masuda ES, Schmitz J (2008). Syk inhibitors as treatment for allergic rhinitis. *Pulm Pharmacol Ther* **21**: 461-467.

Miller WH Jr (2002). Molecular targets of arsenic trioxide in malignant cells. *Oncologist* **7 Suppl 1**: 14-19.

Miller WH Jr, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S (2002). Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res* **62**: 3893-3903.

Mocsai A, Zhou M, Meng F, Tybulewicz VL, Lowell CA (2002). Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity* **16**: 547-558.

Moon KD, Post CB, Durden DL, Zhou Q, De P, Harrison ML et al. (2005). Molecular basis for a direct interaction between the Syk protein-tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* **280**: 1543-1551.

Munshi NC, Tricot G, Desikan R, Badros A, Zangari M, Toor A et al. (2002). Clinical activity of arsenic trioxide for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia* **16**: 1835-1837.

Ortiz-Stern A, Rosales C (2005). Fc gammaRIIIB stimulation promotes beta1 integrin activation in human neutrophils. *J Leukoc Biol* **77**: 787-799.

Potin S, Bertoglio J, Breard J (2007). Involvement of a Rho-ROCK-JNK pathway in arsenic trioxide-induced apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells. *FEBS Lett* **581**: 118-124.

Raeder EM, Mansfield PJ, Hinkovska-Galcheva V, Shayman JA, Boxer LA (1999). Syk activation initiates downstream signaling events during human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis. *J Immunol* **163**: 6785-6793.

- Ramos AM, Fernandez C, Amran D, Esteban D, de Blas E, Palacios MA et al. (2006). Pharmacologic inhibitors of extracellular signal-regulated kinase (ERKs) and c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) decrease glutathione content and sensitize human promonocytic leukemia cells to arsenic trioxide-induced apoptosis. *J Cell Physiol* **209**: 1006-1015.
- Ratthe C, Girard D (2004). Interleukin-15 enhances human neutrophil phagocytosis by a Syk-dependent mechanism: importance of the IL-15Ralpha chain. *J Leukoc Biol* **76**: 162-168.
- Ratthe C, Pelletier M, Chiasson S, Girard D (2007). Molecular mechanisms involved in interleukin-4 (IL-4)-induced human neutrophils: expression and regulation of suppressor of cytokine signaling (SOCS). *J Leukoc Biol* **81**: 1287-1296.
- Sada K, Takano T, Yanagi S, Yamamura H (2001). Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J Biochem* **130**: 177-186.
- Savill J, Haslett C (1995). Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. *Semin Cell Biol* **6**: 385-393.
- Schymeinsky J, Then C, Walzog B (2005). The non-receptor tyrosine kinase Syk regulates lamellipodium formation and site-directed migration of human leukocytes. *J Cell Physiol* **204**: 614-622.
- Shim MJ, Kim HJ, Yang SJ, Lee IS, Choi HI, Kim T (2002). Arsenic trioxide induces apoptosis in chronic myelogenous leukemia K562 cells: possible involvement of p38 MAP kinase. *J Biochem Mol Biol* **35**: 377-383.
- Stenton GR, Kim MK, Nohara O, Chen CF, Hirji N, Wills FL et al. (2000). Aerosolized Syk antisense suppresses Syk expression, mediator release from macrophages, and pulmonary inflammation. *J Immunol* **164**: 3790-3797.

Stenton GR, Ulanova M, Dery RE, Meřani S, Kim MK, Gilchrist M et al. (2002). Inhibition of allergic inflammation in the airways using aerosolized antisense to Syk kinase. *J Immunol* **169**: 1028-1036.

Turner M, Schweighoffer E, Colucci F, Di Santo JP, Tybulewicz VL (2000). Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol Today* **21**: 148-154.

Verma A, Mohindru M, Deb DK, Sassano A, Kambhampati S, Ravandi F et al. (2002). Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to arsenic trioxide. *J Biol Chem* **277**: 44988-44995.

Walker A, Ward C, Taylor EL, Dransfield I, Hart SP, Haslett C et al. (2005). Regulation of neutrophil apoptosis and removal of apoptotic cells. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **4**: 447-454.

Ward C, Dransfield I, Chilvers ER, Haslett C, Rossi AG (1999). Pharmacological manipulation of granulocyte apoptosis: potential therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* **20**: 503-509.

Wong BR, Grossbard EB, Payan DG, Masuda ES (2004). Targeting Syk as a treatment for allergic and autoimmune disorders. *Expert Opin Investig Drugs* **13**: 743-762.

Wong WS, Leong KP (2004). Tyrosine kinase inhibitors: a new approach for asthma. *Biochim Biophys Acta* **1697**: 53-69.

Yousefi S, Hoessli DC, Blaser K, Mills GB, Simon HU (1996). Requirement of Lyn and Syk tyrosine kinases for the prevention of apoptosis by cytokines in human eosinophils. *J Exp Med* **183**: 1407-1414.

Zarbock A, Lowell CA, Ley K (2007). Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-

induced alpha(L)beta(2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1.
Immunity 26: 773-783.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *ATO induces phosphorylation of Syk in human neutrophils.* Freshly isolated human neutrophils (10×10^6 cells/ml) were incubated in the presence or absence of $5 \mu\text{M}$ ATO for the indicated periods of time and the expression of tyrosine phosphorylated Syk (P-Syk) protein was assessed by western blot as described in Methods. The membranes were then stripped and probed with antibody directed against the corresponding non-phosphorylated form of Syk. Inset, cells were incubated in the presence of buffer (C), 100 ng/ml IL-4 (a positive control), or ATO. Results are from one representative experiment out of three.

Figure 2. *ATO enhances neutrophil phagocytosis by a Syk-dependent mechanism.* (A) Freshly isolated human neutrophils (4×10^6) were pre-treated or not with $10 \mu\text{M}$ piceatannol (pic) for 45 min. Then, cells were incubated in the presence of buffer (Ctrl), 100 ng/ml IL-4, or $5 \mu\text{M}$ ATO for 30 min prior to incubation with 20×10^6 opsonized SRBCs for 45 min. Phagocytosis was measured as percentage of neutrophils ingesting at least one opsonized SRBC. Results are means \pm SEM ($n=3$). $*p \leq 0.05$ vs Ctrl. (B) Neutrophils, (10×10^6 cells/ml) were treated with piceatannol as above, and incubated with buffer (Ctrl) or ATO ($5 \mu\text{M}$) for 20 min and the expression of the phosphorylated form of Syk (P-Syk) was assessed by western blot as described in Methods. Then, membranes were stripped and probed with antibody directed against the nonphosphorylated form of Syk to verify equivalent protein loading. Results are from one representative experiment out of three.

Figure 3. *ATO induces degranulation and gelatinase activity in neutrophils.* Cells were pre-incubated with buffer or piceatannol (pic) for 30 min and then with buffer (Ctrl) or ATO ($5 \mu\text{M}$) for an additional 30 min. The release of two subset types of granules was evaluated by

flow cytometry by monitoring cell surface expression of CD35 (secretory granules) or CD66b (azurophilic granules) as described in Methods. A, typical results obtained by FACS analysis for both markers are shown. Iso, isotypic control antibody; grey line, ATO; black line, expression of CD35 (left) or CD66b (right) obtained with piceatannol treatment. Note the overlapping results obtained with control cells (Ctrl) pre-treated with buffer instead of piceatannol. B, results (means \pm SEM, n=6) were plotted to perform bar graphs. *, $p \leq 0.05$ vs ctrl. C, cells were treated as in A and extracellular release of gelatinase (or MMP-9) was evaluated using gelatin zymography as described in Methods. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) was used as a positive control at a concentration of 100 ng/mL.

Figure 4. *Piceatannol reversed the proapoptotic effect of ATO in neutrophils.* Neutrophils (10×10^6 cells/ml) pre-treated with buffer or piceatannol (pic) for 30 min were incubated in the presence of buffer (Ctrl) or 5 μ M ATO and apoptosis was evaluated as described in Methods. Results (means \pm SEM, n=4) are expressed as percentage of cells in apoptosis. *, $p \leq 0.05$ vs ctrl.

Figure 5. *Utilization of an antisense strategy to demonstrate the role of Syk in ATO-induced neutrophil apoptosis.* A, cells (2×10^6 /ml) were treated with or without 5 μ M Syk-ASO or Scr-ODN for 6 hours in Opti-MEM1 as described in Methods. Cells were then stimulated with or without 5 μ M ATO for 20h in the presence of 5% heat-inactivated autologous serum. After this incubation, apoptosis was evaluated by cytology. Results are expressed as means \pm SEM (n=7). B, the efficiency of Syk-ASO was verified by immunoprecipitation followed by immunoblotting with the anti-Syk antibody. IgG heavy chains (IgH) demonstrated equivalent loading.

Figure 6. *Proposed model of ATO activation in human neutrophils.* ATO enters the cells via aquaporin (AQP9). After a relatively short period of time, p38 and JNK, but not Erk-1/2 MAPKs, are activated. In parallel, ATO activates Syk rapidly for a prolonged period of time. These three kinases are involved in several neutrophil functions. However, p38 and JNK MAPKs are not involved in the proapoptotic effect of ATO. In contrast, Syk is involved in ATO-induced human neutrophil apoptosis since a specific inhibitor of Syk, piceatannol, inhibits the effect of ATO. Moreover, cellular depletion of Syk using antisense oligonucleotides reverses its proapoptotic effect. In addition to activation of p38, JNK and Syk, the proapoptotic effect of ATO is dependent upon de novo protein synthesis, caspase activation and H₂O₂ production, since ATO-induced neutrophil apoptosis is reversed by: *i*) cycloheximide (a potent protein synthesis inhibitor); *ii*) z-VAD-fmk (a pan caspase inhibitor); and *iii*) catalase (an inhibitor of H₂O₂) (Binet and Girard, 2008a).

Figure 1

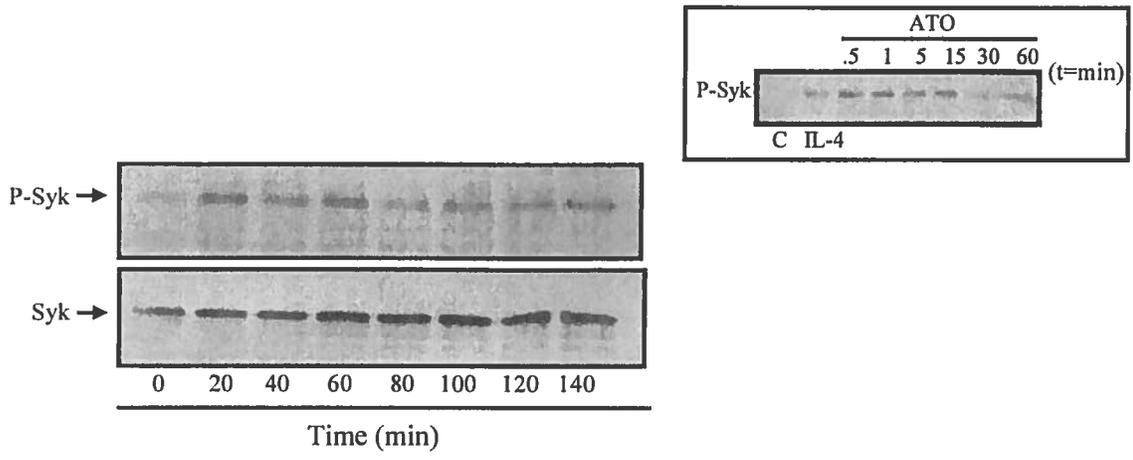


Figure 2

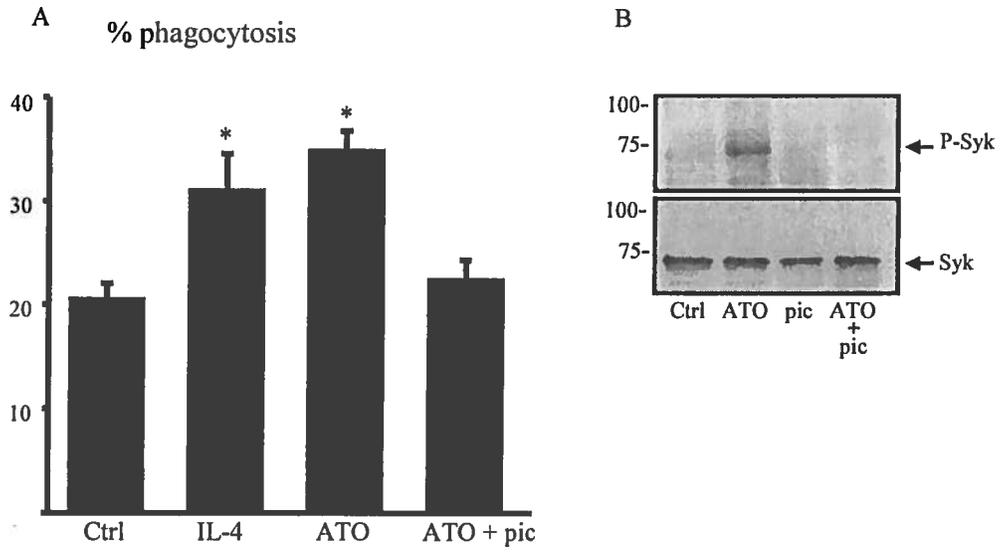


Figure 3

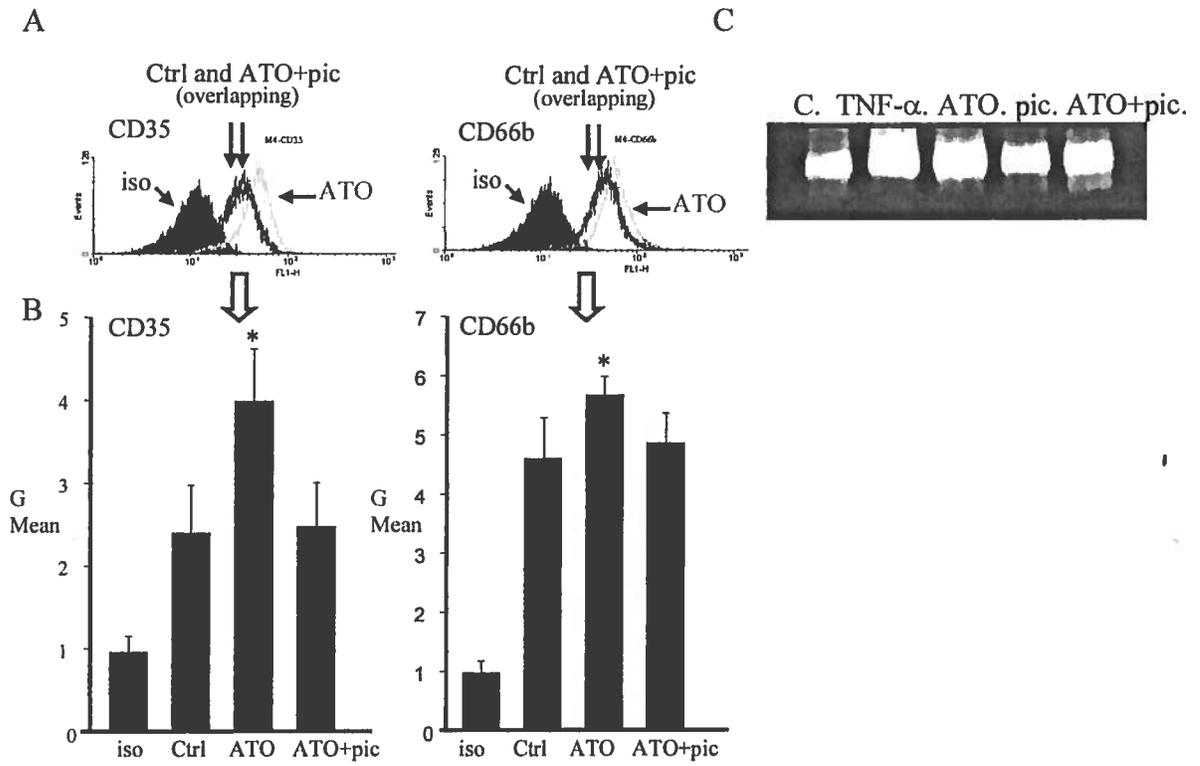


Figure 4

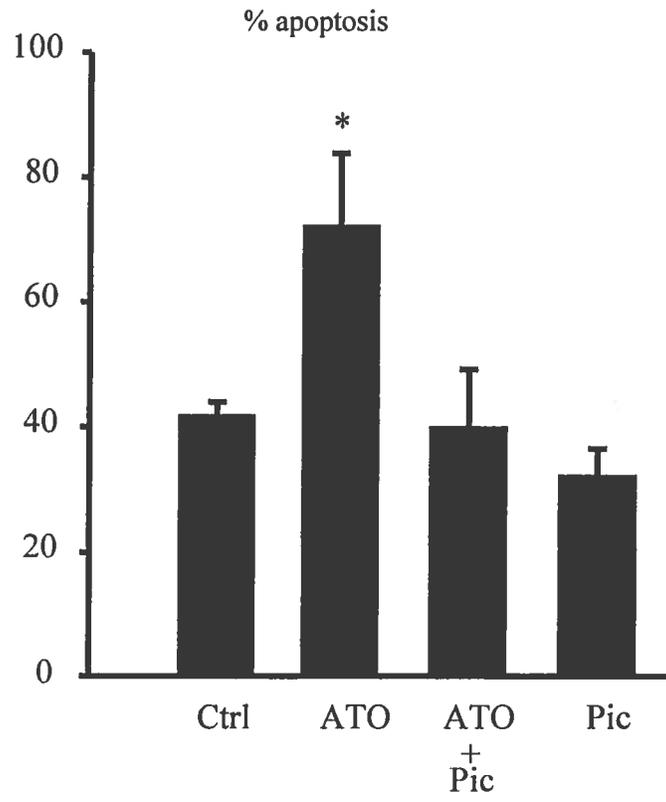


Figure 5

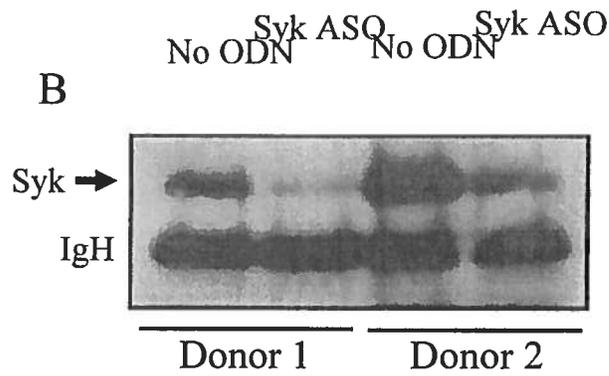
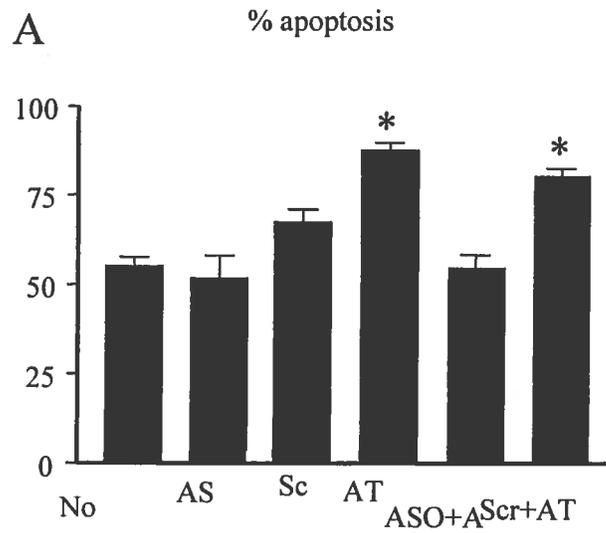
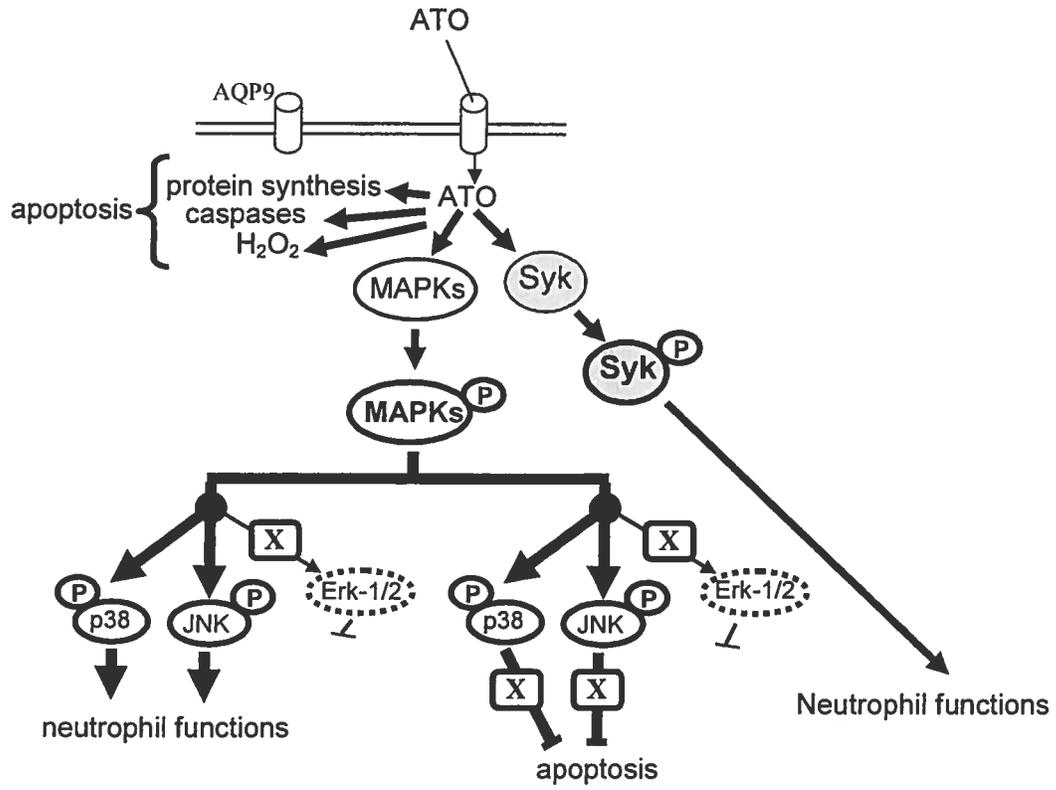


Figure 6



Troisième partie

Discussion/Conclusion

Le trioxyde d'arsenic (TA) est une nouvelle molécule utilisée dans le traitement de cancers, plus particulièrement la leucémie promyélocytaire aiguë. Cette molécule induit la différenciation et l'apoptose des cellules cancéreuses à faible et à moins faible dose respectivement (0,1 à 5 μM). Le TA est dès lors beaucoup étudié pour ses activités pro-apoptotiques chez les cellules tumorales, par contre on ne connaît pas encore pleinement ses activités pro-apoptotiques sur des cellules primaires comme les neutrophiles. Récemment, il a été démontré que le TA induit l'apoptose des neutrophiles par un mécanisme dépendant de la synthèse de novo des protéines et de la production d' H_2O_2 (Binet, 2006). En plus de ses effets pro-apoptotiques sur les neutrophiles, le TA est capable d'activer des fonctions biologiques importantes dépendantes des MAP kinases p38 et JNK comme la phagocytose, la dégranulation, l'adhésion et la migration (Binet, 2008). Avec l'approche des inhibiteurs spécifiques pour étudier les mécanismes qui sous-tendent les fonctions biologiques, il a été possible de trouver une autre kinase impliquée dans l'activation des neutrophiles par le TA, la tyrosine kinase Syk. À la lumière des résultats montrant l'implication des MAP kinases dans les fonctions biologiques des neutrophiles, on a voulu déterminer si la protéine kinase Syk, une kinase qui est classiquement connue pour être impliquée dans la phagocytose et d'autres fonctions hématopoïétiques, est activée. Cette étude est la première à démontrer que Syk est une cible du TA. Montré par immunobuvardage, Syk est phosphorylée à son site actif (Tyr-525/526) très rapidement et cette phosphorylation est maintenue jusqu'à deux heures après l'ajout de TA. Ceci suggère une activation rapide des voies de signalisation ainsi que leur persistance dans le temps. Sachant que Syk activée est recrutée à la membrane plasmique et que son activation est très rapide, ceci, parmi d'autres, serait un point de départ de l'activation des neutrophiles par le TA. Il est difficile d'expliquer avec certitude le mécanisme d'activation de Syk parce que cette kinase est classiquement activée par des motifs ITAMs et que le TA n'est pas connu pour agir via des récepteurs. Le TA pénètre dans la cellule via des canaux. Ces canaux, les aquaglycéroporines (plus particulièrement AQP9) sont les plus susceptibles de laisser entrer le TA car leur surexpression amplifie l'effet du TA (Shinkai, 2009). Il est donc essentiel d'imaginer un mécanisme d'activation de Syk par le TA ne requérant pas de récepteurs ni de motif ITAM. Le mécanisme le plus probable est l'inhibition d'une phosphatase inhérente à Syk. D'ailleurs, les dérivés de l'arsenic et le TA sont connus pour inhiber des phosphatases impliquées dans la signalisation et le métabolisme cellulaire

ainsi que dans la transcription des gènes dépendants du facteur de transcription AP-1 (Miller, 2002 ; Chen, 2000). Donc, sachant que le TA inhibe les phosphatases, qu'il pénètre dans la cellule via des canaux et qu'il ne possède pas de récepteur, il est très envisageable de penser que Syk est activée par un mécanisme impliquant l'inhibition d'une phosphatase constitutive de Syk, la plus probable, SHP-1. SHP-1 est la phosphatase de premier choix puisque cette dernière est connue pour interagir avec ZAP-70, un homologue de Syk (Sada, 2001). Finalement, pour mieux connaître l'implication de Syk au niveau de la signalisation cellulaire, il serait intéressant de vérifier l'activation des MAP kinases p38 et JNK suite à l'inhibition de Syk par le piceatannol et ainsi confirmer la dépendance de Syk dans l'activation des MAP kinases. Il serait aussi très intéressant de mener des études d'interactions protéines-protéines en faisant des immunoprécipitations de Syk et de vérifier les protéines qui coprécipitent avec Syk avant et après son activation.

Après avoir montré l'activation de Syk par le TA, il est devenu intéressant de vérifier son implication dans les fonctions biologiques induites par le TA. Tout d'abord, il est essentiel de vérifier que l'activation de Syk par le TA est réversible, et pour ce faire un inhibiteur spécifique, le piceatannol, a été utilisé. Montré par immunobuvardage, le piceatannol utilisé à une concentration (10 μ M) n'affectant pas le métabolisme normal des neutrophiles est capable de renverser l'activation de Syk par le TA. Par contre, pour pleinement inhiber Syk, il est essentiel de laisser entrer le piceatannol dans la cellule et donc une pré-incubation de 45 minutes est nécessaire. L'ajout de TA sur les cellules prétraitées par le piceatannol n'activait plus Syk, et ce, même après de longue période de temps laissant croire que le piceatannol ne se dégrade pas dans la cellule et que l'inhibition de Syk est soutenue. Étant donné qu'il est possible d'empêcher l'activation de Syk, il devient impératif de montrer son implication dans les fonctions biologiques induites par le TA. La première des fonctions choisies est la phagocytose. Ici, la phagocytose est dépendante des récepteurs Fc γ puisque les particules à phagocyter (globules rouges de moutons (SRBC)) sont opsonisées par des anticorps. La phagocytose dépendante des récepteurs Fc γ requiert Syk, mais surtout son activation car l'inhibition de Syk par le piceatannol renverse la phagocytose induite par le TA passant de $34,8 \pm 1,9$ % (moyenne \pm écart moyen, n = 4) à $22,3 \pm 2$ %, un taux similaire à celui des neutrophiles non-traités de $20,4 \pm 1,6$ %. Comme contrôle positif, IL-4 a été utilisé et augmente de façon significative la phagocytose avec un pourcentage de $31,0 \pm 3,5$ % de neutrophiles ayant phagocyté au moins un SRBC. L'inhibition de Syk par un inhibiteur spécifique a démontré avec succès l'implication de cette kinase dans l'induction de la

phagocytose par le TA. Il est donc clair que Syk est essentiel dans la phagocytose des neutrophiles par les récepteurs Fcγ, mais le mécanisme précis par lequel ce processus est amplifié par le TA n'est pas facilement explicable. Par contre, depuis que Syk est activée par le TA et que la phagocytose induite par le TA est presque totalement renversée par le piceatannol, il est envisageable de croire que le TA amplifie la phagocytose des neutrophiles par un mécanisme qui ne dépendrait que de l'activation de Syk. En fait, Syk est le précurseur des événements de signalisations précoces qui prennent place au début de la phagocytose. Son activation mène à la production de diacylglycérol (DAG) et d'inositol triphosphate (IP₃), deux éléments essentiels à la phagocytose. L'inhibition de la phagocytose par le piceatannol peut être renversée par l'ajout de DAG (Raeder, 1999) ce qui signifie l'importance de Syk dans la transduction du signal de phagocytose vers les phospholipases et IP-3 kinase.

Il a été démontré récemment que le TA induit la dégranulation des granules sécrétoires et azurophiles des neutrophiles (Binet, 2008). Tout comme pour la phagocytose nous désirions savoir si Syk est impliquée dans la dégranulation induite par le TA. En utilisant le piceatannol, il a été possible de montrer que Syk est effectivement requis pour la dégranulation des granules sécrétoires et secondaires. Par cytométrie de flux, il est possible de vérifier la présence et la quantité de marqueurs spécifiques pour chaque type de granules présents chez les neutrophiles. Premièrement, il a été confirmé que le TA induisait bel et bien l'augmentation des marqueurs CD35 et CD66b, et non CD63, à la surface des neutrophiles. Ces marqueurs sont respectivement spécifiques aux granules sécrétoires, secondaires et azurophiles. Il est intéressant de noter que le TA n'induit pas la dégranulation de tous les types de granules. Une des explications possibles est que l'expérience se fait sur un traitement de 30 minutes avec le TA. Ce temps court ne permet peut-être pas à tous les granules de dégranuler. De ce point de vue, il existerait des mécanismes de régulations pour empêcher une dégranulation excessive. Ceci ne permettrait une dégranulation complète que lors de longues stimulations. Cette technique par cytométrie de flux permet de vérifier la présence de marqueurs à la surface des neutrophiles, mais ne prouve pas si le contenu du granule est bel et bien libéré dans le milieu et ne donne aucune indication sur l'activité enzymatique de ces derniers. Les granules des neutrophiles contiennent des enzymes qui dégradent la matrice extracellulaire. Une de ces enzymes est la gélatinase (MMP-9). Il est possible de vérifier la présence de cette activité enzymatique dans le milieu (surnageant) par zymographie. Dans un premier temps, il a été montré la présence d'activité enzymatique découlant de la dégranulation induite par le TA. Dans un second temps, il a été possible de montrer

l'implication de Syk dans cette dégranulation induite car l'ajout de piceatannol inhibait l'action du TA et ramenait l'activité enzymatique à la valeur de base sans stimulation. Ces derniers résultats de phagocytose et de dégranulation renversés par le piceatannol suggèrent un mécanisme commun à ces deux phénomènes amplifiés par le TA. D'un côté la phagocytose : l'internalisation d'une particule opsonisée ; et de l'autre la dégranulation : l'externalisation d'une particule vésiculaire. Les deux phénomènes ne sont pas si différents dans leur essence puisqu'au final on observe le déplacement d'une particule d'un compartiment à un autre. La réorganisation du cytosquelette amenant la fusion des membranes est un processus essentiel dans ce phénomène (Faurischou, 2003). À la lumière des résultats obtenus, il est logique de croire que Syk exerce un rôle dans ce processus. Soit que Syk exerce un rôle direct en formant des complexes avec le cytosquelette ou bien qu'elle exerce un rôle indirect en phosphorylant et activant des protéines qui viennent opérer ce processus. Une des cibles les plus probables de Syk dans la formation de complexes avec le cytosquelette, est le facteur d'échange de GTP, Vav. Ce dernier enzyme joue un rôle dans la réorganisation des filaments d'actine dépendant des petites GTPases de la famille Rho (Abram, 2007). Aussi, Syk possède en lui-même des domaines SH2 qui, potentiellement, peuvent interagir avec les motifs ITAM des protéines du cytosquelette, et de cette façon intervenir directement sur la réorganisation de ce dernier. Finalement, il a été possible de montrer que Syk est une kinase très fortement impliquée dans l'activation du neutrophile par le TA, notamment au niveau de la phagocytose et de la dégranulation, car l'inhibition de cette dernière renverse totalement l'induction de ces phénomènes par le TA.

Le rôle de Syk dans l'apoptose n'est que très peu étudié. Pour étudier l'implication de Syk au niveau de l'apoptose induite par le TA, une approche autre que l'inhibition pharmacologique a été utilisée. Cette approche est celle de la déplétion de Syk par des nucléotides antisens. Cette approche par les nucléotides antisens ne peut pas être utilisée pour vérifier l'implication de Syk au niveau des autres fonctions biologiques car la durée de vie des neutrophiles est trop courte et la stratégie de déplétion par les nucléotides antisens requiert de trop longues incubations. Malgré tout, il a été possible de vérifier l'impact de Syk au niveau de l'apoptose par cette stratégie et il s'est avéré qu'effectivement Syk est impliquée. Dans un premier temps, l'inhibition pharmacologique de Syk par le piceatannol est capable de renverser l'apoptose induite par le TA passant de $72 \pm 11,6$ % (moyenne \pm SEM, $n = 4$) à $39,7 \pm 9,1$ %, un taux d'apoptose similaire à celui de base des neutrophiles non stimulés de $41,9 \pm 2$ %. L'ajout de piceatannol seul fait baisser le taux d'apoptose de base à $32,0 \pm 4,3$ %. Ces

résultats démontrent clairement l'implication de Syk dans l'apoptose induite et spontanée du neutrophile, même si du côté de l'apoptose spontanée l'effet observé est moins spectaculaire. Dans un deuxième temps, l'approche des nucléotides antisens a donné un résultat semblable. L'apoptose induite par le TA est passée de $87,7 \pm 2,1$ % (moyenne \pm SEM, $n = 7$) à $55,0 \pm 3,4$ % avec l'ajout de nucléotides antisens. L'apoptose induite par le TA n'a pu être renversée de façon significative, par l'ajout de nucléotides de séquence aléatoire contrôles, restant à $80,4 \pm 2,1$ %. En addition à la vérification du taux d'apoptose par cytologie, il a été montré au niveau protéique que Syk a bel et bien été déplété. Ceci démontre bien que Syk est impliquée dans l'apoptose spontanée et induite du neutrophile. Malgré l'importance apparente de Syk dans l'apoptose du neutrophile, il est de rigueur de mentionner que la signalisation de Syk n'est pas le seul événement découlant de l'activité pro-apoptotique du TA. Les effets pro-apoptotiques du TA s'exercent par la voie intrinsèque en modifiant le statut redox (Binet, 2006) et par la voie du réticulum endoplasmique en induisant le mauvais repliement des protéines (Ramadan, 2009). Dans ce cas-ci l'inhibition de Syk, par les deux stratégies, a permis de démontrer pour la première fois l'importance de cette kinase dans une fonction générale du neutrophile autre que la phagocytose, la dégranulation, la migration, l'adhésion ou l'activation par les immunorécepteurs. Les MAP kinases p38 et JNK n'étant pas impliquées dans l'apoptose, mais bien dans les autres fonctions (phagocytose et dégranulation), il est désormais possible d'élargir encore plus la vision de la protéine kinase Syk et son rôle dans les cellules immunitaires. Syk jouerait un rôle dans leurs propriétés effectrices, mais aussi dans leurs propriétés régulatrices. D'ailleurs, de nouveaux traitements par inhibition pharmacologique visent Syk dans des maladies inflammatoires comme l'asthme, les rhinites allergiques, les inflammations pulmonaires et les maladies auto-immunes (Masuda, 2008 ; Stenton, 2002 ; Wong, 2004).

Avec les récentes études portées sur l'action du TA sur les neutrophiles, il a été possible de proposer un modèle. Ce modèle n'est que partiel, mais traduit pour l'instant les événements connus qui prennent place dans les neutrophiles lors de leurs stimulations par le TA. Ce modèle propose une entrée du TA par des canaux présents dans la membrane plasmique des neutrophiles, les aquaglycéroporines (AQP9). Dès son entrée dans la cellule le TA peut venir interagir avec les groupements thiols et dithiols présents sur les protéines qui contiennent des cystéines. Peut-être qu'à ce niveau, lors de ses interactions avec les cystéines de une ou plusieurs protéines, le TA pourrait venir mimer l'activation des immunorécepteurs qui serait suivit de l'activation de Syk. Peut-être aussi que le TA se chargerait d'inhiber des

phosphatases à cystéine, présentes sous la surface de la membrane plasmique, interagissant avec les immunorécepteurs et leur ITAMs, favorisant une «désinhibition» de ces derniers et qui serait suivit de l'activation de Syk. Ces dernières hypothèses sont à l'origine du questionnement entourant l'activation de Syk par le TA. Peut-être finalement que le TA viendrait directement agir sur Syk, induisant un changement de conformation qui favoriserait la venue et le maintien de son activation. À long terme le TA induit l'apoptose des neutrophiles par un mécanisme qui dépend de la production d' H_2O_2 , de l'activation des caspases et de la synthèse de novo des protéines. La production d' H_2O_2 n'a pas encore été imputée à quelque mécanisme que ce soit à l'heure actuelle, mais il serait très intéressant de vérifier l'implication de Syk dans ce processus, puisqu'il est désormais connu que Syk est impliqué dans l'apoptose du neutrophile. L'activation des caspases est le point culminant de l'induction de l'apoptose, mais leurs mécanismes d'activation ne sont pas encore tout à fait élucidés et pourraient en impliquer plusieurs en parallèles. Une fois de plus, il serait intéressant de vérifier l'importance de Syk dans l'activation des caspases. Finalement, la synthèse de novo des protéines semble être un facteur déterminant dans l'induction de l'apoptose par le TA car l'inhibition de la synthèse protéique par la cycloheximide renverse l'apoptose des neutrophiles. De ces protéines, des chaperones ont été identifiées, dont l'annexine-1 et la HSP90 α (Binet, 2008). Ceci suggère la présence de protéines mal repliées. D'ailleurs, le TA est connu pour empêcher un bon repliement des protéines durant leur synthèse dans le réticulum endoplasmique (Ramadan, 2008). Une observation faite au laboratoire est l'apparition de protéines avec de nouveaux points isoélectriques, et ceci pourrait être dû à ce mauvais repliement des protéines causé par le TA. Le repliement des protéines est dirigé en partie par la formation de ponts disulfure. Or il se trouve que les cystéines qui y participent sont les cibles du TA. De cette façon le TA pourrait influencer la charge et la forme des protéines. Ceci devient donc un stress supplémentaire que la cellule doit gérer, en plus de la production de ROS et de l'activation des MAP kinases. C'est pourquoi, à l'heure actuelle, l'apoptose induite par la voie du réticulum endoplasmique est une nouvelle voie d'investigation dans le laboratoire. Des résultats récents confirment que le TA induit un stress du réticulum endoplasmique (Binet, 2009), mais pour l'instant aucun lien avec Syk n'a été trouvé. Il a été mentionné que Syk est impliqué dans l'apoptose induite et spontanée des neutrophiles, mais aucune voie particulière ne lui a été décernée jusqu'à maintenant. Néanmoins, il est possible que Syk joue un rôle dans l'induction de l'apoptose par la voie intrinsèque via la production d' H_2O_2 car il est connu que la production de H_2O_2 durant l'adhésion est dépendante de Syk (Fernandez, 1998). Il serait aussi possible que Syk

exerce un rôle dans l'induction de l'apoptose par la voie extrinsèque médiée par les immunorécepteurs car l'activation soutenue des intégrines prolonge la durée de vie des neutrophiles (Mayadas, 2005). Bref, il est clair qu'il reste encore beaucoup de travail à faire pour élucider pleinement les mécanismes d'action du TA sur les neutrophiles.

En conclusion, maintenant qu'une nouvelle kinase a fait son entrée dans les mécanismes d'activation des neutrophiles par le TA, toute une voie de signalisation est sujette à investigation, celle sous-jacente à Syk. Aussi, plusieurs fonctions des neutrophiles comme la production de cytokines, la synthèse de novo des protéines, la production de ROS et l'adhésion doivent être mise en contexte avec l'inhibition de Syk par le piceatannol. Ce qui ouvre la porte pour un nouveau projet de recherche en continuum avec le présent. Malgré tout, le travail effectué jusqu'à présent suggère déjà l'importance de Syk chez les neutrophiles en général et durant leur activation par le TA. Le TA possède un fort potentiel pour induire l'apoptose des neutrophiles in vitro, mais le peut-il autant in vivo ? La question est de mise et est essentielle, puisque l'utilisation clinique du TA pour traiter des maladies inflammatoires est une avenue non négligeable qui permettrait à un grand nombre de personnes de bénéficier d'un traitement efficace et abordable avec un minimum d'effets secondaires. Décrire et comprendre ses modes d'action est un pas de plus vers la compréhension de la machinerie et des mécanismes cellulaires impliqués dans les processus normaux ou pathologiques. Enfin, connaître avec précision les mécanismes d'actions du TA sur les neutrophiles, mais aussi sur les cellules en général, permettrait de raffiner les traitements pour toutes sortes de pathologies immunitaires/inflammatoires ou cancéreuses/tumorales. Ultimement, on pourrait faire des combinaisons d'agents thérapeutiques de manière à diminuer leurs concentrations et leurs effets secondaires qui souvent limitent les thérapies. Depuis très longtemps l'arsenic est utilisé pour ses actions médicales en bien ou en mal. Cette drogue prend présentement de plus en plus d'importance au sein de communauté scientifique et possède un fort potentiel qui heureusement commence à être exploité. La découverte de nouvelles approches abordables et efficaces pour traiter les maladies inflammatoires chronique est essentielle à la santé de la population mondiale. Le TA pourrait représenter une nouvelle approche de traitement des maladies inflammatoires. À force d'élucider et de peaufiner ses modes d'action sur les cellules comme les neutrophiles on s'approche du jour où cette molécule sera utilisée de façon plus régulière pour traiter diverses maladies autres que le cancer.

Bibliographie

- ABRAM, C. L. et Lowell, C. A. 2007. «Convergence of immunoreceptor and integrin signalling». Immunological Reviews, vol. 218, p. 29-44.
- ABRAMS, J.R., Lebwohl, M.G., Guzzo, C.A., Jegasothy, B.V., Goldfarb, M.T., Goffe, B.S., Menter, A., Lowe, N.J., Krueger, G., Brown, M.J., Weiner, R.S., Birkhofer, M.J., Warner, G.L., Berry, K.K., Linsley, P.S., Krueger, J.G., Ochs, H.D., Kelley, S.L., Kang, S. 1999. «CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris». Clin. Invest., vol. 103, p. 1243-1252
- ABTAHIAN, F., Guerriero, A., Sebzda, E., Lu, M. M., Zhou, R., Mocsai, A., Myers, E. E., Huang, B., Jackson, D. G., Ferrari, V. A., Tybulewicz, V., Lowell, C. A., Lepore, J. J., Koretzky, G. A. et Kahn, M. L. 2003. «Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk». Science, vol. 299, p. 247-251.
- AGGARWAL, R., Sestak, A.L., D'Sousa, A., Dillon, S.P., Namjou, B., Scofield, R. 2009. «Complete complement deficiency in a large cohort of familial systemic lupus erythematosus». Lupus, Nov 12. [Epub ahead of print].
- AKAO, Y., Nakagawa, Y. et Akiyama, K. 1999. «Arsenic trioxide induces apoptosis in neuroblastoma cell lines through the activation of caspase 3 in vitro». FEBS Letters, vol. 455, p. 59-62.
- BAINTON, D. F., Ulliyot, J. L. et Farquhar, M. G. 1971. «The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow». Journal of Experimental Medicine, vol. 134, p. 907-934.
- BERNSTAM, L. et Nriagu, J. 2000. «Molecular aspects of arsenic stress». Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews, vol. 3, p. 293-322.
- BINET, F., Cavalli, H., Moisan, E. et Girard, D. 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, p. 349-358.
- BINET, F. et Girard, D. 2008. «Novel human neutrophil agonistic properties of arsenic trioxide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and/or c-jun NH2-terminal MAPK but not extracellular signal-regulated kinases-1/2». Journal of Leukocyte Biology, vol.84, p. 1613-1622.
- BORROW, J., Goddard, A. D., Sheer, D. et Solomon, E. 1990. «Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17». Science, vol. 249, p. 1577-1580.
- BRETSCHER, A., Edwards, K. et Fehon, RG. 2002. «ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex». Nature reviews. Molecular cell biology, vol. 3, p. 586-599.

BURGOYNE, R. D. et Morgan, A. 2003. «Secretory granule exocytosis». Physiological Reviews, vol. 83, p. 581-632.

CAVIGELLI, M., Li, W. W., Lin, A., Su, B., Yoshioka, K. et Karin, M. 1996. «The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase». EMBO Journal, vol. 15, p. 6269-6279.

CERAMI, A. 1992. «Inflammatory cytokines». Clin Immunol Immunopathol., vol. 62, p. 3-10.

CHEN, G. Q., Zhu, J., Shi, X. G., Ni, J. H., Zhong, H. J., Si, G. Y., Jin, X. L., Tang, W., Li, X. S., Xong, S. M., Shen, Z. X., Sun, G. L., Ma, J., Zhang, P., Zhang, T. D., Gazin, C., Naoe, T., Chen, S. J., Wang, Z. Y. et Chen, Z. 1996. «In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As₂O₃ induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins». Blood, vol. 88, p. 1052-1061.

CHEN, N. Y., Ma, W. Y., Huang, C., Ding, M. et Dong, Z. 2000. «Activation of PKC is required for arsenite-induced signal transduction». Journal of environmental pathology, toxicology and oncology, vol. 19, p. 297-305.

CHOI, S., Lee, Y.A., Hong, S.J., Lee, G.J., Kang, S.W., Park, J.H., Park, J.H., Park, H.K. 2010. «Evaluation of inflammatory change and bone erosion using a murine type II collagen-induced arthritis model». Rheumatol Int., vol. Jan 5. [Epub ahead of print]

COCCA, B.A., Cline, A.M., Radic, M.Z. 2002 «Blebs and apoptotic bodies are B cell autoantigens». J. Immunol., vol. 169, p. 159-166.

DAUM, G., Pham, J. et Deou, J. 2001. «Arsenite inhibits Ras-dependent activation of ERK but activates ERK in the presence of oncogenic Ras in baboon vascular smooth muscle cells». Molecular and Cellular Biochemistry, vol. 217, p. 131-136.

DeFRANCO, A. L., Locksley, R. M., Robertson, M. 2007. «Immunity: The immune response in Infectious and Inflammation Disease». New Science Press Ltd.

DELCLAUX, C., Delacourt, C., D'Ortho, M. P., Boyer, V., Lafuma, C. et Harf, A. 1996. «Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane». American journal of respiratory cell and molecular biology, vol. 14, p. 288-295.

FAURSCHOU, M. et Borregaard, N. 2003. «Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation». Microbes and Infection, vol. 5, p. 1317-1327.

FERNANDEZ, R. et Suchard, S. J. 1998. «Syk activation is required for spreading and H₂O₂ release in adherent human neutrophils». Journal of Immunology, vol. 160, p. 5154-5162.

FIRESTEIN, G.S. 2004. «The T cell cometh: interplay between adaptive immunity and cytokine networks in rheumatoid arthritis». J. Clin. Invest., vol. 114, p. 471-474

- FISCHER, H., Koenig, U., Eckhart, L. et Tschachler, E. 2000. «Human caspase-12 has acquired deleterious mutations». Biochemical and biophysical research communications, vol. 293, p. 722-726.
- FODOR, S., Jakus, Z. et Mocsai, A. 2006. «ITAM-based signaling beyond the adaptive immune response». Immunological Letters, vol. 104, p. 29-37.
- FORSBERG, M., Druid, P., Zheng, L., Stendahl, O., Särndahl, E. 2003. «Activation of Rac2 and Cdc42 on Fc and complement receptor ligation in human neutrophils». J. Leukoc. Biol., vol. 74, p. 611-619.
- FUTTERER, K., Wong, J., Grucza, R. A., Chan, A. C. et Waksman, G. 1998. «Structural basis for Syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide». Journal of Molecular Biology, vol. 281, p. 523-537.
- GIRARD, D., Tessier, P.A. 2007. «Phenotypic and functional changes of neutrophils activated by recently identified modulators». Research Signpost 37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India, chapter 1, p.1
- GOLDSBY, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A. 2000. «Immunologie, Le cours de Janis Kuby». W. H. Freeman and Company.
- GORMAN, C., Leandro, M., Isenberg, D. 2004. «Does B cell depletion have a role to play in the treatment of systemic lupus erythematosus». Lupus, vol. 13, p. 312-316.
- HALLER, J. S. 1975. «Therapeutic mule: the use of arsenic in the nineteenth century materia medica». Pharmacy in History, vo. 17, p. 87-100.
- HARADA, H., Grant, S. 2003. «Apoptosis regulators». Rev Clin Exp Hematol., vol. 7, p. 117-138.
- HATADA, M. H., Lu, X., Laird, E. R., Green, J., Morgenstern, J. P., Lou, M., Marr, C. S., Phillips, T. B., Ram, M. K. et Theriault, K. 1995. «Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor». Nature, vol. 377, p. 32-38.
- HAYASHI, T., Hideshima, T., Akiyama, M., Richardson, P., Schlossman, R. L., Chauhan, D., Munshi, N. C., Waxman, S. et Anderson, K. C. 2002. «Arsenic trioxide inhibits growth of human multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment». Molecular Cancer Therapeutics, vol. 1, p. 851-860.
- HITOMI, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y. et Tohyama, M. 2004. «Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death». Journal of Cellular Biology, vol. 165, p. 347-356.
- HOLZ, L.E., Warren, A., Le Couteur, D.G., Bowen, D.G., Bertolino, P. 2009. «CD8+ T cell tolerance following antigen recognition on hepatocytes». Journal of Autoimmunity, DOI 10.1016/j.jaut.2009.08.005.

- HOSSAIN, K., Akhand, A. A., Kato, M., Du, J., Takeda, K., Wu, J., Takeuchi, K., Liu, W., Suzuki, H. et Nakashima, I. 2000. «Arsenite induces apoptosis of murine T lymphocytes through membrane raft-linked signaling for activation of c-Jun amino-terminal kinase». Journal of Immunology, vol. 165, p. 4290-4297.
- HSU, L.Y., Tan, Y.X., Xiao, Z., Malissen, M., Weiss, A. 2009. «A hypomorphic allele of ZAP-70 reveals a distinct thymic threshold for autoimmune disease versus autoimmune reactivity». J. Exp. Med., vol. 206(11), p. 2527-2541.
- HUANG, X. J., Wiernik, P. H., Klein, R. S. et Gallagher, R. E. 1999. «Arsenic trioxide induces apoptosis of myeloid leukemia cells by activation of caspases». Medicinal Oncology, vol. 16, p. 58-64.
- JAVELAUD, D., Mauviel, A. 2004. «Transforming growth factor-betas: smad signaling and roles in physiopathology». Pathol. Biol., vol. 52, p. 50-54.
- JING, Y., Dai, J., Chalmers-Redman, R. M., Tatton, W. G. et Waxman, S. 1999. «Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway». Blood, vol. 94, p. 2102-2111.
- JOINER, K. A., Ganz, T., Albert, J. et Rotrosen, D. 1989. «The opsonizing ligand on Salmonella typhimurium influences incorporation of specific, but not azurophil, granule constituents into neutrophil phagosomes». Journal of Cellular Biology, vol. 109, p. 2771-2782.
- JOHNSON, K., Reddy, K.L., Singh, H. 2009. «Molecular pathways and mechanisms regulating the recombination of immunoglobulin genes during B-lymphocyte development». Adv Exp Med Biol., vol. 650, p. 133-147.
- KOBAYASHI, S.D., Voyich, J.M., Whitney, A.R., DeLeo, F.R. 2005. «Spontaneous neutrophil apoptosis and regulation of cell survival by granulocyte macrophage-colony stimulating factor». J Leukoc Biol., vol. 78, p. 1408-1418.
- KONDO, M., Wagers, A.J., Manz, M.G., Prohaska, S.S., Scherer, D.C., Beilhack, G.F., Shizuru, J.A., Weissman, I.L. 2003. «Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application». Annu. Rev. Immunol., vol. 21. p. 759-806.
- KUEHL, F.A. Jr, Egan, R.W. 1980. «Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation». Science., vol. 210, p. 978-984.
- LACY, P. 2005. «The role of Rho GTPases and SNAREs in mediator release from granulocytes». Pharmacology and Therapeutics, vol. 107, p. 358-376.
- LAWRENCE, D.W., King, S.B., Frazier, W.A., Koenig, J.M. 2009. «Decreased CD47 expression during spontaneous apoptosis targets neutrophils for phagocytosis by monocyte-derived macrophages». Early Hum Dev., vol. 85, p. 659-663.
- LEY, K. 2002. «Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils». Immunol Rev., vol.186, p. 8-18.

- LI, Y. M. et Broome, J. D. 1999. «Arsenic targets tubulins to induce apoptosis in myeloid leukemia cells». Cancer Research, vol. 59, p. 776-780.
- LUCATELLI, M., Cavarra, E., de Santi, M.M., Tetley, T.D., Martorana, P.A., Lungarella, G. 2003. «Collagen phagocytosis by lung alveolar macrophages in animal models of emphysema». Eur Respir J., vol. 22, p. 728-734.
- MAEDA, A., Scharenberg, A. M., Tsukada, S., Bolen, J. B., Kinet, J. P. et Kurosaki, T. 1999. «Paired immunoglobulin-like receptor B (PIR-B) inhibits BCR-induced activation of Syk and Btk by SHP-1». Oncogene, vol. 18, p. 2291-2297.
- MAYADAS, T. N. et X. Cullere. 2005. «Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions». Trends in Immunology, vol. 26, p. 388-395.
- McHEYSEYER-WILLIAMS, L.J., Pelletier, N., Mark, L., Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, M.G. 2009. «Follicular helper T cells as cognate regulators of B cell immunity». Curr Opin Immunol., vol. 21, p. 266-273.
- MILLER, W. H., Jr., Schipper, H. M., Lee, J. S., Singer, J. et Waxman, S. 2002. «Mechanisms of action of arsenic trioxide». Cancer Research, vol. 62, p. 3893-3903.
- MONACH, P.A., Mathis, D., Benoist, C. 2008. «The K/BxN arthritis model». Curr. Protoc. Immunol., vol. 81, p. 15.22.1-15.22.12.
- MONTSEIRIN, J. 2009. «Neutrophils and asthma». J Investig Allergol Clin Immunol., vol. 19, p. 340-354.
- MORISHIMA, N, Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., et Yasuhiko, Y. 2002. «An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12». Journal of Biological Chemistry, vol. 277, p. 34287-34294.
- MURPHY, M. A., Schnall, R. G., Venter, D. J., Barnett, L., Bertoncello, I., Thien, C. B., Langdon, W. Y. et Bowtell, D. D. 1998. «Tissue hyperplasia and enhanced T-cell signalling via ZAP-70 in c-Cbl-deficient mice». Molecular and Cellular Biology, vol. 18, p. 4872-4882.
- MURPHY, K., Travers, P., Walport, M. 2008. «Immunobiology». Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC.
- NAKAGAWA, T. et Yuan, J. 2000. «Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis». Journal of Cellular Biology, vol. 150, p. 887-894.
- NG, S. W., di Capite, J., Singaravelu, K. et Parekh, A. B. 2008. «Sustained activation of the tyrosine kinase Syk by antigen in mast cells requires local Ca²⁺ influx through Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels». Journal of Biological Chemistry, vol. 283, p. 31348-31355.
- NÜSSE, O. et Lindau, M. 1988. «The dynamics of exocytosis in human neutrophils». Journal of Cellular Biology, vol. 107, p. 2117-2123.

- ORTIZ-STERN, A. et Rosales, C. 2003. «Cross-talk between Fc receptors and integrins». Immunological Letters, vol. 90, p. 137-143.
- OTA, Y. et Samelson, L. E. 1997. «The product of the proto-oncogene c-cbl: a negative regulator of the Syk tyrosine kinase». Science, vol. 276, p. 418-420.
- PELLETIER, M. et Girard, D. 2007. «Biological functions of interleukin-21 and its role in inflammation». ScientificWorldJournal, vol. 7, p. 1715-1735.
- PENG, Q., Li, K., Sacks, S.H., Zhou, W. 2009. «The role of anaphylatoxins C3a and C5a in regulating innate and adaptive immune responses». Inflamm Allergy Drug Targets, vol. 8, p. 236-246.
- RADIC, M.Z. et Weigert, M. 1994 «Genetic and structural evidence for selection of anti-DNA antibodies». Annu. Rev. Immunol., vol. 12, p. 487-520.
- RAEDER, E. M., Mansfield, P. J., Hinkovska-Galcheva, V., Shayman, J. A. et Boxer, L. A. 1999. «Syk activation initiates downstream signaling events during human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis». Journal of Immunology, vol. 163, p. 6785-6793.
- RAMADAN, D., Rancy, P. C., Nagarkar, R. P., Schneider, J. P. et Thorpe, C. 2009. «Arsenic(III) species inhibit oxidative protein folding in vitro». Biochemistry, vol. 48, p. 424-432.
- RASHEVA, V. I. et Domingos, P. M. 2009. «Cellular response to endoplasmic reticulum stress and apoptosis». Apoptosis, vol. 14, p. 996-1007.
- RATHER, L.J. 1971. «Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus». Bull N Y Acad Med., vol. 47, p. 303-322.
- RITTIRSCH, D., Flierl, M.A., Ward, P.A. 2008. «Harmful molecular mechanisms in sepsis». Nat Rev Immunol., Vol. 8(10), p. 776-787.
- ROZSNYAY, Z., Sarmay, G., Zoller, M. et Gergely, J. 1996. «Membrane-bound ezrin is involved in B-cell receptor-mediated signaling: potential role of an ITAM-like ezrin motif». Immunological Letters, vol. 54, p. 163-169.
- SADA, K., Takano, T., Yanagi, S. et Yamamura, H. 2001. «Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase». Journal of biochemistry, vol. 130, p. 177-186
- SAKAGUCHI, N., Takahashi, T., Hata, H., Nomura, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Sakihama, T., Matsutani, T., Negishi, I., Nakatsuru, S., Sakaguchi, S. 2003. «Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice». Nature, vol. 426, p. 454-460.
- SANTOVITO, D., Mezzetti, A., Cipollone, F. 2009. «Cyclooxygenase and prostaglandin synthases: roles in plaque stability and instability in humans». Curr Opin Lipidol., vol. 20, p. 402-408.

- SCHRODER, M. et Kaufman, R. J. 2005. «The mammalian unfolded protein response». Annual Review of Biochemistry, vol. 74, p. 739-789.
- SEN, C. K. 1998. «Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants». Biochemical Pharmacology, vol. 55, p. 1747-1758.
- SENGELOV, H., Kjeldsen, L. et Borregaard, N. 1993. «Control of exocytosis in early neutrophil activation». Journal of Immunology, vol. 150, p. 1535-1543.
- SENGELOV, H., Follin, P., Kjeldsen, L., Lollike, K., Dahlgren, C. et Borregaard, N. 1995. «Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils». Journal of Immunology, vol. 154, p. 4157-4165.
- SHEN, Z. X., Chen, G. Q., Ni, J. H., Li, X. S., Xiong, S. M., Qiu, Q. Y., Zhu, J., Tang, W., Sun, G. L., Yang, K. Q., Chen, Y., Zhou, L., Fang, Z. W., Wang, Y. T., Ma, J., Zhang, P., Zhang, T. D., Chen, S. J., Chen, Z. et Wang, Z. Y. 1997. «Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients». Blood, vol. 89, p. 3354-3360.
- SHIH, D.Q., Targan, S.R. 2009. «Insights into IBD pathogenesis». Curr Gastroenterol Rep., vol. 11, p. 473-480.
- SHORTMAN, K., Liu, Y.-J. 2002. «Mouse and human dendritic cell subtypes». Nat. Rev. Immunol., vol. 2, p. 151-161.
- SIEGMUND, B., Sennello, J.A., Lehr, H.A., Batra, A., Fedke, I., Zeitz, M., Fantuzzi, G. 2004. «Development of intestinal inflammation in double IL-10- and leptin-deficient mice». J Leukoc. Biol., vol. 76(4), p. 782-786.
- SKUBITZ, K. M., Kuroki, M., Jantscheff, P., Skubitz, A. P. et Grunert, F. 1999. «CD66b». Journal of biological regulators and homeostatic agents, vol. 13, p. 242-243.
- SOIGNET, S. L., Maslak, P., Wang, Z. G., Jhanwar, S., Calleja, E., Dardashti, L. J., Corso, D., DeBlasio, A., Gabilove, J., Scheinberg, D. A., Pandolfi, P. P. et Warrell, R. P., Jr. 1998. «Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide». New England Journal of Medicine, vol. 339, p. 1341-1348.
- TAKANO, T., Sada, K. et Yamamura, H. 2002. «Role of protein-tyrosine kinase syk in oxidative stress signaling in B cells». Antioxidants and Redox Signaling, vol. 4, p. 533-541.
- TAKETANI, S., Kohno, H., Tokunaga, R., Ishii, T. et Bannai, S. 1991. «Selenium antagonizes the induction of human heme oxygenase by arsenite and cadmium ions». Biochemistry International, vol. 23, p. 625-632.
- TANIGUCHI, T., Kobayashi, T., Kondo, J., Takahashi, K., Nakamura, H., Suzuki, J., Nagai, K., Yamada, T., Nakamura, S. et Yamamura, H. 1991. «Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis». Journal of Biological Chemistry, vol. 266, p. 15790-15796.

- de THE, H., Chomienne, C., Lanotte, M., Degos, L. et Dejean, A. 1990. «The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus». Nature, vol.347, p. 558-561.
- TOHYAMA, Y. et Yamamura, H. 2009. «Protein tyrosine kinase, syk: a key player in phagocytic cells». Journal of Biochemistry, vol. 145, p. 267-273.
- TSANG, E., Giannetti, A. M., Shaw, D., Dinh, M., Tse, J. K., Gandhi, S., Ho, H., Wang, S., Papp, E. et Bradshaw, J. M. 2008. «Molecular mechanism of the Syk activation switch». Journal of Biological Chemistry, vol. 283, p. 32650-32659.
- TSUCHIDA, S., Yanagi, S., Inatome, R., Ding, J., Hermann, P., Tsujimura, T., Matsui, N. et Yamamura, H. 2000. «Purification of a 72-kDa protein-tyrosine kinase from rat liver and its identification as Syk: involvement of Syk in signalling events of hepatocytes». Journal of Biochemistry, vol. 127, p. 321-327
- TURNER, M., Mee, P. J., Costello, P. S., Williams, O., Price, A. A., Duddy, L. P., Furlong, M. T., Geahlen, R. L. et Tybulewicz, V. L. 1995. «Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk». Nature, vol. 378, p. 298-302.
- UNDERHILL, D. M. et Goodridge, H. S. 2007. «The many faces of ITAMs». Trends in Immunology, vol. 28, p. 66-73.
- URZAINQUI, A., Serrador, J. M., Viedma, F., Yanez-Mo, M., Rodriguez, A., Corbi, A. L., Alonso-Lebrero, J. L., Luque, A., Deckert, M., Vazquez, J. et Sanchez-Madrid, F. 2002. «ITAM-based interaction of ERM proteins with Syk mediates signaling by the leukocyte adhesion receptor PSGL-1». Immunity, vol. 17, p. 401-412.
- VARIN, A., Gordon, S. 2009. «Alternative activation of macrophages: Immune function and cellular biology». Immunobiology, vol. 214, p. 630-641.
- VIGLIANTI, G.A., Lau, C.M., Hanley, T.M., Miko, B.A., Shlomchik, M.J., Marshak-Rothstein, A. 2003. «Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA». Immunity, vol. 19, p. 837-847.
- WEBER, M.S., Hemmer, B. 2009. «Cooperation of B Cells and T Cells in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis». Results. Probl. Cell Differ., DOI 10.1007/400_2009_21
- WILLEKE, T., Schymeinsky, J., Prange, P., Zahler, S. et Walzog, B. 2003. «A role for Syk-kinase in the control of the binding cycle of the beta2 integrins (CD11/CD18) in human polymorphonuclear neutrophils». Journal of Leukocyte Biology, vol. 74, p. 260-269.
- ZHU, J., Koken, M. H., Quignon, F., Chelbi-Alix, M. K., Degos, L., Wang, Z. Y., Chen, Z. et de The, H. 1997. «Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia». PNAS USA, vol. 94, p. 3978-3983.