

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**DÉGRADATION, PHOSPHORYLATION ET DEVENIR DES PROTÉINES DU
CYTOSQUELETTE MOÉSINE ET EZRINE DURANT L' APOPTOSE DU
NEUTROPHILE HUMAIN**

Par
Marie-Michelle Simon

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

Jury d'évaluation

Présidente du jury
et examinatrice interne

Mme Cathy Vaillancourt, PhD
INRS-Institut Armand-Frappier

Examinatrice externe

Mme Caroline Gilbert, PhD
Axe infectiologie et immunologie,
Centre de recherche du Centre hospitalier
universitaire de Québec (CRCHUQ)

Directeur de recherche

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



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes collègues de laboratoire : Jamila, Jean-Christophe, David, Théo, Francis V., Francis A. et Rafael, qui m'ont tous un peu aidé à leur manière par leurs précieux conseils. Également, ce sont ces gens qui ont contribué à rendre l'ambiance dans le laboratoire à la fois stimulante et détendue, rendant mon séjour à l'INRS très agréable. Pour les mêmes raisons, je tiens également à remercier mes voisins de bureau dans la salle étudiante et les collègues des autres laboratoires, qui sont devenus des amis : Bruno, Andrée-Anne, Patricia, Sandra, Kathy et Marc.

Puis, je tiens à remercier chaleureusement mes parents, Pierre et Maryse, pour leur support, leur dévouement et leurs encouragements.

Finalement, merci à mon directeur de recherche, Denis Girard, qui a été un fabuleux guide et motivateur tout au long de ces deux années passées à la maîtrise.

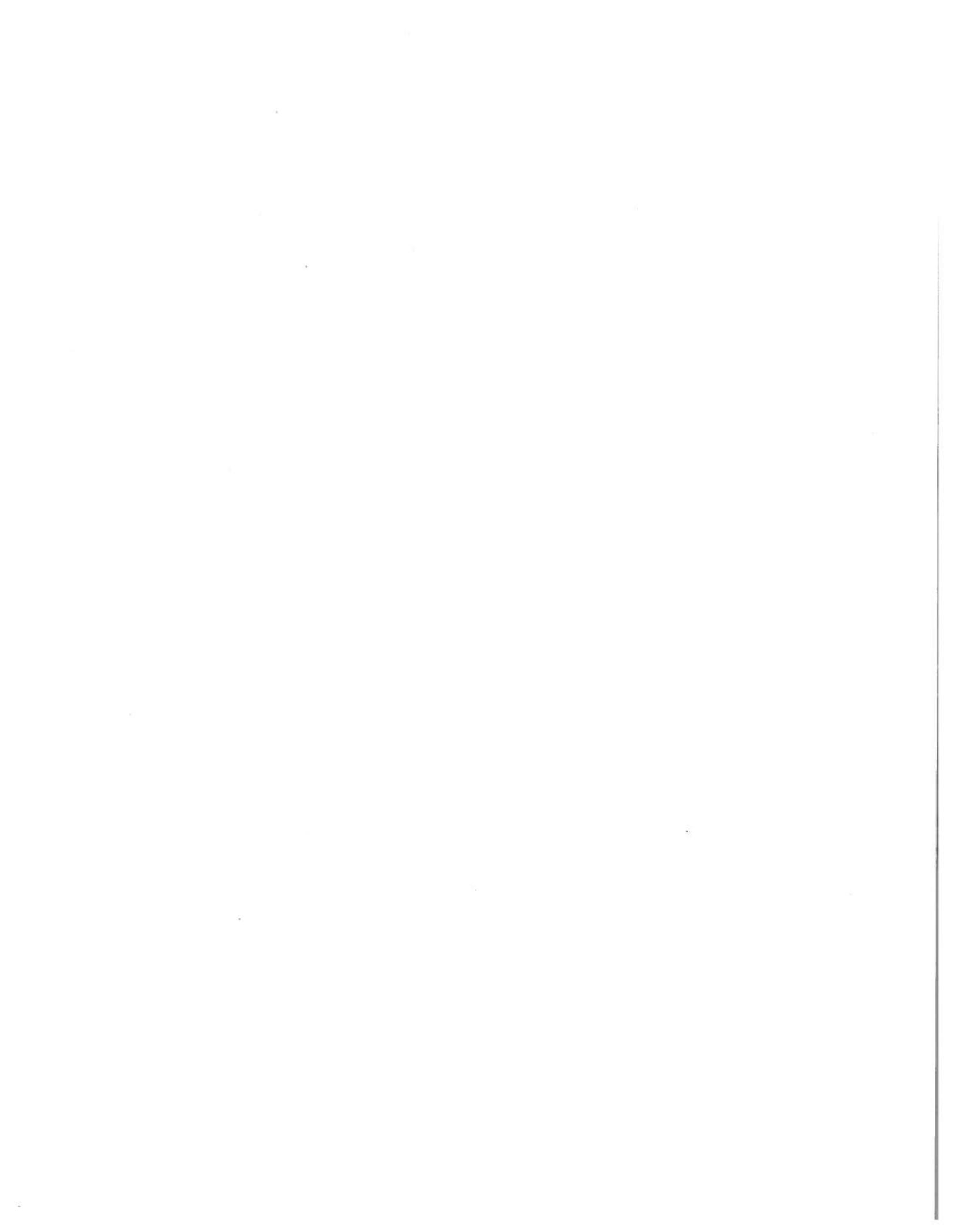


Table des matières

Remerciements.....	iii
Liste des abréviations.....	vii
Liste des figures et tableaux.....	xi
Résumé.....	xiii
Introduction.....	1
SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	3
Chapitre 1 : Le système immunitaire inné, l'inflammation et la physiologie du neutrophile.....	5
1.1 Le système immunitaire inné.....	5
1.2 L'inflammation.....	6
1.3 La physiologie du neutrophile.....	7
1.3.1 La maturation du neutrophile.....	7
1.3.2 Recrutement du neutrophile au site inflammatoire.....	9
1.3.3 Fonctions du neutrophile.....	11
1.3.3.1 La phagocytose.....	11
1.3.3.2 Flambée oxydative.....	12
1.3.3.3 Dégranulation.....	13
1.3.3.4 Apoptose.....	14
1.3.3.4a Voies apoptotiques.....	15
1.3.3.4b Voies signalétiques de survie et de mort impliquées lors de l'apoptose.....	17
1.3.3.4c Modulateurs de l'apoptose du neutrophile.....	18
1.3.3.4d Apoptose et homéostasie.....	20
Chapitre 2 : Apoptose, cytosquelette et protéines ERM chez le neutrophile.....	21
2.1 Implication du cytosquelette dans l'apoptose du neutrophile.....	21
2.1.1 Les protéines ERM.....	23
2.1.1.1 Les protéines ERM et l'apoptose.....	25
2.1.1.2 Les protéines ERM chez le neutrophile.....	25
Chapitre 3 : L'arthrite rhumatoïde.....	27
3.1 Le rôle des auto-anticorps dans l'arthrite rhumatoïde.....	28
3.1.1 Les facteurs rhumatoïdes.....	28
3.1.2 Les anticorps anti-vimentine citrullinée.....	30
3.2 Implication des neutrophiles dans l'arthrite rhumatoïde.....	32

SECTION 2 : ARTICLE	35
Résumé en français de l'article.....	37
Contribution des auteurs de l'article.....	38
Texte original de l'article.....	39
Discussion et conclusion	73
Liste des références	79

Liste des abréviations

ACPA : "anti-citrullinated peptide antibody"
ADN : acide désoxyribonucléique
Apaf-1 : "apoptotic protease activating factor 1"
APL : "acute promyelocitic leukemia"
ATP : adénosine triphosphate
Bcl-2 : "b-cell lymphoma 2"
Bcl-xL : "b-cell lymphoma-extra large"
CSH : cellule souche hématopoïétique
dATP : deoxyadénosine triphosphate
DISC : "death inducing signalling complex"
ERM : ezrine, radixine, moésine
ERK : "extracellular signal-regulated kinase"
FADD : "fas associated death domain"
FasL : "fas ligand"
FERM : "four-point-one, Ezrine, Radixin, Moesin"
Fc : fragment constant
fMLP : n-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine
G-CSF : "granulocyte colony stimulating factor"
GM-CSF : "granulocyte-macrophage colony stimulating factor"
GTP : guanosine triphosphate
ICAM : "IgG superfamily cell adhesion molecule"
HOCl : acide hypochlorique
Ig : immunoglobuline

IL : interleukine

JNK : "c-jun N-terminal kinase"

LPS : lipopolysaccharide

MAC-1 : "macrophage-1 antigen"

MAPkinase : "mitogen-activated protein kinase"

Mcl-1 : "myeloid cell leukemia sequence-1"

NADPH oxydase : "nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase"

NF- κ B : "nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells"

NK : "natural killer"

NSCLC : "non-small cell lung cancer"

p47PHOX : "p47- phagocytic oxydase"

PAD : "peptidyl arginine deiminase"

PBMC : "peripheral blood mononuclear cell"

PECAM-1 : "platelet-endothelial cell adhesion molecule-1"

PSGL-1 : "p-selectin glycoprotein ligand-1"

PIP₂ : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PMN : leucocyte polymorphonucléaire

RAC1 : "ras-related C3 botulinum toxin substrate 1"

ROCK : "rho-associated protein kinase"

ROS : "reactive oxygen species"

SYK : "spleen tyrosine kinase"

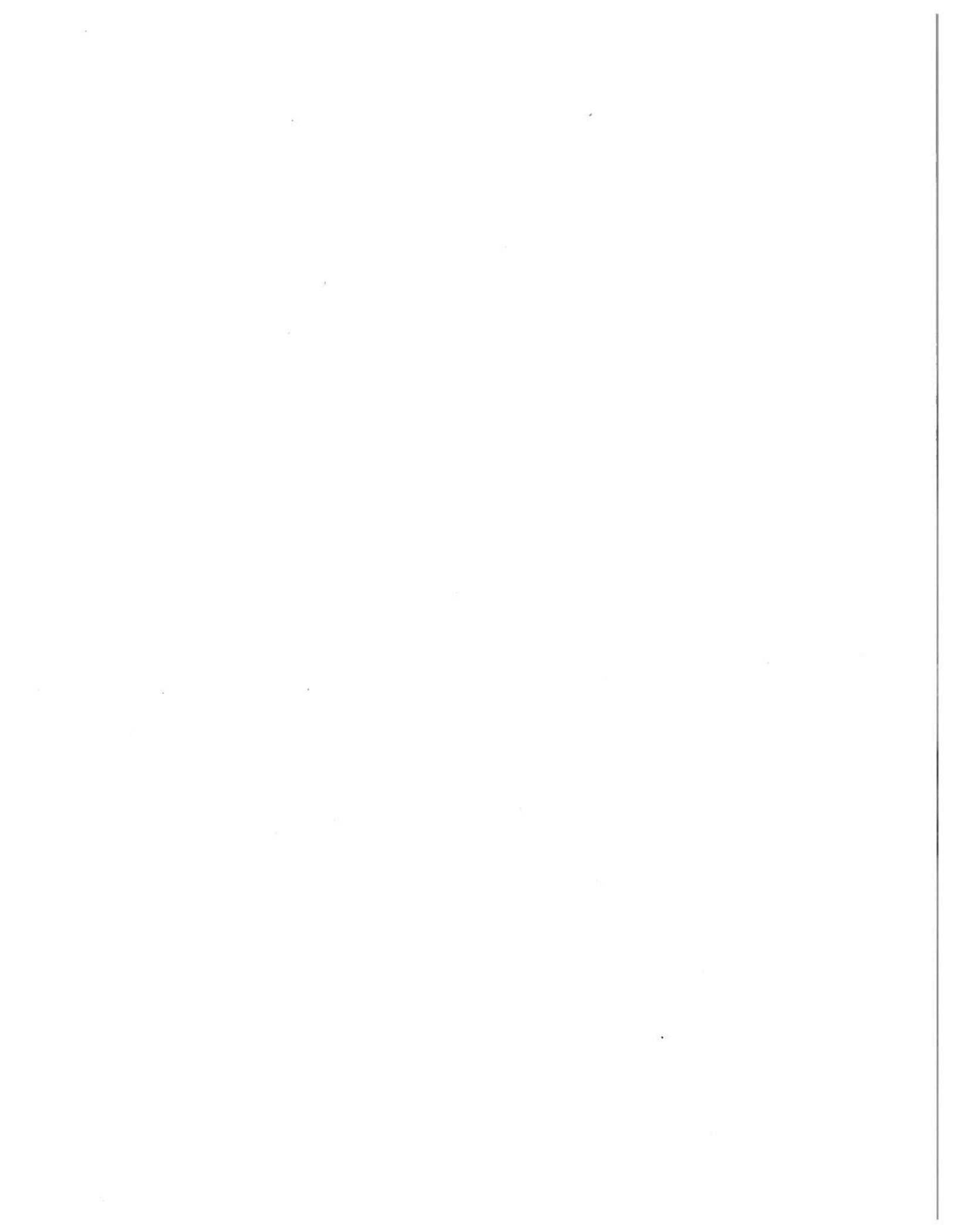
TNF : "tumor necrosis factor"

TRAIL : "TNF-related apoptosis-inducing ligand"

UPR : "unfolded protein response"

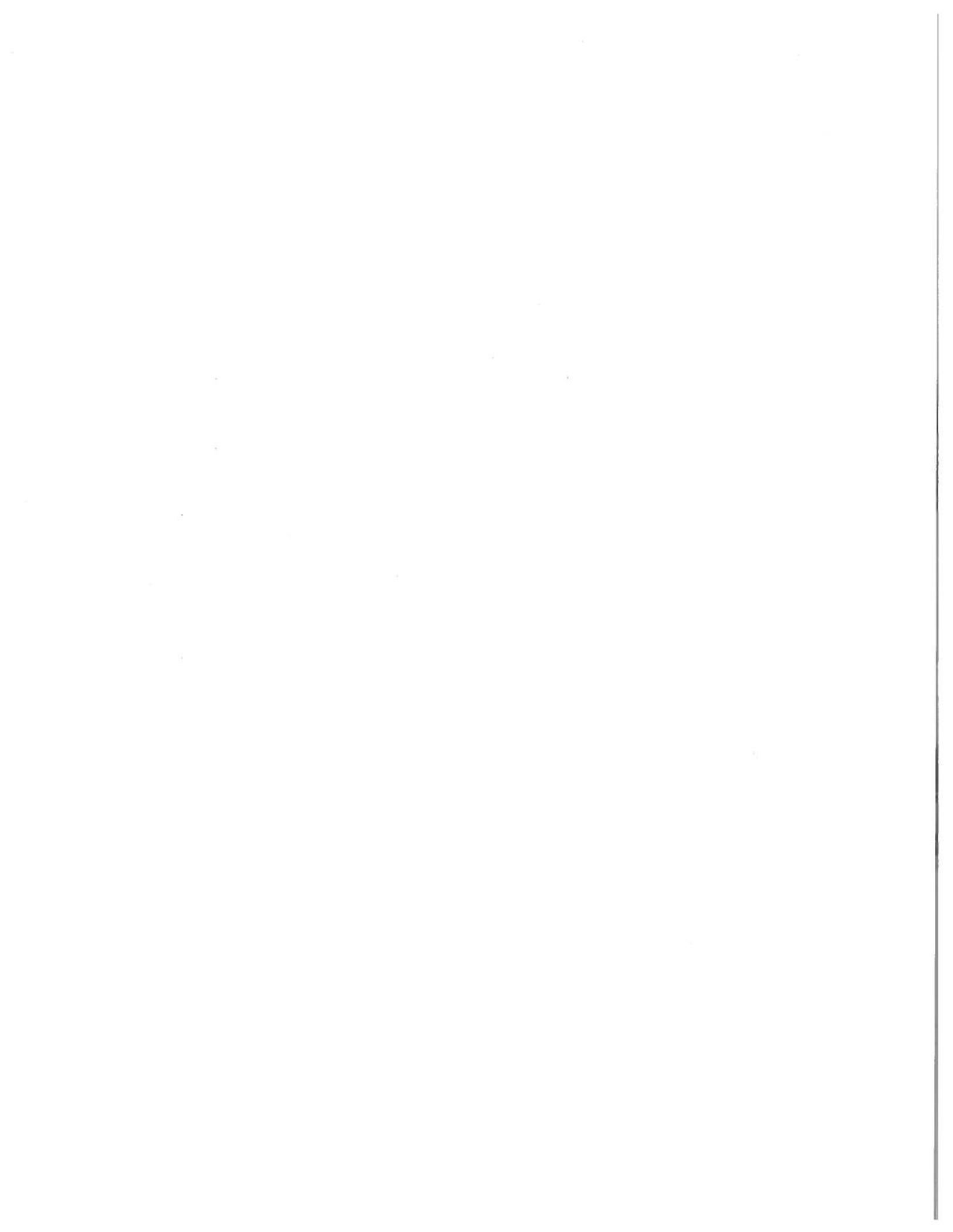
VAA-I : "*viscum album* agglutinin-I"

VE-cadhérine : "vascular endothelial-cadherine"



Liste des figures

Figure 1 : Maturation du neutrophile.....	9
Figure 2 : Voies apoptotiques chez le neutrophile.....	16
Figure 3 : Apoptose et homéostasie.....	20
Figure 4 : Phosphorylation (activation) des protéines ERM.....	24
Figure 5 : Pathologie de l'arthrite rhumatoïde : accumulation des cellules immunitaires dans le liquide synovial.....	28

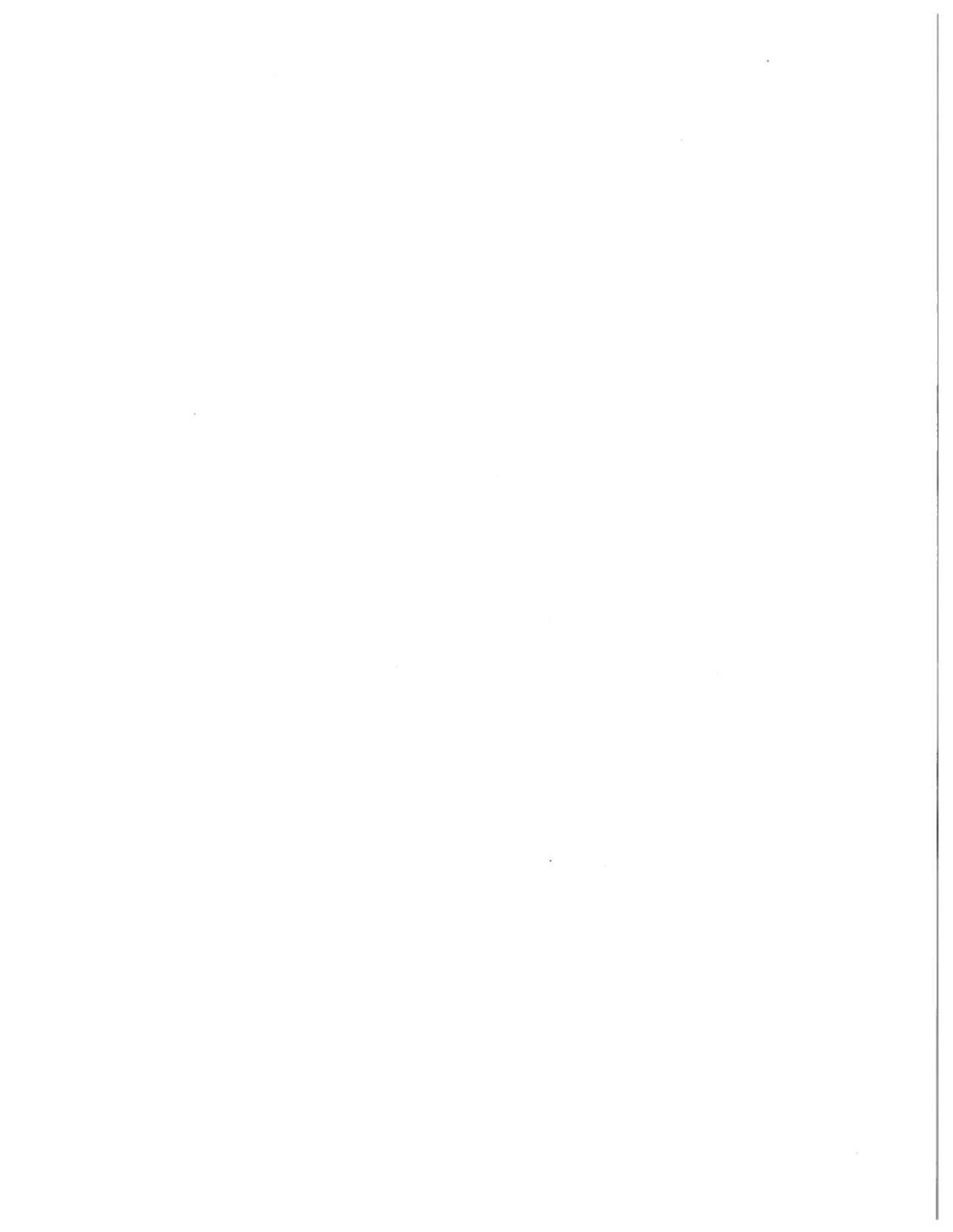


Résumé

L'apoptose du neutrophile humain, également appelée mort cellulaire programmée, est un mécanisme très important pour le maintien de l'homéostasie durant la réponse inflammatoire. Il est donc primordial d'étudier ce phénomène afin de pouvoir élaborer des stratégies thérapeutiques dans le but de réduire ou d'augmenter le nombre de neutrophiles au site inflammatoire selon le cas. L'étude du devenir et du rôle des protéines du cytosquelette de la cellule durant l'apoptose du neutrophile est une façon utilisée pour comprendre en détail le mécanisme de mort cellulaire programmée. Jusqu'à maintenant, aucune étude n'a été effectuée en ce qui a trait à l'implication dans l'apoptose du neutrophile humain des protéines du cytosquelette ezrine et moésine. Ces protéines occupent une fonction primordiale dans la cellule, puisqu'elles aident à maintenir l'intégrité du cytosquelette en liant la membrane plasmique aux filaments d'actine et jouent le rôle de protéine adaptatrice, donc elles peuvent lier des récepteurs à la surface de la membrane à des protéines situées en aval des voies signalétiques. Nos résultats ont montré que l'ezrine et la moésine sont déphosphorylées (inactivées) très tôt lors de l'apoptose du neutrophile humain. Également, nous avons montré que la moésine et l'ezrine étaient dégradées et exprimées à la surface du neutrophile lorsque le taux d'apoptose dans le milieu réactionnel avoisinait les 100%. Ce dernier résultat est particulièrement intéressant, puisque l'expression de protéines du cytosquelette à la surface du neutrophile en apoptose pourrait potentiellement être un phénomène à l'origine de la production d'auto-anticorps lors de maladies inflammatoires chroniques. Également, nos résultats ont permis de mieux comprendre le mécanisme de l'apoptose chez le neutrophile humain, phénomène essentiel à la résolution de l'inflammation.

Étudiant

Directeur de recherche

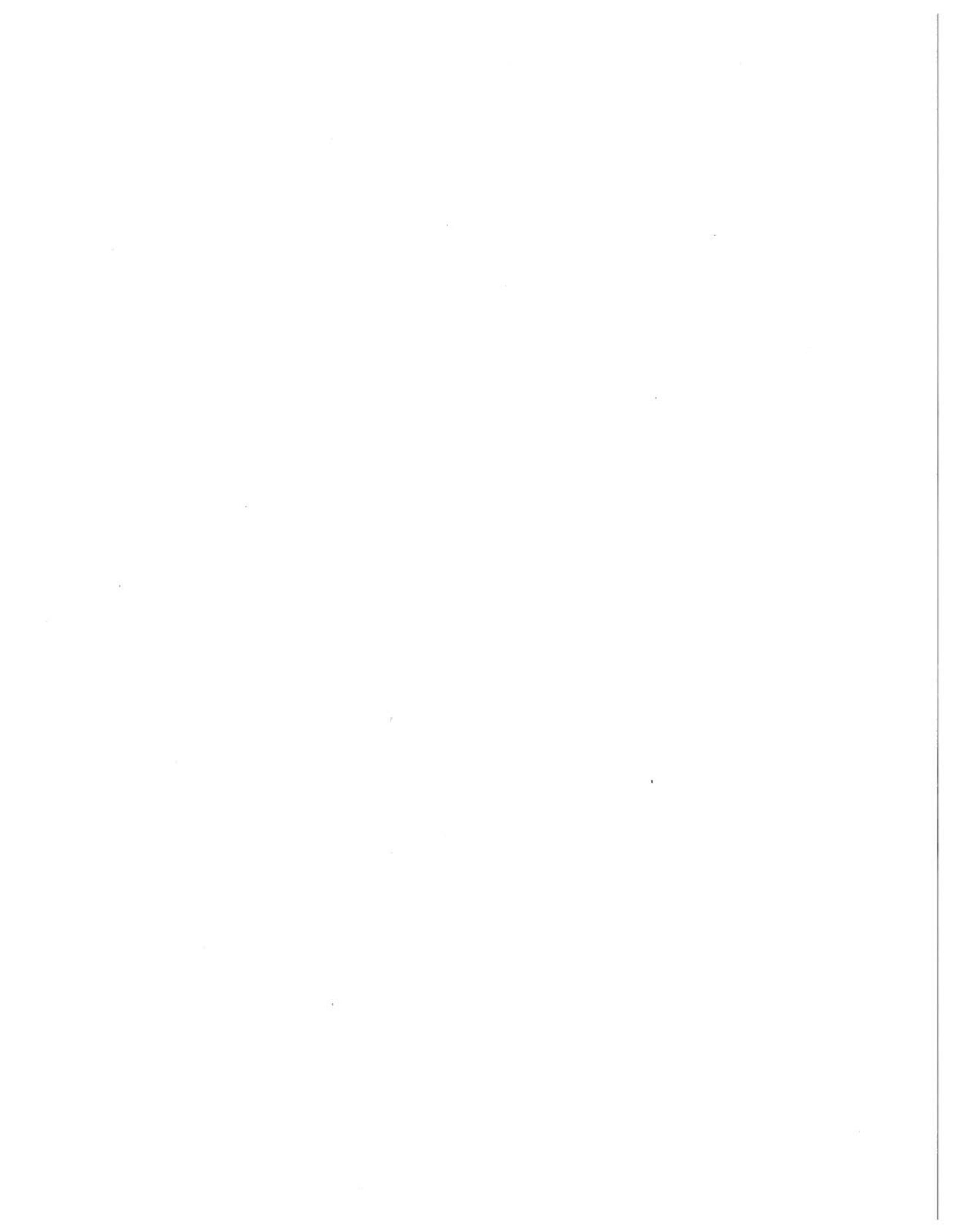


Introduction

Le neutrophile, également appelé leucocyte polymorphonucléaire (PMN), est un composant important du système immunitaire inné. Il s'agit en fait de la première cellule à arriver au site inflammatoire lors d'une infection. Les neutrophiles représentent 60 % des cellules en circulation dans le sang et migrent au niveau des tissus où leur principal rôle est d'éliminer les agents pathogènes par phagocytose et/ou dégranulation (processus impliquant la libération d'enzymes bactéricides). Ces cellules ont une courte demie-vie (8 à 20h) et entrent spontanément en apoptose, processus également appelé mort cellulaire programmée. Il s'agit d'un mécanisme très important pour le maintien de l'homéostasie durant la réponse inflammatoire. En effet, lorsqu'il y a inhibition de l'apoptose, les neutrophiles s'accumulent au site inflammatoire et peuvent libérer une très grande quantité d'enzymes bactéricides ainsi que d'espèces oxygénés hautement réactives, ce qui peut endommager les tissus et causer une exacerbation de l'inflammation ainsi que des troubles auto-immuns. Au contraire, s'il y a apoptose excessive, il y aura diminution du nombre de neutrophiles au site inflammatoire, ce qui peut mener à une immunosuppression et accentuer le risque d'infection. Il est donc très important d'étudier le mécanisme de l'apoptose chez le neutrophile afin de pouvoir, par exemple, élaborer des stratégies thérapeutiques dans le but de réduire ou d'augmenter le nombre de neutrophiles au site inflammatoire selon le cas. L'étude du devenir et du rôle des protéines du cytosquelette de la cellule durant l'apoptose du neutrophile est une façon utilisée pour comprendre en détail le mécanisme de mort cellulaire programmée. Le cytosquelette est un réseau complexe de filaments à l'intérieur de la cellule qui ont des rôles dans plusieurs fonctions cellulaires tels l'adhésion et la migration. Il est composé de trois principaux types de filaments, soient les microfilaments, les filaments intermédiaires et les microtubules. Précédemment, des études ont été effectuées quant à la dégradation des protéines faisant partie des trois types de filaments durant l'apoptose du neutrophile (la dégradation des protéines du cytosquelette étant un événement marqueur de l'apoptose chez les cellules). Également, une étude a montré que deux protéines faisant partie des filaments intermédiaires, soient la vimentine et la lamine B1, étaient exprimées à la surface du neutrophile en apoptose, phénomène qui pourrait potentiellement mener à la

formation d'auto-anticorps dirigés contre ces protéines. Toutefois, aucune étude n'a été effectuée jusqu'à maintenant en ce qui a trait à l'implication dans l'apoptose du neutrophile humain des protéines du cytosquelette ezrine et moésine. Ces protéines du cytosquelette ne font pas partie des trois principaux types de filament mais sont d'intérêt, puisqu'elles ont un rôle structural important. En effet, elles aident à maintenir l'intégrité du cytosquelette en liant la membrane plasmique aux filaments d'actine. Également, elles jouent le rôle de protéines adaptatrices, puisqu'une fois phosphorylées, elles peuvent lier des récepteurs à la surface de la membrane à des protéines situées en aval des voies signalétiques. Donc, les trois objectifs de cette étude seront de déterminer le niveau de phosphorylation, la dégradation et le niveau d'expression à la surface de la cellule des protéines du cytosquelette ezrine et moésine durant l'apoptose du neutrophile humain. Cette recherche a pour objectif de mieux comprendre le mécanisme de l'apoptose chez le neutrophile afin de pouvoir éventuellement élaborer des stratégies thérapeutiques dans le cas de maladies inflammatoires chroniques comme, par exemple, l'arthrite rhumatoïde.

SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE



Chapitre 1 : Le système immunitaire inné, l'inflammation et la physiologie du neutrophile

1.1 Le système immunitaire inné

Le système immunitaire a évolué dans le but de reconnaître et de combattre des agents infectieux. Deux sous-systèmes appelés immunité innée et immunité acquise agissent individuellement et en collaboration afin d'éliminer les organismes pathogènes (De Franco et *al*, 2007 : 2). Pour les besoins du présent mémoire, le système immunitaire inné sera décrit plus en profondeur.

La défense innée est d'abord médiée par un ensemble de barrières anatomiques (la peau intacte, par exemple) et physiologiques (le pH acide de l'estomac, entre autres) qui éliminent les corps étrangers de façon non-spécifique. Lorsque celles-ci sont insuffisantes, d'autres mécanismes de défense innés sont induits, comme celui du complément, qui comprend un système complexe d'enzymes en circulation dans le sang pouvant être activé par les pathogènes. Également, les leucocytes (cellules du système immunitaire inné) possèdent des récepteurs appelés "Pattern Recognition Receptor", qui leur permettent de reconnaître des motifs conservés chez les micro-organismes. Cette reconnaissance induit une réponse immunitaire qui prend la forme de phagocytose de matériel étranger et/ou de lyse de cellules infectées, ce qui peut mener à l'inflammation. En effet, lors de la phagocytose ou lyse cellulaire effectuée, entre autres, par les neutrophiles et les macrophages, des médiateurs chimiques appelés cytokines sont libérés, ce qui attire les autres leucocytes au site de l'infection, engendrant ainsi le phénomène de l'inflammation (De Franco et *al*, 2007 : 55).

1.2 L'inflammation

L'inflammation est un système de défense inné qui consiste en une série de réponses cellulaires et humorales ayant pour but de réparer un dommage tissulaire. L'augmentation du flux sanguin par vasodilatation ainsi que l'augmentation de la perméabilité des capillaires au site inflammatoire sont caractéristiques du processus inflammatoire. En effet, ils permettent une meilleure circulation des cellules immunitaires vers les tissus infectés. Il existe plusieurs causes possibles aux dommages tissulaires (par exemple, un agent chimique, physique ou un organisme infectieux), mais dans tous les cas, le premier évènement à survenir lors du processus d'inflammation que l'on appelle aigüe est l'adhésion des neutrophiles (leucocytes polymorphonucléaires, PMNs) à l'endothélium vasculaire (Serhan et *al*, 2010 : 1). Ces derniers migrent au niveau du tissu infecté et éliminent les agents pathogènes, entre autres par phagocytose et libération d'enzymes bactéricides, puis meurent par apoptose. Afin d'assurer la résolution de l'inflammation, d'autres cellules sont recrutées au site inflammatoire, soient les monocytes (différenciés en macrophages), qui sont responsables de phagocyter les neutrophiles apoptotiques dans le milieu. Par la suite, il y a inflammation dite chronique si le processus inflammatoire aigu n'est pas suffisant pour réparer le dommage et que d'autres cellules, par exemple des lymphocytes, doivent être recrutées au site inflammatoire (Serhan et *al*, 2010 : 1).

1.3 La physiologie du neutrophile

Le neutrophile, également appelé PMN dû à son noyau multilobé, est la première cellule à arriver au site d'infection lors de la réponse inflammatoire. Il s'agit du leucocyte le plus abondant dans la circulation sanguine (60 % des leucocytes totaux). Les neutrophiles sont les cellules effectrices de première ligne de l'immunité innée (Akgul et *al*, 2001 : 318). Une fois différenciées, ils circulent pendant quelques heures avant de pénétrer dans les tissus où ils ingèrent des micro-organismes infectieux et les tuent grâce à des produits microbicides stockés dans des vésicules spécialisées. Ces dernières ont l'apparence de granules après coloration avec des colorants neutres, et c'est pourquoi les neutrophiles sont classés dans la famille des granulocytes (au même titre que les éosinophiles et les basophiles) (De Franco et *al*, 2007 : 7, 55).

1.3.1 La maturation du neutrophile

La production des différentes lignées de cellules immunitaires est régulée de façon stricte par les besoins de l'organisme qui sont traduits en signaux provenant des tissus périphériques. En cas d'infection, la production du facteur stimulant les colonies de granulocytes (G-CSF) est induite, ce qui augmente la production de cellules du système immunitaire inné comme les neutrophiles. À titre d'exemple, le nombre de neutrophiles produit par la moelle osseuse chez un adulte sain est estimé à 5×10^{10} par jour, alors qu'en cas d'infection, ce nombre peut être dix fois plus élevé (Edwards, 1994 : 5).

La plupart des cellules du système immunitaire proviennent d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) de la moelle osseuse. À chaque division, une cellule souche donne naissance à une autre cellule souche et à une cellule progénitrice destinée à produire une des lignées apparentées de cellules différenciées qui constituent la descendance de la cellule souche originelle (De Franco et *al*, 2007 : 5). Il existe deux principales lignées de cellules immunitaires : la lignée lymphocytaire, qui donne naissance aux lymphocytes de la réponse immunitaire acquise, et la lignée myéloïde, qui donne naissance, entre autres, aux cellules inflammatoires du système immunitaire inné.

À partir de la différenciation de la cellule souche hématopoïétique en cellule de lignée myéloïde, on compte environ 14 jours jusqu'à la formation du neutrophile mature. Tout d'abord, la cellule de la lignée myéloïde se différencie en myéloblaste, puis en promyélocyte, suite à l'influence de cytokines appelées facteurs stimulant des colonies (par exemple, le G-CSF et le GM-CSF). C'est à l'étape de la différenciation du myéloblaste en promyélocyte que sont formés les granules primaires du neutrophile, contenant notamment les enzymes bactéricides myéloperoxydase (qui possède un groupe hème responsable de la teinte verdâtre des sécrétions du neutrophile au site inflammatoire), défensines et protéinase 3 (Ross et Wojciech, 2006 : 269, 270). Par la suite, la cellule promyélocyte se différencie en cellule myélocyte, dans laquelle on retrouve un noyau moins sphérique qu'aux stades précédents (davantage multilobé). À cette étape, il y a formation des granules secondaires, qui contiennent la collagénase (enzyme facilitant la destruction de structure extracellulaires lors d'infections bactériennes) et la lactoferrine (enzyme liant le fer, privant ainsi la flore bactérienne d'un élément essentielle à sa croissance). Par la suite, la cellule myélocitaire se différencie en cellule metamyélocitaire, dans laquelle on peut voir apparaître les granules tertiaires contenant la gélatinase (ayant un rôle semblable à la collagénase) ainsi que les vésicules sécrétoires. (Borregaard et Cowland, 1997 : 3503). Ce stade met fin à la phase mitotique de la différenciation du neutrophile, qui dure environ une semaine. Le stade final de la formation du neutrophile mature est identifiable par la segmentation claire du noyau en plusieurs lobes (voir figure 1).

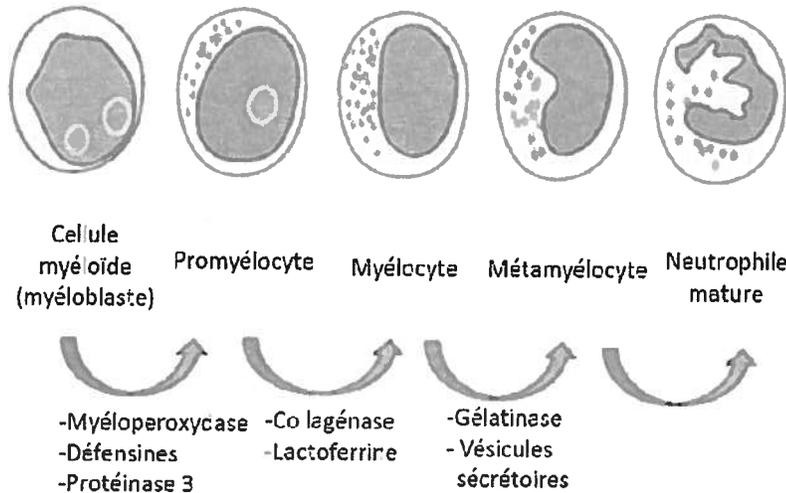


Figure 1 : Maturation du neutrophile (inspiré de Lekstrom-Himes et al, 1999 : 1850)

1.3.2 Recrutement du neutrophile au site inflammatoire

Afin d'exercer leur rôle qui consiste en l'élimination des agents pathogènes au site inflammatoire, les neutrophiles en circulation dans le sang doivent passer rapidement d'un état non-adhérent à un état adhérent afin de migrer au niveau du tissu. Cela débute par l'expression sur l'endothélium de molécules d'adhésion induite par des médiateurs inflammatoires libérés par les tissus endommagés. Les neutrophiles en circulation dans le sang entrent ainsi en contact de façon transitoire avec les cellules endothéliales, un mécanisme appelé adhésion. Cela implique tout d'abord le roulement du neutrophile sur l'endothélium, qui est médié par l'interaction des molécules L-sélectines du neutrophile avec les molécules P et E-sélectine, nouvellement exprimées par les cellules endothéliales au site inflammatoire (Witko-Sarsat et al, 2000 : 618, 619). Par la suite, le neutrophile adhère fermement à l'endothélium vasculaire via une interaction entre des molécules appelées intégrines de la sous-famille $\beta 2$ (CD11b/CD18) chez le neutrophile et la molécule ICAM-1, présente au niveau des cellules endothéliales. Les intégrines de la famille $\beta 2$ sont activées chez le neutrophile par des facteurs chimioattractants (ex : IL-8) libérés lors du roulement du neutrophile sur les cellules endothéliales. Également, des facteurs de croissance (ex : GM-CSF) et des composants bactériens (ex : LPS)

contribuent à induire l'expression des intégrines de la famille $\beta 2$ (Witko-Sarsat et *al*, 2000 : 620). Le neutrophile, bien adhérent, amorce ensuite le processus de diapédèse, qui implique la déformation de ce dernier pour s'insérer entre les cellules endothéliales. La diapédèse requiert une modification au niveau des jonctions adhérentes entre les cellules endothéliales. En effet, durant le processus, une désorganisation au niveau des composants des jonctions adhérentes VE-cadherine, β -catenine, et plakoglobine est observée (De Franco et *al*, 2007 : 83). La molécule d'adhésion PECAM-1 est exprimée à la surface du neutrophile ainsi qu'au niveau des cellules endothéliales, et le processus de diapédèse est médié par l'interaction PECAM-1/PECAM-1. Un modèle de type "zipper" est d'ailleurs proposé pour expliquer le maintien de la perméabilité de la barrière endothéliale durant le processus de diapédèse. Par la suite, des molécules chimioattractantes produites par les bactéries, les cellules mortes ou les cellules épithéliales du tissu inflammé se lient à la matrice extracellulaire grâce à leur charge négative. Le neutrophile migre dans le tissu en inflammation par haptotaxie, puisqu'il répond à un gradient chimioattractant de molécules immobilisées et non solubles dans le milieu (contrairement au processus de chimiotaxie, qui implique des molécules solubles) (Foxman et *al*, 1999 : 577, 578).

1.3.3 Fonctions du neutrophile

1.3.3.1 La phagocytose

Une fois arrivé au niveau du tissu, le neutrophile a la capacité d'ingérer les agents pathogènes et les débris cellulaires par un processus appelé phagocytose. Les phagocytes comme le neutrophile sont équipés de récepteurs spécifiques pouvant reconnaître des cibles particulières au niveau des particules dans le milieu. Cette machinerie complexe médie l'internalisation et l'activation de mécanismes de dégradation desquels résulte une élimination des microorganismes ingérés. Le neutrophile reconnaît des cibles opsonisées et les récepteurs principaux des opsonines sont les récepteurs Fc, qui se lient aux immunoglobulines G (IgG) et un sous-groupe d'intégrine $\beta 2$, qui se lient aux fragments du complément. Les principaux récepteurs Fc du neutrophile naïf sont Fc γ RIIA (CD32) et Fc γ RIIIb (CD16), alors que le récepteur Fc γ RI (CD64) est principalement impliqué lorsque le neutrophile est stimulé avec l'interféron (Warren et *al*, 2003 : 1299). Les cibles opsonisées par les fragments du complément iC3b sont, quant-à-elles, reconnues par l'intégrine MAC1 (CD11b/CD18) (Warren et *al*, 2003 : 1299). Lorsqu'une particule est liée par un des récepteurs mentionnés précédemment, la particule est "engloutie" par une extension de la membrane du neutrophile supportée par la polymérisation d'actine et par l'insertion de nouvelle membrane provenant de la fusion avec des vésicules cytoplasmiques. Une fusion membranaire séquestre ensuite la particule dans un phagosome (sorte de vésicule). Par la suite, la fusion de granules primaires et secondaires et de lysosomes avec le phagosome forme un phagolysosome. Ce dernier contient des peptides anti-microbiens, des enzymes lysosomiques de digestion et des composés oxygénés très réactifs dont l'action va détruire la particule ingérée (De Franco et *al*, 2007 : 70).

1.3.3.2 Flambée oxydative

Afin d'éliminer les organismes pathogènes, le neutrophile a la capacité de libérer des espèces oxygénées hautement réactives par un mécanisme appelé flambée oxydative. Ce phénomène nécessite l'assemblage d'une enzyme appelée NADPH oxydase. Il s'agit en fait d'un complexe à l'intérieur de la cellule composé de sous-unités du cytosol (p40phox, p47phox, p67phox et rac 1/2) et de la membrane plasmique (cytochrome b558). Il y a assemblage des sous-unités cytosoliques et membranaires suite à la phosphorylation de la sous-unité p47phox. Cela engendre un transfert d'électron du NADPH cytosolique vers une molécule de O_2 , ce qui forme l'espèce oxygénée hautement réactive O_2^- , qui est ensuite convertie en H_2O_2 par l'enzyme superoxyde dismutase (Klebanoff, 2005 : 598). Une grande variété d'oxydants réactifs peut ensuite être produite à partir de cette molécule, notamment l'acide hypochlorique (HOCl) (Hampton et *al*, 1998 : 3007).

1.3.3.3 Dégranulation

Afin d'éliminer les organismes pathogènes, le neutrophile libère des médiateurs chimiques par un processus appelé dégranulation. Cette dernière peut se faire de façon intracellulaire, comme c'est le cas au niveau du phagosome lors de la phagocytose (décrit précédemment) ou de façon extracellulaire. Le neutrophile contient quatre principaux types de granules, soient les granules primaires (azurophiles), les granules secondaires (spécifiques), les granules tertiaires et les vésicules sécrétoires. Les granules primaires constituent le site de stockage des médiateurs chimiques les plus toxiques, comme l'élastase, la myéloperoxydase et les défensines. Les granules secondaires et tertiaires contiennent quant-à-elles des enzymes bactéricides moins agressives comme la lactoferrine et la gélatinase. Les vésicules sécrétoires contiennent des protéines plasmatiques comme l'albumine qui ne sont pas synthétisées par le neutrophile, donc le contenu de ces granules provient probablement de l'endocytose de fluide extracellulaire par la cellule (Lacy, 2006 : 99).

Le contenu des granules est libéré de façon extracellulaire lorsque le neutrophile est stimulé par des agents spécifiques (par exemple, le GM-CSF et le fMLP). Suite à cette stimulation, il s'ensuit un recrutement des granules du cytoplasme à la membrane plasmique par un processus dépendant de la réorganisation du cytosquelette d'actine. La translocation au niveau de la membrane plasmique requiert une augmentation du calcium intracellulaire ainsi que l'hydrolyse de l'ATP et du GTP. Ensuite, il y a fusion entre les granules et la portion intracellulaire de la bicouche lipidique de la membrane plasmique, permettant ensuite la libération du contenu des granules dans le milieu extracellulaire (Edwards, 1994 : 59).

1.3.3.4 Apoptose

Suite à l'élimination des organismes pathogènes dans les tissus inflammés par phagocytose et/ou dégranulation, le neutrophile meurt par apoptose, processus également appelé mort cellulaire programmée. Les PMNs ont une demie-vie de 8 à 20 heures et entrent en apoptose même en l'absence de stimuli extérieur, phénomène appelé apoptose spontanée. Cette "mort propre" est nécessaire à la résolution de l'inflammation, étant donné que le contenu du neutrophile est toxique et ne doit pas être déversé en grande quantité dans le milieu extracellulaire suite à l'éclatement de la membrane plasmique, comme c'est le cas lors d'un autre type de mort cellulaire appelé nécrose (Hongbo et *al*, 2008 : 288). Durant l'apoptose spontanée du neutrophile, plusieurs événements communs à l'apoptose classique prennent place, tels l'activation des caspases 1, 3, 4 et 8, la dégradation des protéines du cytosquelette, l'extériorisation des phosphatidylsérines (permettant la reconnaissance du neutrophile apoptotique par le macrophage, dont le rôle est de phagocyter les PMNs apoptotiques dans le milieu), la dépolarisation au niveau de la mitochondrie et la fragmentation de l'ADN (Akgul et *al*, 2001 : 319). Toutefois, chez le neutrophile, il n'y a pas vraiment formation de corps apoptotiques, absence de la protéine pro-apoptotique Bcl-2 et une quantité réduite de cytochrome c (molécule libérée suite à la perméabilisation de la mitochondrie dans la voie intrinsèque de l'apoptose, qui sera expliquée dans les lignes suivantes) (Akgul et *al*, 2001 : 320).

1.3.3.4a Voies apoptotiques

Voie extrinsèque

L'apoptose du neutrophile peut être médiée par l'activation des récepteurs de mort à la surface de la cellule. Le neutrophile exprime les récepteurs de mort TRAILR2, TRAILR3 et Fas. Lorsqu'un récepteur est activé par son ligand, par exemple FasL dans le cas de Fas, le complexe DISC est formé. Ce dernier est constitué du récepteur de mort, d'une protéine adaptatrice (FADD) et de la pro-caspase-8. Il s'ensuit l'autoprotéolyse et l'activation de la caspase-8. Cette dernière active ensuite la caspase-3, une caspase effectrice qui a pour rôle de cliver divers substrats à l'intérieur de la cellule, comme certaines protéines du cytosquelette (Marsden et Strasser, 2003 : 71) (voir figure 2).

Voie intrinsèque

Cette voie implique tout d'abord la dépolarisation de la membrane de la mitochondrie suite à un stress. Il y a par la suite translocation des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 Bid et Bax au niveau de la portion externe de la membrane de la mitochondrie. Cela mène à la libération d'autres facteurs pro-apoptotiques comme la cytochrome c, qui forme l'apoptosome avec les molécules Apaf-1, dATP et la pro-caspase-9. Ce complexe a pour rôle d'activer la caspase-9, qui va à son tour activer la caspase-3, qui elle va cliver plusieurs substrats dans la cellule, comme des protéines du cytosquelette (voir figure 2). Chez le neutrophile, l'activité de la caspase-9 est grandement augmentée lors de l'apoptose, et ce même si la quantité de cytochrome c est très réduite. Il est suggéré que l'activité réduite de la cytochrome c est compensée au niveau de l'apoptosome par une augmentation de l'expression de la molécule Apaf-1 (Hongbo et al, 2008 : 290).

Voie du réticulum endoplasmique

Cette voie est beaucoup moins connue que les deux premières et implique la réponse au stress liée à l'accumulation de protéines mal repliées au niveau du réticulum endoplasmique. Les études de Binet et al, notamment, ont montré que cette voie était activée lors de l'apoptose du neutrophile (Binet et al, 2010).

Les protéines de la cellule sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique où elles sont également repliées et assemblées avant d'être transportées. Dans des conditions cellulaires particulières, des protéines de conformation anormale s'accumulent dans le réticulum endoplasmique et induisent une réponse UPR (unfolded protein response). Cette réponse induit une inhibition de la traduction, ce qui augmente les capacités de repliement des protéines (induction de la production des protéines chaperonnes, impliquées dans le processus) et limite l'arrivée de nouvelles protéines dans le réticulum endoplasmique. Dans le cas où cette réaction adaptative est insuffisante, une réponse apoptotique est déclenchée (Jing *et al*, 2011 : 2) (voir figure 2).

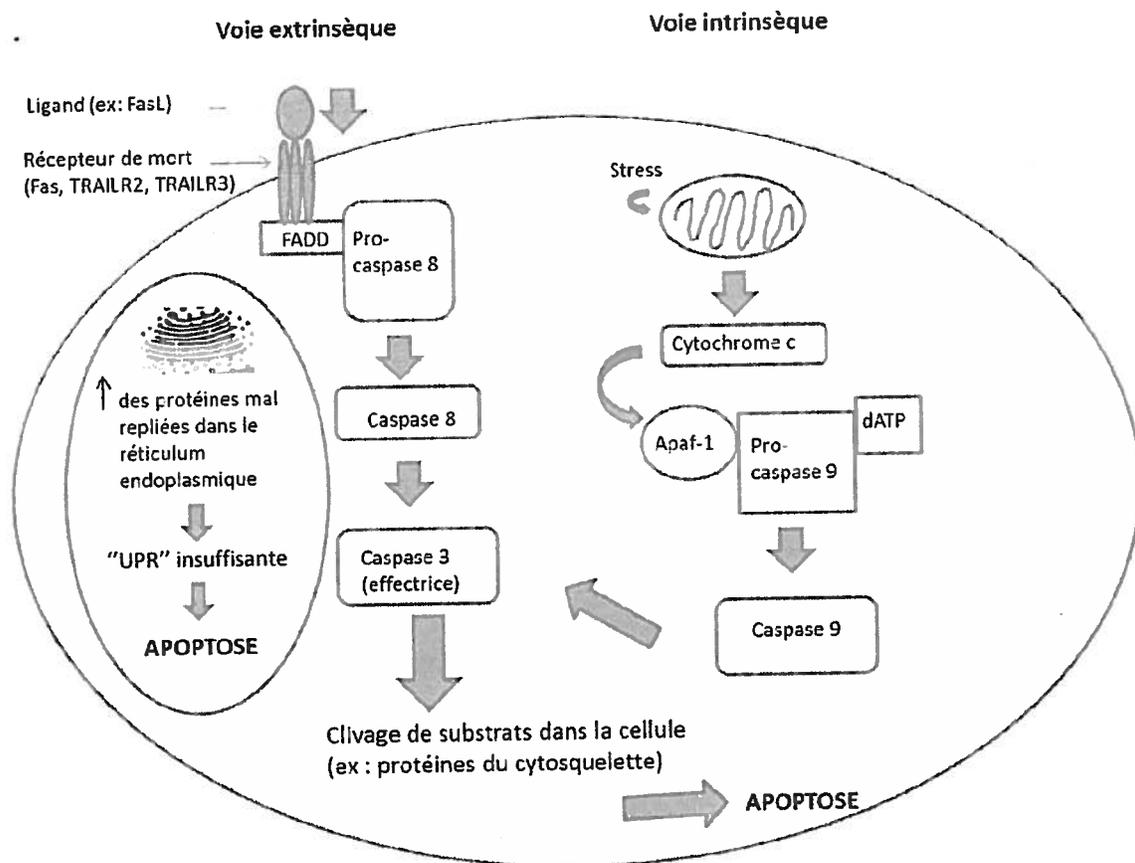


Figure 2 : Voies apoptotiques chez le neutrophile (inspiré de Hongbo *et al*, 2008 : 292)

1.3.3.4b Voies signalétiques de survie et de mort impliquées lors de l'apoptose

La mort cellulaire programmée du neutrophile est en fait le résultat de la régulation à la hausse des signaux de morts accompagné de la régulation à la baisse des signaux de survie. La stimulation du neutrophile par des agents tels le GM-CSF et la cytokine TNF- α augmentent la phosphorylation au niveau des tyrosines chez les MAPKinases. Ces dernières sont des protéines kinases régulées par les signaux provenant de l'extérieur de la cellule et sont d'importants médiateurs dans les voies signalétiques impliquant les récepteurs de mort. Il existe trois principales MAPKinases chez le neutrophile, soit ERK, p38 et JNK (Akgul et *al*, 2001 : 320).

Suite à la stimulation de la cellule avec le GM-CSF, l'activité de ERK est augmentée, ce qui déclenche une voie de survie qui retarde l'apoptose chez le neutrophile. Également, la stimulation du neutrophile par le GM-CSF ou l'IL-8 entraîne une activation de l'enzyme phosphoinositide 3-kinase (PI3-Kinase), qui phosphoryle la protéine kinase B (AKT). Une voie de survie est alors enclenchée via la phosphorylation de Bax (facteur pro-apoptotique), notamment. Chez le neutrophile, la phosphorylation de Bax inhibe son effet au niveau de la mitochondrie par la promotion de l'hétérodimérisation avec les facteurs anti-apoptotiques Mcl-1, Bcl-xl et A1.

En ce qui a trait à la MAPKinase p38, un stress cellulaire telle l'irradiation peut stimuler la molécule et ainsi accélérer l'apoptose. Toutefois, on a montré que l'activité de ERK et de la PI3-Kinase pouvait inhiber cette voie de mort, entraînant un retard de l'apoptose. Également, une voie de mort peut être enclenchée par l'inhibition d'une voie de survie impliquant la MAPKinase p38, qui phosphoryle et inhibe les caspases 8 et 3 (Akgul et *al*, 2001 : 320).

La stimulation du neutrophile par la cytokine TNF- α induit une phosphorylation de la MAPKinase JNK, ce qui enclenche une voie de mort dans la cellule. Également, la cytokine TNF- α peut avoir un effet anti-apoptotique puisqu'il stimule l'activité de la PI3-Kinase ainsi que l'expression des facteurs pro-apoptotiques A1 et Bcl-xL via l'augmentation de leur transcription par le facteur NF- κ B (Hongbo et *al*, 2008 : 292).

1.3.3.4c Modulateurs de l'apoptose du neutrophile

Agents anti-apoptotiques

Comme il a été mentionné précédemment, les cytokines GM-CSF, TNF- α , et IL-8 sont des agents qui peuvent retarder l'apoptose du neutrophile. Également, le LPS, qui est le constituant majeur de la membrane externe des bactéries à gram négatif, est également un agent qui retarde l'apoptose et ce via la phosphorylation de AKT et la régulation à la hausse des facteurs anti-apoptotiques Mcl-1 et A1 (Klein et *al*, 2001 : 335).

Agents pro-apoptotiques

Le trioxyde d'arsenic et *Viscum Album* agglutinin-I (VAA-I) sont des agents pro-apoptotiques du neutrophile. Ils sont d'ailleurs tous deux utilisés dans des thérapies anti-cancer à cause de leurs propriétés cytotoxiques.

Trioxyde d'arsenic

Ce polluant qui peut provenir de l'industrie agricole ou métallurgique est retrouvé dans le sol, l'eau et l'air. Il est utilisé pour traiter la leucémie promyélocytaire aigüe (APL) (Miller et *al*, 2002 : 3893), mais des études cliniques ont montré que l'utilisation de cet agent pouvait entraîner une neutropénie. D'ailleurs, des études ont été effectuées à ce sujet et on a montré que le trioxyde d'arsenic induirait l'apoptose du neutrophile via un mécanisme impliquant un stress au niveau du réticulum endoplasmique (voie du réticulum endoplasmique, discutée plus tôt) (Binet et *al*, 2009 :22 et Binet et *al*, 2010 : 510).

VAA-I

Le gui, du nom latin *Viscum album*, était une plante sacrée des celtes qui ont dominé l'Europe durant le premier millénaire avant Jésus Christ. Elle était appelée *all-healer*, dû à ses nombreuses propriétés thérapeutiques. De nos jours, les Européens incluent *Viscum Album* dans les traitements anti-cancer et comme anti-inflammatoire pour soulager les articulations douloureuses. La lectine I de *Viscum Album*, appelée *Viscum*

Album agglutinin-I (VAA-I), est la lectine la plus étudiée et la plus importante chez cette plante. Des études ont récemment montré que VAA-I induit l'apoptose chez le neutrophile humain via l'inhibition de la synthèse protéique *de novo* (Savoie et al, 2000). L'apoptose induite par VAA-I chez le neutrophile humain entraîne la dégradation des protéines du cytosquelette gelsoline, paxilline, lamine B1 et vimentine, mais pas des protéines vinculine, alpha- et bêta-tubuline (Levastre et al, 2002 et 2005) ce qui suggère un mécanisme d'action spécifique de VAA-I durant l'apoptose.

1.3.3.4d Apoptose et homéostasie

L'apoptose est un mécanisme très important pour le maintien de l'homéostasie. En effet, lorsque le niveau d'apoptose dans le milieu est normal, un nombre de neutrophiles constant est maintenu au site inflammatoire, donc il y a homéostasie. Toutefois, lorsqu'il y a dérégulation au niveau du mécanisme de mort cellulaire programmée, il peut y avoir apoptose excessive des neutrophiles au site inflammatoire. Cela peut engendrer une immunosuppression, donc un risque accru d'infection. À l'opposé, lorsqu'une trop grande quantité de neutrophiles sont présents dans le milieu, une quantité importante d'enzymes bactéricides et d'espèces oxygénées hautement réactives, entre autres, sont libérés par les PMNs au niveau du site inflammatoire. Cela peut engendrer des dommages aux tissus et ainsi causer une exacerbation de l'inflammation. De plus, les atteintes aux tissus peuvent avoir pour conséquence de rendre accessible au système immunitaire des composants du soi qui ne sont normalement pas exposés à ce dernier, ce qui peut potentiellement mener à la production d'auto-anticorps. Ces derniers, en se liant aux antigènes du soi, peuvent s'accumuler dans le milieu et ainsi former des dépôts de complexes immuns. Cela a pour conséquence de stimuler de façon exagérée la réponse immunitaire et engendrer des troubles inflammatoires (voir figure 3).

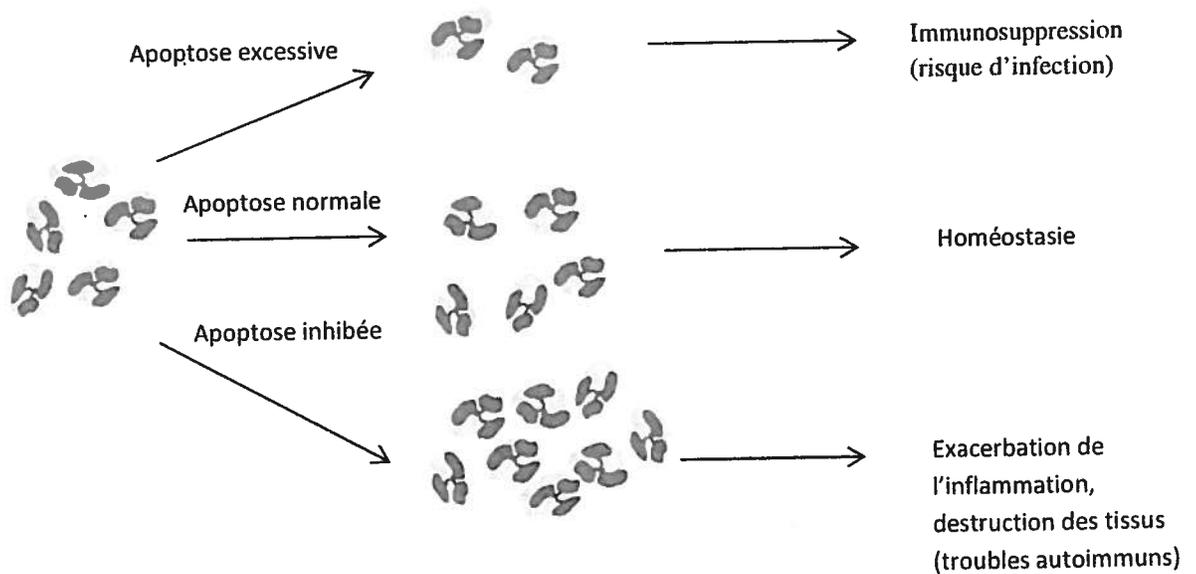


Figure 3 : Apoptose et homéostasie (inspiré de Girard, 2007 : 123)

Chapitre 2 : Apoptose, cytosquelette et protéines ERM chez le neutrophile

Comme il a été mentionné précédemment, il est important de comprendre le mécanisme de l'apoptose chez le neutrophile afin de pouvoir élaborer des stratégies thérapeutiques afin d'être apte, par exemple, à contrôler le nombre de neutrophiles présent au site inflammatoire. L'étude du devenir et du rôle des protéines du cytosquelette de la cellule durant l'apoptose du neutrophile est une façon utilisée pour comprendre en détail le mécanisme de mort cellulaire programmée. En effet, la dégradation des protéines du cytosquelette est un évènement marqueur de l'apoptose.

2.1 Implication du cytosquelette dans l'apoptose du neutrophile

Le cytosquelette des cellules est un réseau complexe de filaments qui jouent un rôle dans de nombreuses fonctions cellulaires, incluant la mitose, la motilité, l'adhésion, la signalisation cellulaire ainsi que la localisation des organelles. Il est composé de trois principaux types de filaments soient les microfilaments, les microtubules et les filaments intermédiaires. Les microfilaments sont les filaments les plus fins du cytosquelette et sont constitués principalement d'actine associée à d'autres protéines structurales (myosine, vinculine et alpha-actinine, notamment). Ils sont impliqués entre autres dans les mouvements de grande ampleur au niveau de la cellule, qui permettent à cette dernière de migrer (Remedios et *al*, 2003 : 433). Les microtubules sont les filaments les plus épais et sont formés de la tubuline alpha et la tubuline bêta. Ils interviennent dans les mouvements intracellulaires, donc la migration des organites à l'intérieur de la cellule. Les filaments intermédiaires sont composés, entre autres, des cytokératines, de la vimentine et de la lamine. Ils maintiennent la forme de la cellule et organisent sa structure tridimensionnelle en maintenant les organelles en place et en servant de composant structural (Chang et *al*, 2004 : 601).

Précédemment, des études ont montré que les protéines gelsoline, vimentine, mais pas la vinculine étaient dégradées lors de l'apoptose spontanée du neutrophile humain

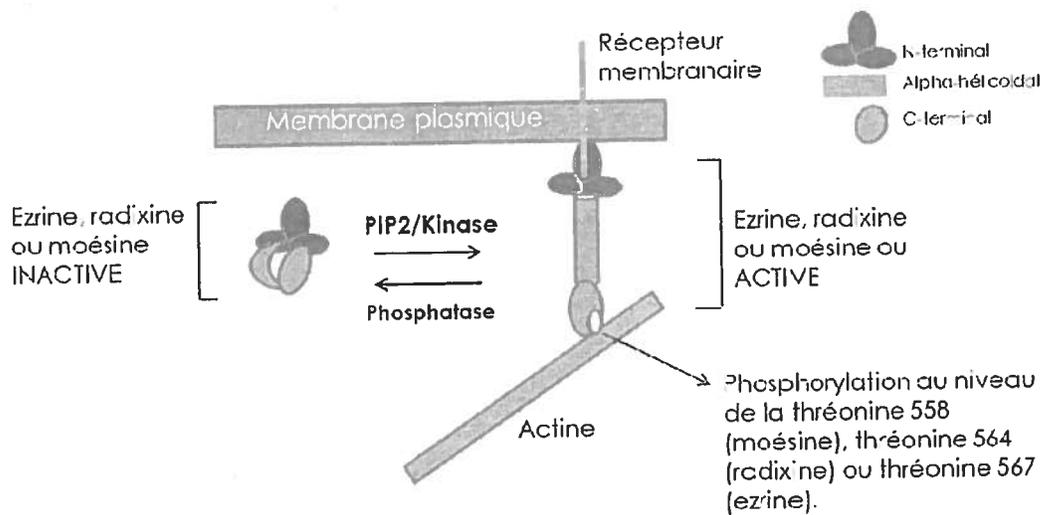
(Levastre et *al*, 2002). Également, on a montré que les protéines lamine B1, paxilline et vimentine étaient dégradées suite à l'induction de l'apoptose chez le neutrophile par l'agent pro-apoptotique VAA-I (Levastre et *al*, 2002 et 2005). Également, une étude a montré que les protéines lamine B1 et vimentine étaient exprimées à la surface du neutrophile en apoptose spontanée (Moisan et *al*, 2006). Il s'agit d'un phénomène physiologiquement pertinent, puisque l'expression de protéines du cytosquelette à la surface du neutrophile en apoptose pourrait potentiellement mener à la production d'auto-anticorps, dont la présence est accrue lors de maladies inflammatoires chroniques comme l'arthrite rhumatoïde (Isaacs, 2010).

2.1.1 Les protéines ERM

Il existe également des protéines faisant partie du cytosquelette qui ne sont pas classées parmi les trois principaux types de filaments, comme l'eitrine, la radixine et la moésine, qui sont des protéines ayant un rôle structural important étant donné qu'elles lient la membrane plasmique au squelette d'actine dans la cellule.

Des études récentes, en ce qui a trait à la transduction des signaux au niveau de la cellule, ont montré l'importance des domaines spécialisés au niveau de la membrane plasmique qui permettent de mettre en interaction ligands, récepteurs et composants situés en aval des voies signalétiques (Fehon et *al*, 2010 : 277). Les régions de la cellule appelées "microvilli" sont de bons exemples de ce type de domaine, où la membrane plasmique et le cytosquelette sont liés par des protéines cytoplasmiques associées à la membrane. Le complexe ERM est formé de trois de ce type de protéine (l'eitrine, la radixine et la moésine) de poids moléculaire semblable (~75 kDa) (Pestonjamas et *al*, 1995 : 247).

Chacune des protéines du complexe ERM sont présentes sous une forme autoinhibée dans le cytoplasme de la cellule. Dans cet état, la portion N-terminale de la molécule interagit avec la portion C-terminale, ce qui masque les sites d'interaction protéines-protéines, gardant la molécule inactive. Les protéines du complexe ERM peuvent être activées suite à leur liaison au phospholipide PIP₂, ce qui induit un changement de conformation de la protéine qui permet la phosphorylation d'un résidu thréonine présent dans la portion C-terminale de la molécule. Cette phosphorylation permet la liaison de chacune des protéines du complexe ERM à l'actine. Également, lorsque ces protéines sont activées, leur domaine N-terminal, appelé FERM (Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin) peut se lier à la portion cytoplasmique de protéines transmembranaires (récepteurs) comme CD44 et ICAM3 (Neisch et *al*, 2011 : 377) (voir figure 4).



**Figure 4 : Phosphorylation (activation) des protéines ERM
(inspiré de Ivetic et *al*, 2004 : 166)**

Lorsqu'elles sont présentes sous forme active, les protéines du complexe ERM jouent un rôle structural, puisqu'elles participent à la maintenance de l'intégrité du cytosquelette de la cellule en liant l'actine à la membrane plasmique. Également, elles jouent un rôle au niveau de la signalisation cellulaire, étant donné qu'elles servent de protéines adaptatrices entre des récepteurs membranaires et des molécules situées en aval des voies signalétiques.

2.1.1.1 Les protéines ERM et l'apoptose

Lors de l'apoptose induite par FasL chez les cellules de Jurkat, la phosphorylation (activation) de l'eitrine et la moésine jouerait un rôle crucial. En effet, on a montré que la phosphorylation de l'eitrine et la moésine par la protéine kinase ROCK est un évènement prenant place au début de l'apoptose lors de l'induction de cette dernière par FasL. En fait, la phosphorylation des protéines eitrine et moésine serait nécessaire pour qu'elles jouent leur rôle de protéine adaptatrice dans la transmission du signal de mort entraînant l'activation de la caspase 8 via le récepteur Fas (Hébert et *al*, 2008). Également, les protéines ERM seraient des substrats possibles de la caspase-9 chez les cellules NSCLC (cellules du cancer du poumon) (Checinska et *al*, 2009).

2.1.1.2 Les protéines ERM chez le neutrophile

Peu est connu en ce qui a trait au rôle que pourrait jouer les membres du complexes ERM dans la liaison entre la membrane plasmique et le cytosquelette chez les cellules dynamiques comme les neutrophiles, étant donné la nature transitionnelle des protusions à la surface de la membrane (Pestonjamas et *al*, 1995 : 247). Toutefois, on sait que les protéines du complexe ERM exprimées chez le neutrophile, soient la moésine et l'eitrine, se lient à la queue cytoplasmique du récepteur PSGL-1 (Zarbok et *al*, 2007). L'interaction de ce récepteur avec les protéines ERM est nécessaire à la transmission du signal "rolling" (roulement du neutrophile sur les cellules endothéliales, mécanisme discuté précédemment), évènement précédent l'adhésion ferme du neutrophile sur les cellules endothéliales, puis sa migration vers le tissu infecté. En effet, on a montré que les protéines eitrine et moésine servent de protéines adaptatrices entre le récepteur PSGL-1 et la tyrosine kinase SYK, dont la phosphorylation par PSGL-1 est essentielle à la transmission du signal "rolling". C'est la présence d'un motif ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif-like) dans la portion N-terminal des protéines du complexe ERM qui leur permettent d'interagir avec la tyrosine kinase SYK (Urzainqui et *al*, 2002).

Également, on a montré que durant la formation du phagosome chez le neutrophile humain, le phospholipide PIP₂ ainsi que la moésine sont moins exprimés au niveau de la membrane plasmique chez le neutrophile au repos (qui n'effectue pas la phagocytose) (Minakami et *al*, 2010). Donc, on peut supposer qu'il y aurait perte d'intégrité (dégradation) de la protéine moésine lors de la phagocytose du neutrophile. Toutefois, davantage d'études doivent être effectuées à ce sujet.

Donc, le rôle et le comportement des protéines ERM a été étudié chez le neutrophile dans le cadre de ses fonctions d'adhésion, de migration et de phagocytose. Toutefois, le comportement et/ou rôle que pourrait jouer les protéines du complexe ERM dans l'apoptose du neutrophile n'a pas encore été investigué et ce même s'il s'agit d'une fonction essentielle pour la résolution de la réponse inflammatoire. Également, le rôle possible que pourrait jouer les protéines ERM du neutrophile dans le développement d'une pathologie inflammatoire chronique comme l'arthrite rhumatoïde n'a pas encore été étudié.

Chapitre 3 : L'arthrite rhumatoïde

L'arthrite rhumatoïde est la maladie inflammatoire systémique que l'on retrouve le plus dans la population adulte. Elle affecte de 0,5 à 1 % de celle-ci à travers le monde. Sa cause exacte est encore inconnue, mais une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux pourrait être en cause. Les principaux symptômes sont une inflammation au niveau des articulations qui se traduit par des douleurs, des gonflements et des raideurs. La réponse auto-immunitaire principale dans cette pathologie serait une réponse cellulaire T CD4 (lymphocytes T auxiliaires) à un ou plusieurs auto-antigènes présents dans la membrane qui tapisse la cavité articulaire, appelée synoviale (De Franco et al, 2007 : 298). En effet, on observe chez les patients souffrant d'arthrite rhumatoïde une accumulation dans les articulations d'un liquide contenant des neutrophiles, des cellules T CD4, des macrophages et leurs cytokines inflammatoires (TNF, IL-1 et IL-6, entre-autres), ainsi que des cellules B (voir figure 5). La structure lymphoïde tertiaire formée à ce niveau par les lymphocytes T et les macrophages indique qu'une réponse immunitaire aurait lieu par l'entremise de la reconnaissance d'auto-antigènes présents dans la synoviale par les cellules T, mais ces auto-antigènes ne sont pas encore clairement identifiés. La réponse chronique des lymphocytes T conduisent à l'érosion de l'os, du cartilage et des ligaments, et cette destruction des articulations serait causée par la libération d'une cytokine des cellules T CD4 appelée ligand RANK. Ce dernier stimule l'activité des ostéoclastes, responsables de la résorption osseuse et des chondroclastes, qui dégradent le cartilage (De Franco et al, 2007 : 299).

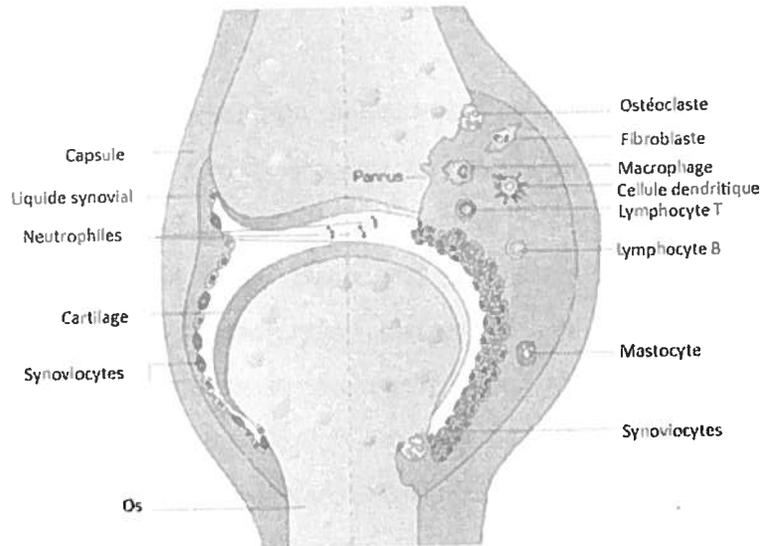


Figure 5 : Pathologie de l'arthrite rhumatoïde : accumulation des cellules immunitaires dans le liquide synovial (inspiré de Smolen et *al*, 2003 :474)

3.1 Le rôle des auto-anticorps dans l'arthrite rhumatoïde

3.1.1 Les facteurs rhumatoïdes

La formation d'anticorps dirigés contre les composants du soi pourrait jouer un rôle important dans la pathologie de l'arthrite rhumatoïde. Premièrement, des facteurs rhumatoïdes sont produits par les cellules B retrouvés dans le liquide synovial. Ces derniers sont des auto-anticorps (IgM ou IgG) qui reconnaissent la partie constante (Fc) des molécules IgG du soi. Ils sont retrouvés dans le sérum des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde, et constituent les premiers auto-anticorps utilisés dans le diagnostic de la pathologie lorsqu'elle a été décrite pour la première fois, il y a plus de 60 ans (Braun-Moscovici et *al*, 2006 : 497). Ils pourraient être à la fois des marqueurs de la pathologie et contribuer à cette dernière par la formation de complexes immuns retrouvés dans le liquide synovial. Les complexes immuns formés au niveau de l'articulation peuvent activer la cascade du complément, ce qui agit sur les mastocytes synoviaux pour déclencher l'inflammation par la libération de TNF et d'IL-1. Ces cytokines agissent au niveau des cellules endothéliales et provoquent la libération des neutrophiles du vaisseau

sanguin. Ces derniers sont stimulés au niveau de leur récepteur FcγRIIB par les complexes immuns et libèrent des enzymes protéolytiques comme l'élastase. Également, les neutrophiles vont libérer au contact des complexes immuns des métabolites de l'acide arachidonique ainsi que des espèces oxygénées hautement réactives, phénomènes qui vont conduire à une augmentation de l'érosion au niveau des composants de l'articulation et ainsi accentuer la réponse inflammatoire (De Franco et *al*, 2007 : 299).

3.1.2 Les anticorps anti-vimentine citrullinée

L'analyse de la présence des facteurs rhumatoïdes est aujourd'hui considérée comme une méthode de détection peu sensible (50-80 %) et peu spécifique (70-80%) (Braun-Moscovici et *al*, 2006 : 497), ce qui a conduit à chercher d'autres auto-anticorps présents chez les patients souffrant d'arthrite rhumatoïde. Ainsi, des anticorps dirigés contre un grand nombre de composants intra et extracellulaires ont été découverts, par exemple le collagène et des produits de dégradation des immunoglobulines IgG. Ce sont toutefois les auto-anticorps dirigés contre la vimentine citrullinée qui ont retenu davantage l'attention des chercheurs au cours des dernières années.

Les anticorps dirigés contre les peptides du soi ayant subi la citrullination (anti-citrullinated peptide antibody, ACPA) ont été décrits pour la première fois en 1998 et sont retrouvés dans le liquide synovial des patients souffrants d'arthrite rhumatoïde. La détection de ces auto-anticorps est une méthode hautement spécifiques (98 %) et sensible (80%) pour cette pathologie, contrairement à la détection des facteurs rhumatoïdes (Isaacs, 2010). Des ACPA ont même été retrouvés chez des individus jusqu'à 9 ans avant l'apparition de la maladie, suggérant que la production de ces auto-anticorps seraient l'un des premiers évènements à prendre place dans le développement de la maladie. La citrullination est une modification post-traductionnelle durant laquelle un résidu arginine est remplacé par un résidu citrulline dans la protéine. Elle est surtout connue pour se produire lors de l'apoptose des cellules suite à l'activation de l'enzyme PAD (peptidyl arginine deaminase), qui est sensible à une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, phénomène qui se produit lors de l'apoptose (Snir et *al*, 2010). En se basant sur ce fait, Pruijn et *al* ont d'ailleurs proposé un mécanisme de production des ACPA dans la pathologie de l'arthrite rhumatoïde. Un processus inflammatoire chronique comme on observe lors de cette maladie donne lieu à énormément de cellules en apoptose dans le milieu, ce qui cause une augmentation de la concentration du calcium cytosolique et ainsi l'activation de l'enzyme PAD, entraînant la citrullination des protéines à l'intérieur des cellules. Ces protéines seraient présentés aux lymphocytes T par un mécanisme encore inconnu. Puis, étant donné que la conversion d'un résidu arginine en un résidu citrulline entraîne un changement dans la charge de la protéine, des

expérimentations ont été effectuées en ce qui a trait au lien entre la citrullination des protéines et l'affinité de ces dernières pour le complexe majeur d'histocompatibilité. L'équipe de Pruijn a ainsi montré que le citrullination, en plus d'augmenter l'affinité des peptides pour le complexe majeur d'histocompatibilité, pouvait également entraîner l'activation des lymphocytes T CD4. Étant donné que l'activation de ces cellules est importante dans la réponse des lymphocytes B, il est possible que le mécanisme décrit soit à l'origine de la production des anticorps dirigés contre les protéines citrullinées du soi par les cellules B. Ainsi, une grande quantité de ces anticorps étant produits, des complexes immuns peuvent être formés, maintenant ainsi un état inflammatoire (un cercle vicieux s'établit) (Prujn *et al*, 2010).

Les principaux anticorps dirigés contre les protéines citrullinées du soi retrouvés jusqu'à maintenant dans la pathologie de l'arthrite rhumatoïde sont dirigés contre la fibrine, une protéine du plasma sanguin jouant un rôle dans la coagulation et la vimentine, une protéine composant les filaments intermédiaires du cytosquelette de la cellule. Toutefois, les études de Van Steendam (Van Steendam *et al*, 2010) et celles de Snir *et al* (Snir *et al*, 2010) montrent que les anticorps dirigés contre la vimentine citrullinée sont les plus présents dans la pathologie de l'arthrite rhumatoïde. Comme il a été mentionné plus tôt, le mécanisme de présentation des protéines citrullinées au système immunitaire demeure inconnu. Toutefois, les dommages effectués aux tissus lors de l'inflammation chronique pourraient possiblement libérer des constituants de la cellule qui ne sont normalement pas exposés au système immunitaire, par exemple la vimentine. Également, comme il a été mentionné précédemment, le nombre élevé de cellules en apoptose dans le milieu pourrait augmenter la quantité de protéines citrullinées et s'il s'avérait que ces dernières soient exposées à la surface des cellules durant le processus de mort programmé, il pourrait y avoir activation des cellules immunitaires et production d'anticorps.

3.2 Implication des neutrophiles dans l'arthrite rhumatoïde

Un modèle d'arthrite rhumatoïde chez la souris a récemment montré que les neutrophiles sont les premières cellules du système immunitaire à s'infiltrer dans l'articulation et à s'accumuler dans le liquide synovial. Également, les neutrophiles sont les cellules les plus abondantes dans le liquide synovial et les signes initiaux d'inflammation au niveau de l'articulation corrént d'ailleurs avec la présence des neutrophiles à cet endroit (Cascão et *al*, 2010).

Les PMNs peuvent également se retrouver dans les tissus synoviaux, à l'interface entre le pannus et le cartilage, qui est une région où il y a destruction de l'os. Lorsqu'ils s'infiltrent au niveau du liquide synovial, les neutrophiles rencontrent des dépôts de complexes immuns (aggrégats d'immunoglobulines) qui activent leurs récepteurs Fcγ. Cela déclenche la dégranulation du neutrophile ainsi qu'une libération d'espèces oxygénées hautement réactives (ROS) dans le liquide synovial (Pillinger et *al*, 1995). On a d'ailleurs montré que le stress oxydatif résultant d'une grande libération de ces ROS par le neutrophile était impliqué dans la pathologie de l'arthrite rhumatoïde. En effet, la molécule O_2^- cause des dommages à l'ADN, l'oxydation des lipides, des protéines et des lipoprotéines et causerait des mutations chez les immunoglobulines, phénomènes observés chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde. Également, la dégranulation du neutrophile dans le liquide synovial peut engendrer des dommages qui contribueraient à la pathologie, telle la destruction par les enzymes libérés de la matrice de collagène au niveau du cartilage (Hichton et *al*, 2004 et Rasheed, 2008).

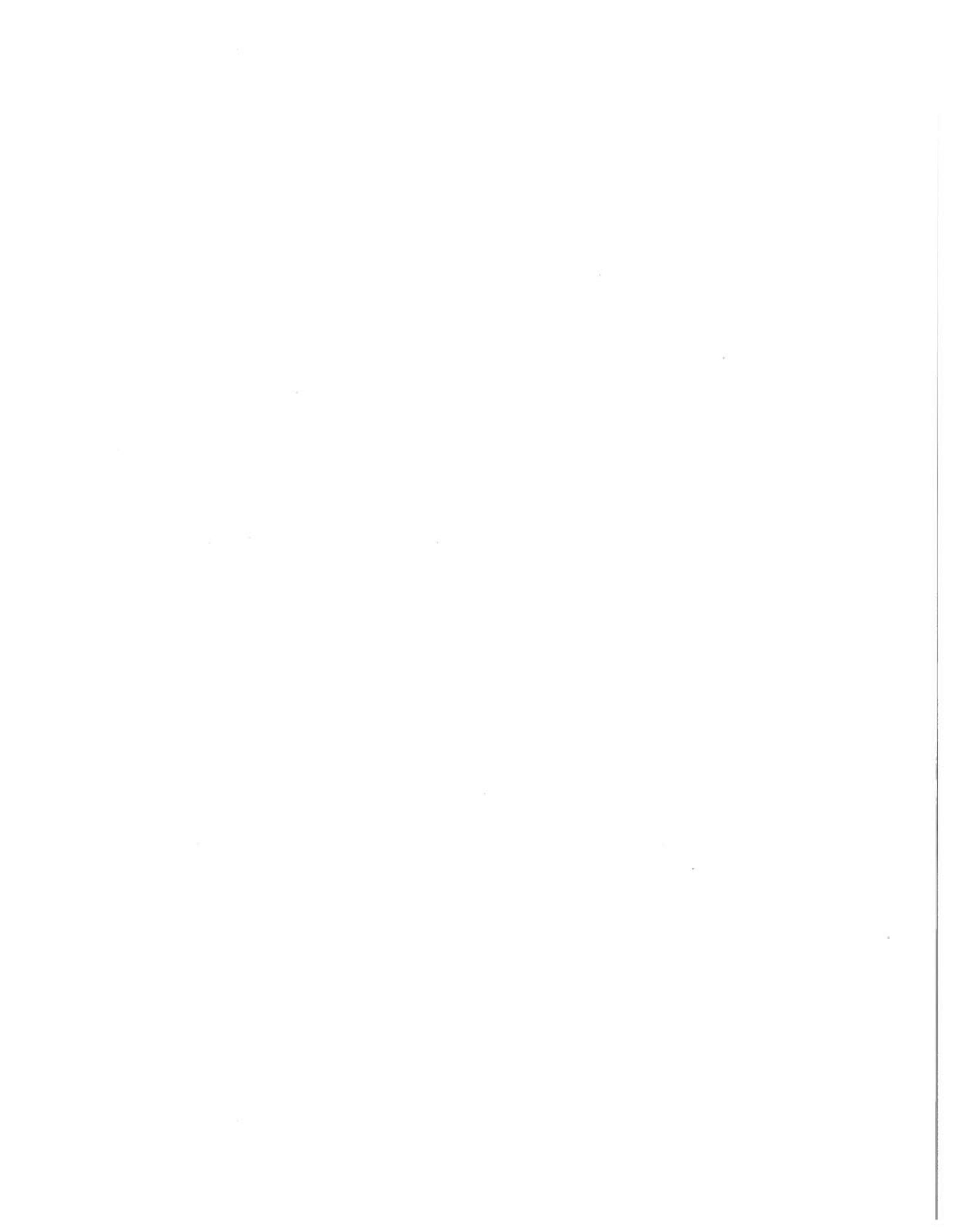
Puis, étant donné la grande quantité de neutrophiles présents dans le liquide synovial chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde et le fait que ces cellules entrent en apoptose spontanée, il est intéressant de se questionner sur l'implication du mécanisme de mort cellulaire programmée dans cette pathologie. Le neutrophile exprime l'enzyme PAD4, qui est responsable de la citrullination de l'arginine à l'intérieur de la protéine. Cette dernière est activée lors de l'apoptose du neutrophile, dû au flux de calcium intracellulaire élevé (Cascão et *al*, 2010). Les auto-anticorps dirigés contre les peptides

citrullinés (particulièrement la vimentine) sont présents à un stade initial de la pathologie de l'arthrite rhumatoïde (Isaacs, 2010), ce qui suggère que les neutrophiles, en tant que source d'enzyme PAD4, pourraient contribuer à la formation de ces auto-anticorps. Les travaux de Moisan et *al* (Moisan et *al*, 2006) qui montrent la présence de la protéine vimentine à la surface du neutrophile en apoptose appuient cette hypothèse.

Également, il est connu que lorsque stimulé dans liquide synovial de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde, le neutrophile peut exprimer à sa surface le CMH de classe II, ce qui en fait potentiellement une cellule présentatrice d'antigène (Iking-Konert et *al*, 2005).

En ce qui a trait aux protéines ERM, il est intéressant de noter que des auto-anticorps anti-moésine et anti-ezrine ont été retrouvés chez des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde (Wagatsuma et *al*, 1996). Également, des anticorps anti-moésine ont été retrouvés dans le sérum de patients souffrant d'anémie aplasique, une pathologie dont la majorité des malades ont déjà souffert d'arthrite rhumatoïde (Takamatsu et *al*, 2007). Il est donc d'intérêt d'étudier la présence de ces protéines du cytosquelette à la surface du neutrophile en apoptose, puisque ce phénomène pourrait être à l'origine de la production d'auto-anticorps.

SECTION 2 : ARTICLE



Résumé en français de l'article

Titre : Comportement des protéines moésine et ezrine durant l'apoptose du neutrophile humain

Nous avons récemment montré que les protéines faisant partie des filaments intermédiaires vimentine et lamine B1 sont exprimées à la surface du neutrophile humain en apoptose spontanée, contrairement aux protéines faisant partie des microtubules et des microfilaments. Les protéines ERM (ezrine-radixine-moésine) sont trois protéines formant un complexe et sont connues pour être impliquées dans l'adhésion cellulaire et la migration. Les neutrophiles expriment l'ezrine et la moésine, mais pas la radixine. Dans la présente étude, nous avons montré par immunobuvardage de type Western et immunofluorescence que l'ezrine et la moésine, qui lient les filaments d'actine à la membrane plasmique, étaient déphosphorylées après 30 minutes d'incubation (apoptose spontanée). Nous avons également montré que l'ezrine est dégradée lors de l'apoptose spontanée du neutrophile, alors que la dégradation de la moésine a uniquement pu être observée lors de l'induction de l'apoptose du neutrophile par un agent externe, lorsque le taux d'apoptose dans le milieu avoisine les 100%. Cela suggère que le mécanisme de dégradation de l'ezrine est différent de celui de la moésine. L'expression et la localisation de l'ezrine et de la moésine ont également été étudiées par immunofluorescence, ce qui a révélé une re-localisation claire de ces deux protéines durant l'apoptose. Finalement, des expériences de cytométrie en flux ont montré que la moésine et l'ezrine étaient exprimées à la surface du neutrophile en apoptose, ce qui pourrait être un mécanisme responsable de l'apparition d'auto-anticorps dirigés contre les protéines ERM, auto-anticorps qui ont été retrouvés dans le sérum de patients souffrant de maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde.

Contribution des auteurs de l'article

Contribution personnelle

J'ai participé à la majorité des expériences mentionnées dans l'article. Premièrement, j'ai isolé les neutrophiles et les ai incubé avec ou sans les différents agonistes (VAA-I, ATO, GM-CSF et Calyculine A). Également, j'ai déterminé le pourcentage d'apoptose dans les milieux réactionnels par cytologie. Puis, j'ai effectué les expériences d'immunobuvardage de type Western (dégradation et déphosphorylation des protéines) ainsi que de cytométrie en flux (expression des protéines à la surface de la cellule). J'ai également effectué les expérimentations de microscopie confocale (co-localisation des protéines ezrine et moésine dans la cellule) et participé à la planification des expériences, à l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit. Ma contribution a permis de constater que la moésine et l'ezrine étaient déphosphorylées et dégradées lors de l'apoptose du neutrophile, et que ces deux protéines étaient exprimées à la surface du neutrophile en apoptose.

Contribution des co-auteurs

M. Simard a effectué les expérimentations de microscopie à immunofluorescence, ce qui a permis de montrer la re-localisation des protéines ezrine et moésine durant l'apoptose du neutrophile.

M. Girard est le responsable de l'étude. Il a participé à la conception des expériences, à l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit.

Texte original de l'article

Behavior of moesin and ezrin during apoptosis in human neutrophils.

Simon MM, Simard JC, Girard D¹

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

¹Corresponding author:

Denis Girard

INRS-Institut Armand-Frappier

531 boul. des Prairies, Laval, QC, Canada, H7V 1B7

E-mail : denis.girard@iaf.inrs.ca

Phone: (450) 687-5010 (x-8847); fax: (450) 686-5309

Running title: ERM proteins and apoptotic neutrophils

En preparation pour la revue Cell Health and Cytoskeleton

ABSTRACT

We have recently reported that the two intermediate filament proteins vimentin and lamin B₁ are expressed on cell surface of human neutrophils during spontaneous apoptosis (SA) whereas proteins from the microtubules or microfilaments are not. ERM proteins (ezrin/radixin/moesin) are three closely related cytoskeletal proteins known to be particularly involved in cell adhesion and migration. Neutrophils are known to express ezrin and moesin but not radixin. In the present study, we found that the actin-binding membrane-anchoring protein ezrin and moesin are both dephosphorylated within 30 min after cell incubation, as assessed by western blot and immunofluorescence assays. However, only ezrin is cleaved only during SA, while moesin cleavage was only observed during experimentally-induced apoptosis, in which almost 100% of cells are apoptotic, suggesting that the pathway required for moesin degradation is distinct from that of ezrin. The expression and localization of ezrin and moesin were also investigated by immunofluorescence, and revealed a clear re-localization of both proteins during apoptosis. Given the presence of these two proteins detected by flow cytometry at the cell surface of apoptotic neutrophils, this may represent a mechanism responsible for the appearance of auto-antibodies directed against ERM proteins, which have been found in the serum of patients suffering from autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis.

Keywords: Neutrophils, apoptosis, ezrin, moesin.

INTRODUCTION

Polymorphonuclear neutrophil cells (PMNs) are the most abundant human leucocytes in circulation. They are particularly known for their roles in innate immune response and are highly involved in inflammation. One of the best mechanisms for the resolution of inflammation involves apoptosis of PMNs which are then eliminated by professional phagocytes including macrophages. Although there is extensive literature regarding caspase activation and cell signalling events involved in PMN apoptosis [1-5], the characterization, re-organization and behaviour of cytoskeletal proteins is far from being fully understood. In the past few years, we have demonstrated that microfilament (MF)-associated proteins (MFAP) gelsolin, paxillin, and non-muscle myosin heavy chain IIA (NMHC-IIA), but not vinculin, are cleaved during spontaneous apoptosis (SA), as well as during agent-induced cell apoptosis (e.g. the plant lectin *Viscum album* Agglutinin-I (VAA-I)) [6-10]. VAA-I is a potent pro-apoptotic molecule not only in mature PMNs but also in promyelocytic PLB-985 cells, eosinophilic AML14.3D10 cells and primary mature eosinophils [9, 11, 12]. Interestingly, while the two major microtubule (MT) proteins α - and β -tubulin are not cleaved by VAA-I, another pro-apoptotic agent, arsenic trioxide, induces cleavage of these two proteins in human PMNs [13], indicating the presence of selective mechanisms involved in cytoskeleton breakdown during PMN apoptosis. In addition, the two intermediate filament (IF) proteins vimentin and lamin B₁, the only INFIL proteins known to be expressed in human PMNs, are also cleaved during SA and in response to VAA-I and expressed on the cell surface of apoptotic PMNs [14]. Therefore, to date, among the three major types of cytoskeletal filaments (MF, INFIL and MT) tested, only proteins of the INFIL, vimentin and lamin B₁, are known to be

expressed on the cell surface of apoptotic human PMNs by an as yet unknown mechanism; their role is still unknown but may represent a source of autoantigens.

The ERM proteins (ezrin/radixin/moesin) are three closely related cytoskeletal proteins of similar molecular weight (~75 kDa) principally located in microvilli where the plasma membrane is linked to the cytoskeleton [15]. ERM proteins are known to be enriched in membrane ruffles, cell-cell junctions, the cleavage furrow of dividing cells, and link integral membrane proteins to the cortical actin cytoskeleton that lies just beneath the plasma membrane [15, 16]. In their active conformation, the N-terminal domain of ezrin, radixin and moesin binds to the cytoplasmic tail of transmembrane proteins, while the C-terminal domain binds to the F-actin cytoskeleton. ERM proteins also exist in an auto-inhibited conformation, in which the N-terminal domain is masked by the remainder of the molecule. Ezrin and moesin, but not radixin, are expressed in lymphocytes, monocytes and neutrophils, moesin being quantitatively predominant. In PMNs, members of the ERM family play an important role because reversible actin-membrane linkage is essential for the maintenance of cell shape, cell adhesion and migration of these leucocytes [15]. Curiously, there is presently no data regarding the role and behaviour of ERM proteins during PMN apoptosis, an essential mechanism for modulating PMN homeostasis and inflammation. In the present study, we report that both moesin and ezrin are dephosphorylated, cleaved, re-localized and expressed at the cell surface of apoptotic human PMNs.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals, agonists, and antibodies. RPMI 1640, HEPES, penicillin/streptomycin (P/S), bovine serum albumin (BSA), *Viscum album* agglutinin-1 (VAA-I), arsenic trioxide (ATO), mouse monoclonal anti-gelsolin antibody (clone GS-2C4) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO).

Rabbit polyclonal anti-human Ezrin/Radixin/Moesin and anti-phospho-Ezrin (Thr567)/Radixin(Thr564)/Moesin(Thr558) antibodies were purchased from Cell Signaling Technology, Inc. (Davers, MA). Mouse monoclonal anti-vimentin (clone V9), mouse monoclonal anti-human ezrin (3C12) and rabbit polyclonal anti-phospho-ezrin(Thr567) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA). Mouse monoclonal anti-human moesin and rabbit polyclonal anti-phospho-moesin(Thr558) antibodies were from Abcam (San Francisco, CA, USA). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse and goat anti-rabbit antibodies, goat and rabbit immunoglobulin G (IgG; Fab')₂ fragment-specific PE-conjugated AffiniPure F(ab')₂ fragments were purchased from Jackson ImmunoResearch (WestGrove, PA). Control isotopic antibody Ms IgG1 was obtained from PharMingen (Mississauga, Ontario, Canada). Recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) was purchased from PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ). Phalloidin-Alexa Fluor 568 and goat anti-mouse Alexa Fluor 488 conjugate were obtained from Molecular Probes (Camarillo, CA, USA). Vectashield containing DAPI was ordered from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA). Calyculin A was purchased from Biomol Research laboratories Inc (Plymouth meeting, PA).

Human Neutrophil isolation. PMNs were isolated from the venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Baie d'Urfé, Québec, Canada), as described previously (1). Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to our institutionally approved procedures. Cell viability (>98%) was monitored by trypan blue exclusion, and the purity (>98%) was verified by cytology from cytocentrifuged preparations colored with the Hema 3 stain set (Biochemical Sciences Inc., Swedesboro, NJ).

Assessment of neutrophil apoptosis. Freshly isolated human PMNs (10×10^6 cells/mL in RPMI 1640-HEPES-P/S, supplemented with 10% autologous serum) were incubated for 22 h in the presence or absence of PMN agonists. Cytocentrifuged samples of PMNs were prepared using a Cyto-tek® centrifuge (Miles Scientific, Naperville, IL) and processed as documented previously (1). Cells were examined by light microscopy at 400x final magnification, and apoptotic PMNs were defined as cells containing one or more characteristic, darkly stained pyknotic nuclei.

Western blot. PMNs (10×10^6 cells/mL) were incubated in the presence or absence of agonists for the indicated periods of time, and the expression of cytoskeletal proteins was performed by Western blot as published previously [9]. Briefly, cells were harvested for the preparation of cell lysates in 2x Laemmli's sample buffer. Aliquots corresponding to 1

$\times 10^6$ cells were loaded onto 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred from gel to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Nonspecific sites were blocked with 5% BSA (ezrin, moesin and gelsolin) in Tris-buffered saline-Tween (25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 190 mM NaCl, 0.15% Tween-20) for 1 h at room temperature. Membranes were washed and incubated with anti-human cytoskeletal antibodies [mouse monoclonal anti-ezrin (1:1000), rabbit polyclonal anti-phospho-ezrin (1:1000), mouse monoclonal anti-moesin (1:1000), rabbit polyclonal anti-phospho-ezrin (1:1000), mouse monoclonal anti-gelsolin (1:1000), rabbit anti-ERM (1:1000) or rabbit polyclonal anti-P-ERM (1:1000)] overnight at 4°C. After several washes, membranes were incubated with HRP-labeled goat anti-mouse IgG antibody (1:25000) or HRP-labeled goat anti-rabbit IgG antibody (1:25000) for 1h at room temperature in fresh blocking solution. Bands were revealed with the enhanced chemiluminescence-Western blotting detection system (Amersham Pharmacia Biotech Inc.).

Immunofluorescence microscopy. After incubation with indicated agents, cells were cytocentrifuged on glass coverslips (Fisher Scientific), fixed and permeabilized in 3.7 % paraformaldehyde (Sigma) + 0.1% digitonin (Sigma) at R/T for 20 min. After four washes with PBS, cells were incubated with primary antibodies (mouse anti-human specific for ezrin or moesin (5 μ g/mL)) for 40 min at 37 °C After four washes with PBS, cells were incubated with 2U of phalloidin-Alexa Fluor 568 and/or 3 μ g/mL of goat anti-mouse Alexa Fluor-488 conjugate for 40 min at 37 °C. After four washes with PBS, coverslips were mounted with Vectashield + DAPI (Vector Laboratories). Fluorescent-

labeled cells were captured from high-power fields (400X) observed with a photomicroscope Leica equipped with an ebq 100 dc epifluorescent condenser. Images were taken with a Cooke Sensicam high-performance camera (Applied Scientific Instrumentation) coupled to the Image Pro-plus (Version 4.0; Media Cybernetics) program.

For confocal immunofluorescence microscopy, cells were cytocentrifuged on glass coverslips (Fisher Scientific), fixed and permeabilized in 3.7% paraformaldehyde (Sigma) + 0.1% digitonin (Sigma) at room temperature for 20 min. After four washes with PBS, cells were incubated with either mouse anti-human specific for ezrin or moesin (5µg/mL) for 40 min at 37 °C: After four washes with PBS, cells were incubated with 2U of phalloidin-Alexa Fluor 568 and/or 3µg/mL of goat anti-mouse Alexa Fluor-488 conjugate for 40 min at 37 °C. Cells were washed 4X with PBS and coverslips were mounted with Vectashield. Samples were analyzed with an oil immersion Nikon Plan Apo 100 (Toronto, Ontario, Canada, numerical aperture 1.4) objective mounted on a Nikon Eclipse E800 microscope equipped with a Bio-Rad Radiance 2000 confocal imaging system (Bio-Rad, Hercules, CA).

Cell surface expression of cytoskeletal proteins by flow cytometry. PMNs (10×10^6 cells/mL RPMI-HEPES-P/S) were incubated at 37°C, 5% CO₂, in the presence or absence of proapoptotic agent VAA-I for 22 h. Cells were harvested in cold PBS and blocked with PBS containing 20% autologous serum for 30 min on ice. Cells were washed in PBS and incubated for 30 min on ice with 2 µg/ml mouse monoclonal anticytoskeletal antibodies

(anti-vimentin (V9), anti-moesin or anti-ezrin). Appropriate isotypic control antibody (Mouse IgG1) was used to compare with the proteins of interest. Cells were washed in PBS and incubated for 30 min on ice with FITC-conjugated goat anti-mouse. Cell surface expression was analyzed using a FACScan. Results are expressed as a Mean Fluorescence Intensity (MFI) obtained by subtracting the GMean value of the corresponding isotypic control from the GMean value obtained with the anti-cytoskeletal antibody directed against the protein of interest.

RESULTS

Rapid dephosphorylation of ERM proteins in human neutrophils. As assessed by immunoblotting, an important pool of ERM proteins is phosphorylated in freshly isolated human PMNs (**Fig. 1A**). However, after 30 min of incubation, ERM proteins are markedly dephosphorylated in PMNs which undergo spontaneous apoptosis (SA) i.e. incubated in medium supplemented with 10% heat-inactivated autologous serum without addition of any agents. In general, 30-50% of cells are apoptotic after 22 h under these conditions. Thus, dephosphorylation of ERM proteins may represent an early event of SA. The dephosphorylation of ERM proteins was confirmed by immunofluorescence (**Fig. 1B**), where the intensity of the fluorescent signal was markedly decreased after 30 min of incubation.

Dephosphorylation of moesin during human neutrophil spontaneous apoptosis. Moesin was previously found to be the quantitatively dominant ERM protein in human leukocytes, including PMNs [17]. Since moesin dephosphorylation has been shown to occur during the first few hours prior to cell apoptosis in fibroblasts [18], we investigated its potential dephosphorylation over time in human PMNs during SA. Using an antibody directed against the phosphorylated form of moesin (threonine 558), we clearly observed that the level of phosphorylation of moesin (p-moesin) was decreased after 30 min, and this was more pronounced over time (**Fig. 2**). This was not due to a loss of moesin expression over time, since the unphosphorylated form of moesin remained stable (**Fig 2**).

Moesin is not degraded during neutrophil spontaneous apoptosis. Since cytoskeletal breakdown occurs in 22 h-aged PMNs (SA), as evidenced by cleavage of several cytoskeletal proteins, we decided to compare cleavage of moesin during SA versus GM-CSF-induced suppression of apoptosis. Unexpectedly, we found that the expression of moesin remained stable during PMN apoptosis regardless of whether or not cells were treated with GM-CSF (**Fig. 3**, upper panel). As expected [6, 19], the microfilament-associated protein gelsolin was cleaved during SA (see asterisk) leading to a fragment of ~47 kDa (F47 in **Fig. 3**, lower panel); this cleavage was prevented in the presence of GM-CSF. To further support the observation that moesin is not cleaved during SA, we monitored its expression using another anti-moesin antibody (rabbit polyclonal instead of mouse monoclonal) and, as illustrated in the inset, moesin was not cleaved over time. Of note, a fragment of unknown origin of ~55 kDa was frequently observed during SA, but not in fresh cells (arrowheads, **Fig. 3**, inset).

Cleavage and dephosphorylation of Ezrin during neutrophil spontaneous apoptosis. Because of the above results, and since PMNs are known to also express ezrin, [17], we next determined whether or not ezrin is cleaved and/or dephosphorylated during SA. As illustrated in **Fig. 4A**, ezrin (upper panel), in contrast to moesin (middle panel), is clearly cleaved during SA. A ~55 kDa fragment was also observed with the anti-ezrin antibody, but whether or not this represents the same fragment as observed with the anti-moesin antibody is unknown (arrowheads). **Fig. 4B** illustrates that ezrin was dephosphorylated during SA as well as moesin (**Fig. 4C**), and that dephosphorylation was reversible by the

potent serine/threonine phosphatase inhibitor, calyculin A (Cal) [18]. Since ezrin is cleaved during SA, the membrane was stained with Coomassie blue to determine equivalent loading (**Fig. 4B**) instead of being stripped and then probed with the anti-ezrin antibody directed against the unphosphorylated form as performed for moesin (**Fig. 4C**).

Cleavage of moesin in Viscum album agglutinin-I (VAA-I)-induced neutrophil apoptosis.

Since both moesin and ezrin proteins are dephosphorylated over time but only ezrin is cleaved during SA, in which about 30-50% of PMNs are typically apoptotic [9, 20-22], we next decided to examine whether or not moesin cleavage could be observed under experimental conditions in which more cells undergoing apoptosis. To do so, cell apoptosis was induced with the neutrophil pro-apoptotic VAA-I molecule [6, 9]. To be sure that the PMNs were apoptotic, apoptosis was assessed by cytology where pycnotic nuclei, a hallmark of apoptosis, are easily observable in these cells. As illustrated in **Fig. 5**, only VAA-I led to a decrease of moesin expression under conditions in which almost all cells (99%) were apoptotic (inset). Therefore, moesin may be degraded during PMN apoptosis but probably not as rapidly and/or as strongly as ezrin and gelsolin (this latter protein being used as a positive control) [6].

Behavior of moesin and ezrin during neutrophil apoptosis. Knowing that moesin and ezrin are dephosphorylated and cleaved in apoptotic human PMNs, we investigated the behaviour of these proteins by immunofluorescence microscopy in freshly isolated (naïve) and in VAA-I-induced PMNs. As illustrated in **Fig. 6**, moesin and ezrin are preferentially concentrated at the plasma membrane in non-apoptotic cells and are also

distributed diffusely in the cytoplasm (panels B and D, respectively). However, in apoptotic PMNs, the signal of fluorescence observed at the plasma membrane faded and a clear cytoplasmic translocation of moesin (F) and ezrin (H) was observed. Next, knowing that moesin and ezrin function as linkers between the plasma membrane and the actin cytoskeleton, we compared the localisation of both proteins with actin in normal and in apoptotic PMNs using confocal microscopy. As illustrated in **Fig. 7**, a good co-localisation of moesin (panel A) and ezrin (panel B) with actin was observed in fresh cells and during SA but, in contrast, only minimal co-localization of both proteins with actin was noted in VAA-1-induced apoptotic PMNs.

Cell surface expression of moesin and ezrin during neutrophil apoptosis. We have previously documented that among several cytoskeletal proteins, the two intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 are expressed on the cell surface of human PMNs during SA [14]. Therefore, we next investigated whether or not moesin and ezrin were expressed on the cell surface of apoptotic PMNs. However, because we found that cleavage of moesin was not observed in SA but in VAA-I-induced apoptosis (**Fig. 5**), we investigated the cell surface expression of moesin and ezrin under both experimental conditions, using vimentin as a positive control [14]. As illustrated in **Fig. 8**, cell surface expression of moesin and ezrin was observed in VAA-I-induced PMN apoptosis but not during SA. The percentage of cells in apoptosis was determined in parallel. As expected, cell surface expression of vimentin was observed in both conditions.

DISCUSSION

This is the first study to investigate the behaviour of ERM proteins during human PMN apoptosis. The observation that both moesin and ezrin were dephosphorylated during SA concurs with the work from Kondo et al. (1997) conducted in mouse L929 cells expressing human Fas antigen (LHF), where ERM proteins were found to translocate from the plasma membrane of microvilli to the cytoplasm concomitant with their dephosphorylation [18]. Interestingly, Fas ligand-induced dephosphorylation of ERM proteins in these cells was suppressed by treatment with the serine/threonine protein phosphatase inhibitor, calyculin A, and this was transduced by blocking cytoplasmic translocation of ERM proteins [18]. Herein, calyculin A was also found to inhibit ezrin and moesin dephosphorylation but during SA i.e. under an experimental conditions where PMNs, in contrast with LHF cells used in the above study, are not activated by any exogenous agents. Interestingly, in addition, calyculin A treatment was found to inhibit phosphorylation of both moesin and ezrin during SA, indicating that, at least, a large pool of each of these two ERM proteins needs to be dephosphorylated before cleavage. However, in contrast to the degradation of ezrin which was easily observable during SA, the cleavage of moesin was only observed in experimental conditions where the number of apoptotic cells is very high (close to 100%), as observed after treatment with VAA-I. This suggests that degradation of moesin correlates with the number of apoptotic PMNs and, to date, this is unique to moesin, since this was not observed for NMHC-IIA, paxillin, gelsolin, vinculin, vimentin, lamin B₁, α - and β -tubulin and ezrin (this report) that are all cleaved during SA.

The fact that moesin and ezrin are expressed at the cell surface of human PMNs during apoptosis is interesting, since this may be one mechanism explaining how intracellular cytoskeletal proteins (or epitopes) can become accessible and present to the immune system. Presently, except necrosis or potential molecular mimicry, the presence of autoantibodies directed against cytoskeletal proteins in the sera of patients suffering from autoimmune diseases, is difficult to explain. Interestingly, using recombinant ERM proteins produced in *Escherichia coli*, Wagatsuma et al. reported almost 15 years ago that ~35% of sera obtained from rheumatoid arthritis patients reacted with at least one of the three proteins (17%, 15% and 14% for E,R and M, respectively) [23], suggesting that ERM proteins are potential autoimmune target antigens for rheumatoid arthritis (RA). Since then, no other studies have reported the presence of autoantibodies directed against ERM proteins in RA. This could be explained by the fact that no significant correlation between the presence of the autoantibodies and clinical manifestation (such as disease duration or stage) was reported in the original study.

In another study, antibodies specific to moesin were detectable in the serum of ~40% of patients with acquired aplastic anemia (AA), a syndrome characterized by pancytopenia and bone marrow hypoplasia [24]. A case-control study conducted by IAAS (International Agranulocytosis and Plastic Anemia Study) revealed that past history of RA is significantly associated with later development of AA, suggesting that AA and RA share pathogenetic mechanisms leading to a breakdown of immunologic tolerance to

moesin. Interestingly, the authors discussed that the membrane-linking protein moesin is expressed by various blood cells, including granulocytes, but that its expression was localized to inside the cell membrane and not to the cell surface [24]. The data that we bring in the present study indicating that apoptotic PMNs do express moesin on their cell surface may be helpful for future comprehension in AA and other diseases. Of note, the authors also reported that moesin was detected in the culture supernatant from four leukemia cell lines and synovial cells. More interestingly, in another study conducted by the same team, moesin was detected on the surface of THP-1 cells and various human blood cells, including T cells, NK cells, and monocytes from healthy individuals [25], but not on B cells, PMNs or BM CD34+ cells; however, they did not look at apoptotic PMNs. Moreover, as we described here, the presence of cell surface moesin is only detected with a population of PMNs that is close to 100% apoptotic. Anti-moesin antibodies in the serum of AA patients were found to stimulate PBMC to secrete TNF- α and IFN- γ as reported by Takamatsu et al. (2008); the titer of antibodies was found to be dependent on the amount of cell surface moesin expressed by THP-1 cells [26]. Whether or not moesin and other ERM proteins can be detected on the cell surface of apoptotic immune cells other than PMNs remained to be determined.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). We thank Mary Gregory for reading this manuscript.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *Dephosphorylation of ERM proteins in human neutrophils.* Freshly isolated human PMNs (10×10^6 cells/ml in RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated autologous serum) were incubated for 0, 15 or 30 min and cell lysates were then prepared for immunoblotting experiments (A) using an anti-phospho-ERM (p-ERM) antibody as described in Material and Methods. Membranes were then stripped and probed with an antibody directed against the unphosphorylated forms of the ERM proteins (ERM) to verify protein loading. In parallel, the level of pERM and DNA (stained with DAPI) was verified by immunofluorescence (B) as described in Materials and Methods. Results are from one representative experiment out of four.

Figure 2. *Dephosphorylation of moesin in human neutrophils.* Cells were incubated as in legend of Fig.1 for the indicated periods of time and cell lysates were prepared for the detection of phosphorylated form of moesin (p-moesin) by western blot as indicated in Materials and Methods. In order to verify equivalent protein loading, membranes were then stripped and probed with an anti-moesin. Results are from one representative experiment out of four.

Figure 3. *Moesin is not degraded during neutrophil spontaneous apoptosis.* PMNs were incubated in the presence (+) or absence (-) of the anti-apoptotic cytokine GM-CSF (65 ng/ml) for the indicated periods of time, cell lysates were prepared and the expression of moesin (upper panel) and gelsolin (lower panel) was monitored by western blotting as indicated in Materials and Methods. Unlike gelsolin, moesin is not degraded during spontaneous apoptosis. F47 is a cleaved fragment of gelsolin known to occur during apoptosis. Inset, in other experiments, the absence of moesin degradation was confirmed using a commercially available anti-moesin antibody different from the one used in the figure as detailed in Materials and Methods. Results are from one experiment out of three.

Figure 4. *Degradation of cytoskeletal protein ezrin during neutrophil spontaneous apoptosis.* Freshly isolated human neutrophils (10×10^6 cells/ml) were isolated as in legend of **Fig. 1** and incubated for 0 (fresh cells, F) or 22 h (SA). Cell lysates were prepared, and Western blot experiments were performed as described in Materials and Methods using the anti-ezrin (A, upper panel), anti-moesin (A, middle panel) or anti-gelsolin (A, bottom panel) antibody. B,C, cells were incubated in the presence (+) or absence (-) of 1 μ M calyculin (Cal) and the level of phosphorylation of ezrin (B, p-ezrin) or moesin (C, p-moesin) was determined by western blot using the corresponding antibodies. Since ezrin is degraded over time, the protein loading was verified by colouring the membrane with Coomassie blue at the end of the experiments; while protein loading for moesin was verified using an anti-moesin antibody. Arrowhead,

fragment of unknown origin (?), F, Fresh. Results are from one representative experiment of at least three.

Figure 5. *Moesin degradation occurs in VAA-I-induced neutrophil apoptosis.* Cells were incubated in the presence of buffer (SA), the antiapoptotic cytokine GM-CSF (GM, 65 ng/ml), the pro-apoptotic anticancer agent arsenic trioxide (ATO) at 5 or 10 μ M or with the potent pro-apoptotic molecule VAA-I (1000 ng/ml) for 22h and degradation of moesin and gelsolin (positive control) was assessed by immunoblotting. The apoptotic rate is indicated at the bottom of the figure. Note that cleavage of moesin was evident only when almost all cells were in apoptosis as illustrated in the inset. Results are from one representative experiment out of five.

Figure 6. *Localization of moesin and ezrin during spontaneous and VAA-I induced apoptosis.* Localization of moesin and ezrin was investigated by immunofluorescence in PMNs during spontaneous apoptosis (SA) (A-D) or in VAA-I-induced apoptosis (E-H) after 22h. PMNs were then fixed and permeabilized in 3.7% paraformaldehyde + 0.1% digitonin, incubated with antibody directed against moesin (B,F) or ezrin (D,H) and DNA was stained with DAPI (A,C,E,G) as indicated Materials and Methods. Results are from one representative experiment of three.

Figure 7. *Expression of moesin or ezrin in comparison with actin during PMN apoptosis.* Expression of moesin (panel A, a,d,g), ezrin (panel B, 1,4,7) and actin (panel A, b,e,h and panel B, 2,5,8,) was investigated by confocal immunofluorescence microscopy in freshly

isolated cells (fresh), during spontaneous apoptosis (SA) or in VAA-I-induced apoptosis (VAA-I) as described in Materials and Methods. Results are from one representative experiment of four.

Figure 8. *Cell surface expression of moesin and ezrin in VAA-I-induced neutrophils.* PMNs were treated with buffer (SA) or with 1000 ng/ml VAA-I for 22h and cell surface expression of vimentin (positive control), moesin or ezrin was determined by flow cytometry as detailed in Materials and Methods. A, representative data. B, a bar graph illustrating the cell surface expression of the indicated protein expressed as mean fluorescence intensity (MFI) during spontaneous apoptosis (SA) or in VAA-I-induced PMNS (VAA). Results are means \pm SEM (n=6).

FIGURE 1

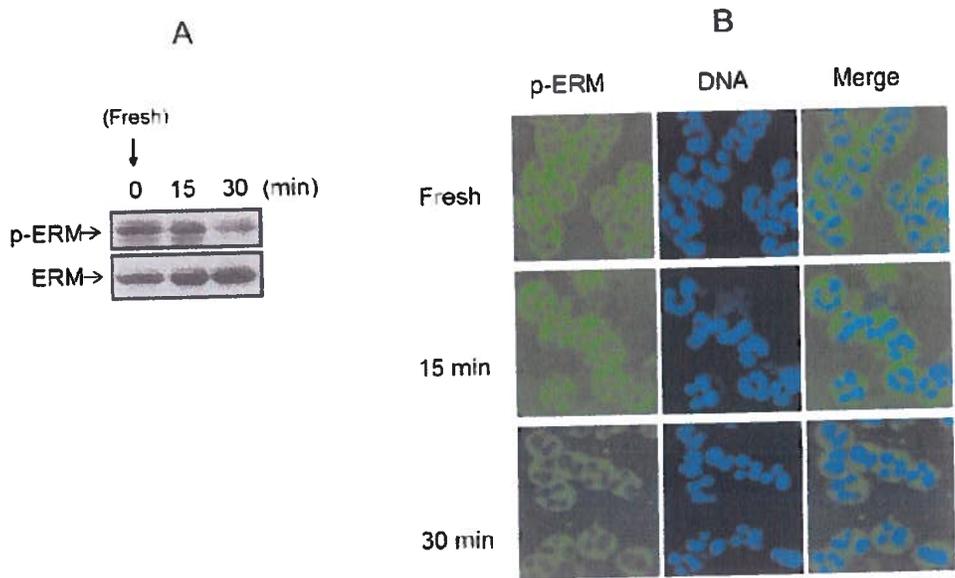


FIGURE 2

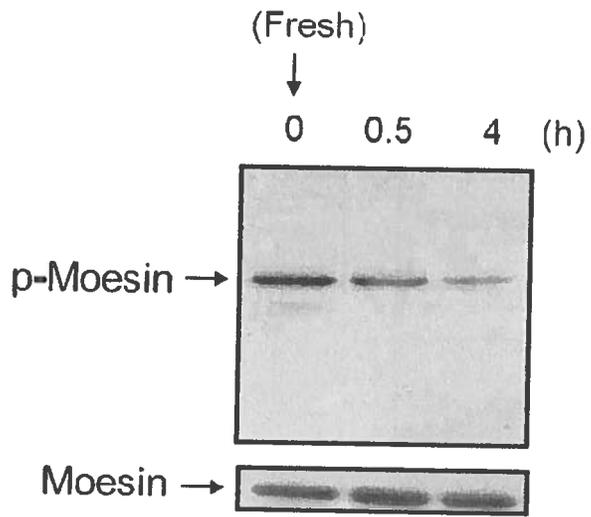


FIGURE 3

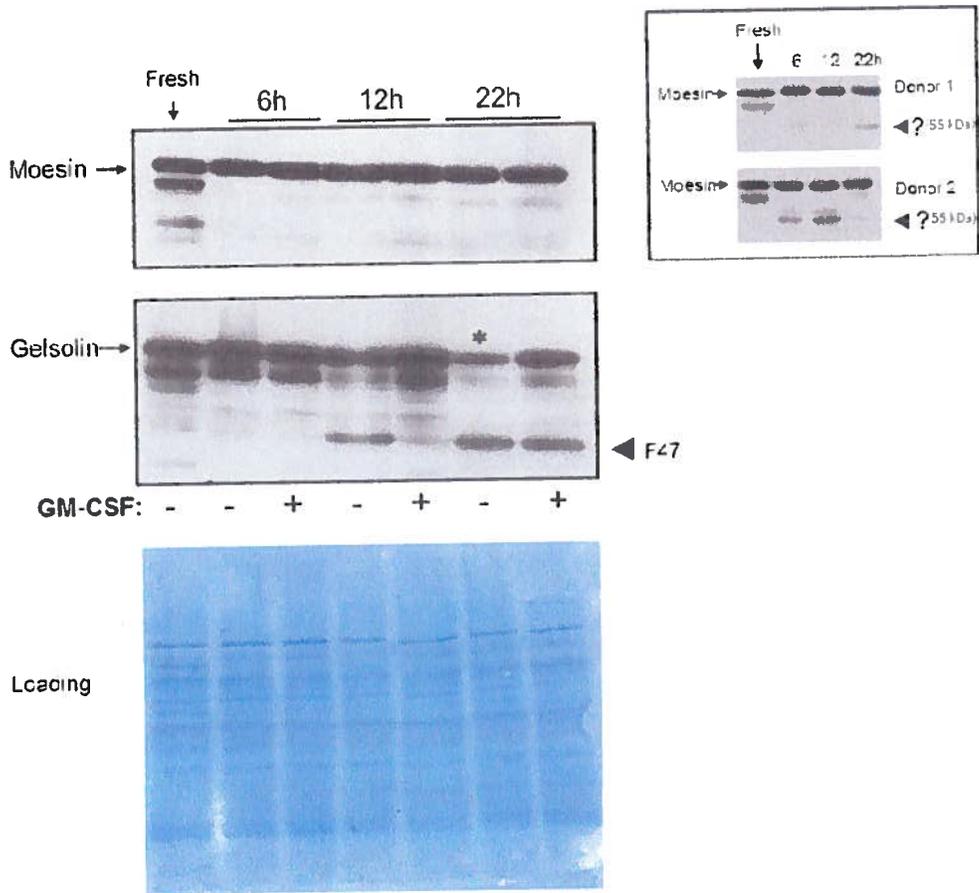


FIGURE 4

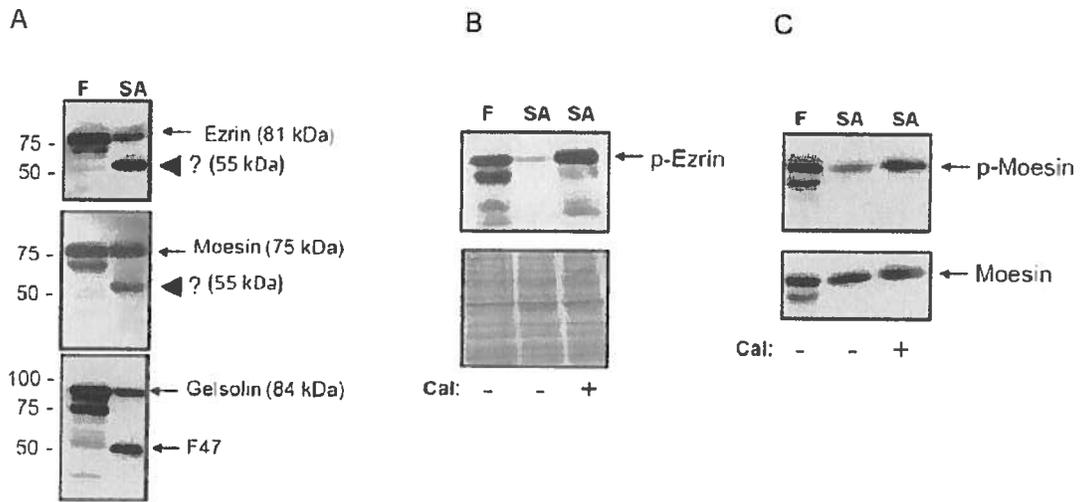


FIGURE 5

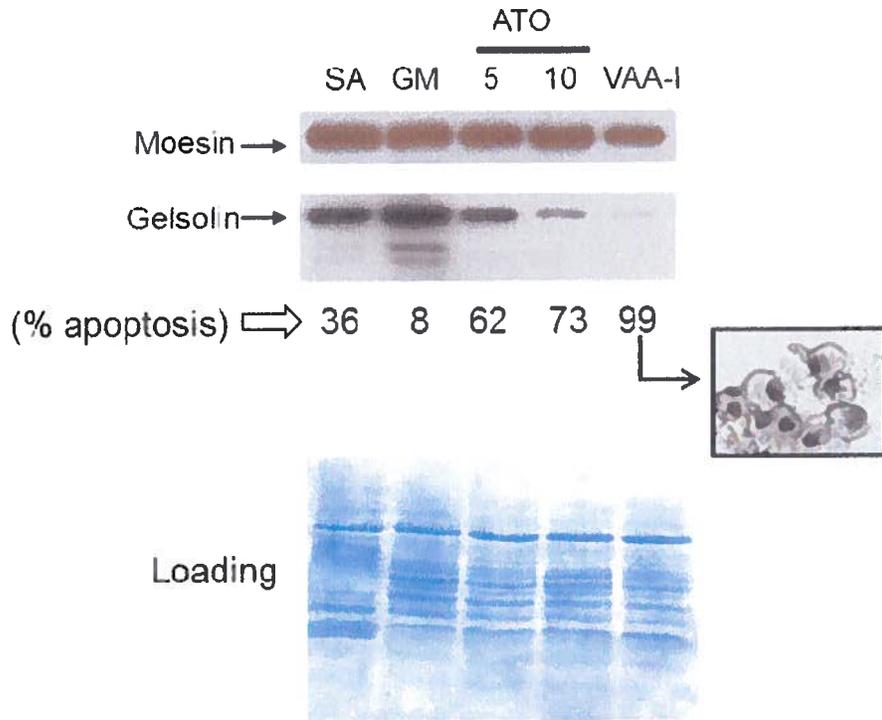


FIGURE 6

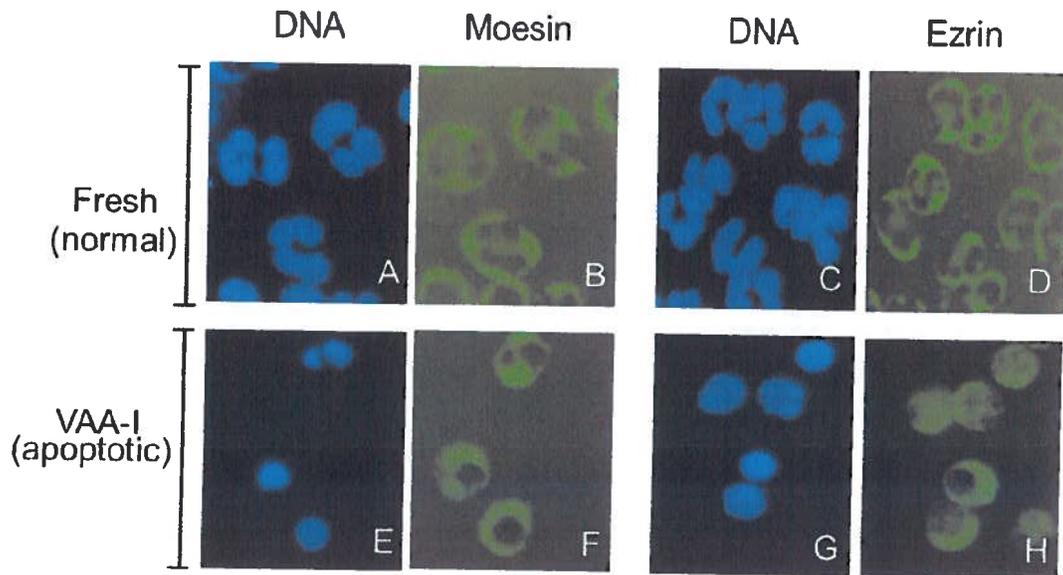


FIGURE 7

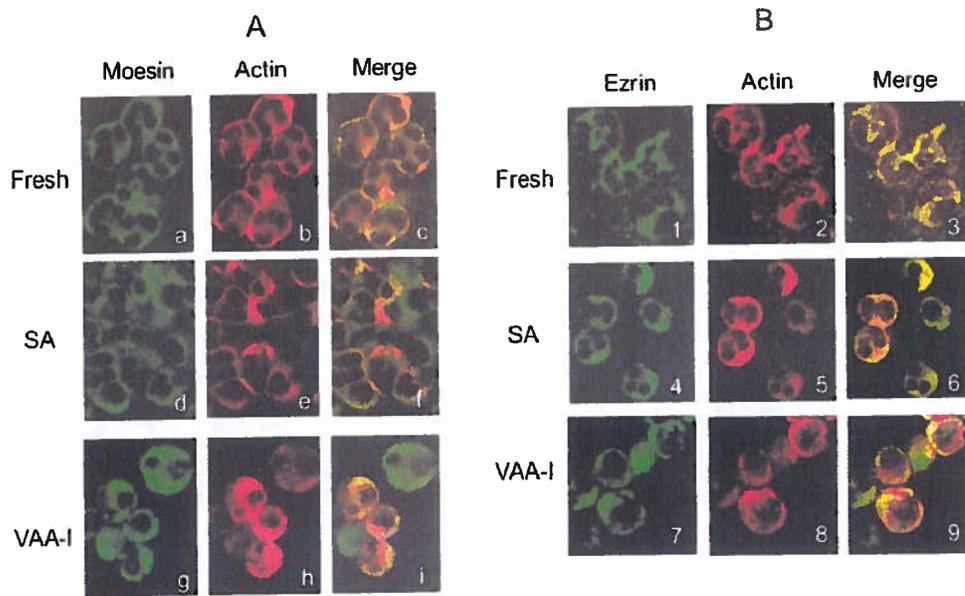
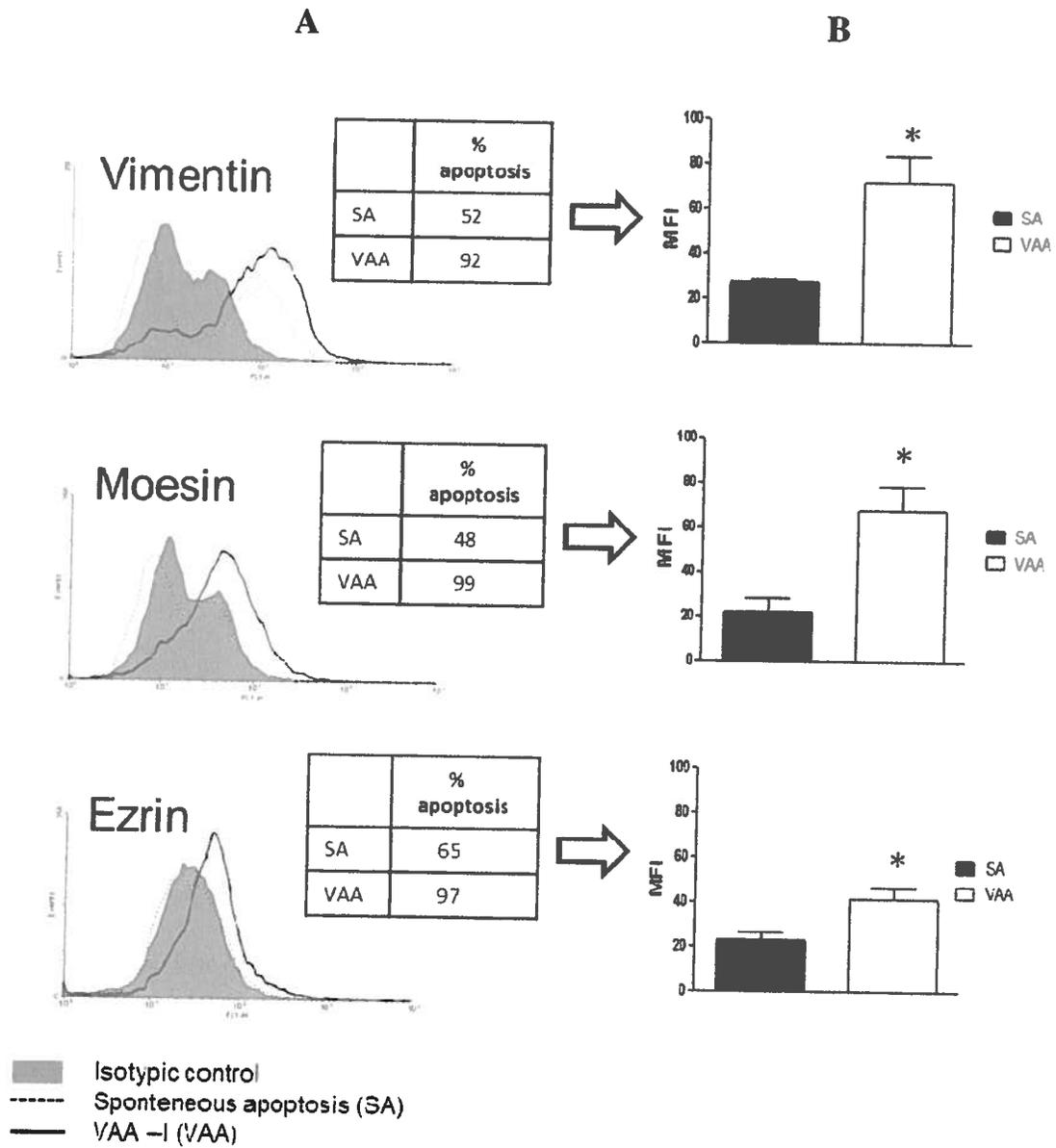


FIGURE 8



REFERENCES

1. Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. (2001) Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett* 487:318-322.
2. Gardai SJ, Hildeman DA, Frankel SK, et al. (2004) Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *J Biol Chem* 279:21085-21095.
3. Moulding DA, Akgul C, Derouet M, White MR, Edwards SW. (2001) BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *J Leukoc Biol* 70:783-792.
4. Pongracz J, Webb P, Wang K, Deacon E, Lunn OJ, Lord JM. (1999) Spontaneous neutrophil apoptosis involves caspase 3-mediated activation of protein kinase C-delta. *J Biol Chem* 274:37329-37334.
5. Scheel-Toellner D, Wang K, Assi LK, et al. (2004) Clustering of death receptors in lipid rafts initiates neutrophil spontaneous apoptosis. *Biochem Soc Trans* 32:679-681.
6. Savoie A, Lavastre V, Pelletier M, Hajto T, Hostanska K, Girard D. (2000) Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I: modulation of de novo protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis. *J Leukoc Biol* 68:845-853.
7. Lavastre V, Binet F, Moisan E, Chiasson S, Girard D. (2007) *Viscum album* agglutinin-I induces degradation of cytoskeletal proteins in leukaemia PLB-985 cells differentiated toward neutrophils: cleavage of non-muscle myosin heavy chain-IIA by caspases. *Br J Haematol* 138:545-554.

8. Lavastre V, Roberge CJ, Pelletier M, Gauthier M, Girard D. (2002) Toxaphene, but not beryllium, induces human neutrophil chemotaxis and apoptosis via reactive oxygen species (ROS): involvement of caspases and ROS in the degradation of cytoskeletal proteins. *Clin Immunol* 104:40-48.
9. Lavastre V, Pelletier M, Saller R, Hostanska K, Girard D. (2002) Mechanisms involved in spontaneous and *Viscum album* agglutinin-I-induced human neutrophil apoptosis: *Viscum album* agglutinin-I accelerates the loss of antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of cytoskeletal paxillin and vimentin proteins via caspases. *J Immunol* 168:1419-1427.
10. Lavastre V, Girard D. (2002) Tributyltin induces human neutrophil apoptosis and selective degradation of cytoskeletal proteins by caspases. *J Toxicol Environ Health A* 65:1013-1024.
11. Lavastre V, Chiasson S, Cavalli H, Girard D. (2005) *Viscum album* agglutinin-I induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins via caspases in human leukaemia eosinophil AML14.3D10 cells: differences with purified human eosinophils. *Br J Haematol* 130:527-535.
12. Lavastre V, Chiasson S, Cavalli H, Girard D. (2005) *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins in human leukemia PLB-985 and X-CGD cells via caspases: lamin B1 is a novel target of VAA-I. *Leuk Res* 29:1443-1453.
13. 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* 132:349-358.

14. Moisan E, Girard D. (2006) Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis. *J Leukoc Biol* 79:489-498.

15. Ivetic A, Ridley AJ. (2004) Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes. *Immunology* 112:165-176.

16. Tsukita S, Yonemura S. (1999) Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem* 274:34507-34510.

17. Shcherbina A, Bretscher A, Kenney DM, Remold-O'Donnell E. (1999) Moesin, the major ERM protein of lymphocytes and platelets, differs from ezrin in its insensitivity to calpain. *FEBS Lett* 443:31-36.

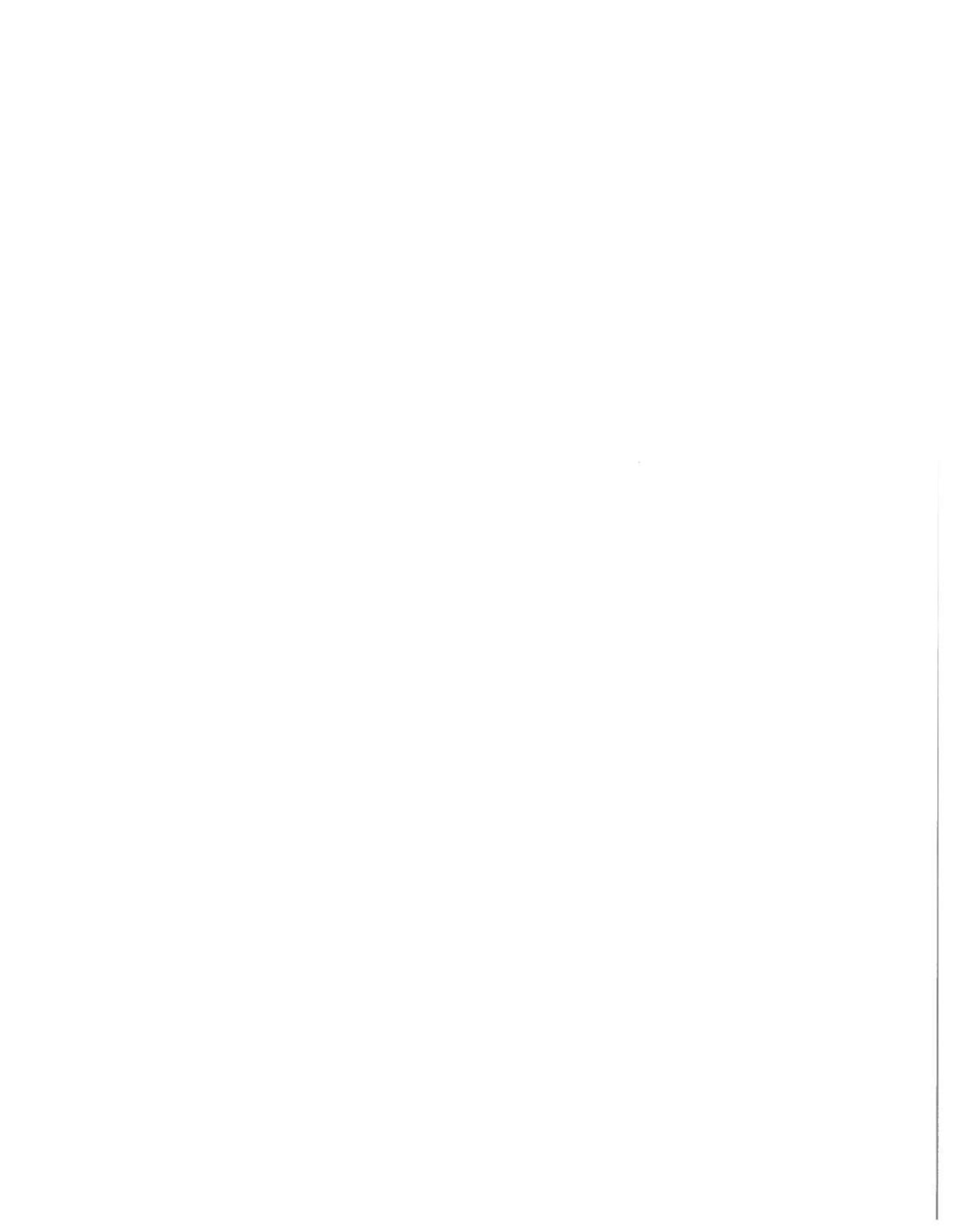
18. Kondo T, Takeuchi K, Doi Y, Yonemura S, Nagata S, Tsukita S. (1997) ERM (ezrin/radixin/moesin)-based molecular mechanism of microvillar breakdown at an early stage of apoptosis. *J Cell Biol* 139:749-758.

19. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, et al. (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278:294-298.

20. Haslett C, Savill JS, Whyte MK, Stern M, Dransfield I, Meagher LC. (1994) Granulocyte apoptosis and the control of inflammation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345:327-333.

21. Kobayashi SD, Voyich JM, Whitney AR, DeLeo FR. (2005) Spontaneous neutrophil apoptosis and regulation of cell survival by granulocyte macrophage-colony stimulating factor. *J Leukoc Biol* 78:1408-1418.

22. Scheel-Toellner D, Wang KQ, Webb PR, et al. (2004) Early events in spontaneous neutrophil apoptosis. *Biochem Soc Trans* 32:461-464.
23. Wagatsuma M, Kimura M, Suzuki R, Takeuchi F, Matsuta K, Watanabe H. (1996) Ezrin, radixin and moesin are possible auto-immune antigens in rheumatoid arthritis. *Mol Immunol* 33:1171-1176.
24. Takamatsu H, Feng X, Chuhjo T, et al. (2007) Specific antibodies to moesin, a membrane-cytoskeleton linker protein, are frequently detected in patients with acquired aplastic anemia. *Blood* 109:2514-2520.
25. Takamatsu H, Espinoza JL, Lu X, Qi Z, Okawa K, Nakao S. (2009) Anti-moesin antibodies in the serum of patients with aplastic anemia stimulate peripheral blood mononuclear cells to secrete TNF-alpha and IFN-gamma. *J Immunol* 182:703-710.
26. Espinoza JL, Takamatsu H, Lu X, Qi Z, Nakao S. (2009) Anti-moesin antibodies derived from patients with aplastic anemia stimulate monocytic cells to secrete TNF-alpha through an ERK1/2-dependent pathway. *Int Immunol* 21:913-923.



Discussion et conclusion

Cette étude est la première à investiguer le comportement des protéines ERM durant l'apoptose du neutrophile humain. Elle avait pour but de déterminer le niveau de phosphorylation, de dégradation et d'expression à la surface de la cellule des protéines ezrine et moésine chez le neutrophile humain en apoptose.

Premièrement, au tout début de cette étude, nous voulions montrer ce qu'il en était du niveau de phosphorylation du complexe ERM lors de l'apoptose du neutrophile. Nous avons donc acheté un anticorps anti-pERM (et anti-ERM), et avons débuté nos tests avec ce dernier. Toutefois, nous avons constaté qu'il était difficile d'identifier chacune des protéines du complexe par Western Blot. Nous obtenions toujours deux bandes à des poids moléculaires légèrement différents (nous supposons donc que celle du haut correspondait à l'ezrine (81 kDa) et celle du bas à la moésine (78 kDa), étant donné que le neutrophile n'exprime pas la radixine). Mais selon l'information fournie avec l'anticorps, même dans le cas de cellules qui expriment les trois protéines du complexe, il n'y a que deux bandes claires qui apparaissent sur Western Blot. Nous avons donc décidé, pour la suite des expérimentations, d'acheter un anticorps anti-ezrine et un anticorps anti-moésine, afin de pouvoir suivre précisément chacune des protéines. En effet, à des temps plus longs d'incubation avec les anticorps anti-pERM et anti-ERM, on observait par Western Blot des variations du niveau de phosphorylation et du niveau de dégradation difficilement attribuables à l'une ou l'autre des protéines.

Toutefois, nous avons jugé pertinent de montrer qu'à un temps court d'apoptose spontanée (moins de 30 minutes) il était possible d'observer une déphosphorylation rapide du complexe en entier. En effet, étant donné que la disparition de la région *microvilli* est un évènement commun se déroulant tôt lors de l'apoptose des cellules (Kondo et al, 1997 et Ioannis et al, 2007), nous avons voulu observer si ce phénomène se déroulait également durant l'apoptose spontanée du neutrophile. Les résultats de cette étude montrent que l'ezrine et la moésine sont déphosphorylées tôt lors de l'apoptose du neutrophile et le sont toujours après 20 heures d'incubation dans le milieu réactionnel.

Les études de Kondo et *al* (Kondo et *al*, 1997) appuient ce résultat, puisqu'elles ont montré qu'il y avait déphosphorylation et translocation de la membrane plasmique à la région "microvilli" des protéines ezrine et moésine durant l'apoptose spontanée du neutrophile chez les cellules de souris L929 exprimant un ligand humain du récepteur de mort Fas. La déphosphorylation des protéines ERM induite par l'activation du récepteur Fas chez ces cellules peut être inhibée par l'ajout de la calyculine A, un inhibiteur de serine-thréonine phosphatase. En fait, l'inhibiteur semble bloquer la translocation des protéines ERM de la membrane plasmique à la région "microvilli" (Kondo et *al*, 1997). Dans la présente étude, la calyculine A inhibe également la déphosphorylation de la moésine et de l'ezrine, mais durant l'apoptose spontanée du neutrophile, donc lorsque les PMNs ne sont pas activés par des agents ajoutés au milieu. La rapide déphosphorylation des protéines ezrine et moésine durant l'apoptose spontanée du neutrophile rapportée par cette étude indique donc que dès le début du processus de mort programmée, ces protéines ne peuvent plus jouer leur rôle de protéine adaptatrice, donc de permettre la transmission de signaux des récepteurs aux protéines situées en aval des voies signalétiques.

En ce qui concerne les autres phénomènes qui pourraient causer la déphosphorylation des protéines ERM lors de courts temps d'incubation, les études de l'équipe d'Yoshinaga-Ohara (Yoshinaga-Ohara et *al*, 2002) ont montré que l'ezrine et la moésine étaient rapidement déphosphorylées suite à leur stimulation avec la cytokine GM-CSF, qui induit la chimiotaxie du neutrophile. Nous avons vérifié l'effet de la cytokine GM-CSF sur la déphosphorylation du complexe ERM à des temps courts d'incubation (15 et 30 minutes) (figure non montrée) et avons constaté que cette dernière était accélérée par rapport à ce qu'on observait lorsque que GM-CSF n'était pas ajouté au milieu réactionnel. Par l'ajout de GM-CSF, nous avons donc mis le neutrophile en "état" de chimiotaxie, état dans lequel il n'est pas lorsque rien est ajouté au milieu réactionnel. Pour mesurer l'effet seul de l'apoptose spontanée des neutrophiles, nous les incubons en condition dite physiologique, donc à 37°C en présence de sérum autologue et sans l'ajout d'autre agent qui pourrait influencer le comportement du neutrophile. C'est donc dans ces conditions que nous avons donc observé qu'il y avait effectivement

déphosphorylation du complexe ERM en comparaison avec les cellules fraîchement isolées (non-apoptotiques).

En ce qui a trait à la dégradation des protéines ERM durant l'apoptose du neutrophile, la présente étude montre que la dégradation de l'eitrine est facilement observable durant l'apoptose spontanée. Toutefois, la dégradation de la moésine a uniquement été observée dans les milieux réactionnels où le taux de cellules en apoptose avoisinait les 100 % (condition obtenue suite à l'ajout de l'agent pro-apoptotique VAA-I). Cela suggère que la dégradation de la moésine corrèle avec le nombre de PMNs en apoptose dans le milieu, ce qui est unique à cette protéine du cytosquelette. En effet, cela n'a pas été observé pour les protéines MHC-IIA, paxilline, gelsoline, vinculine, vimentine (Levastre et *al*, 2002), lamine B1 (Moisan et *al*, 2006), alpha et bêta-tubuline (Binet et *al*, 2006) et eitrine (présente étude), qui sont toutes dégradées durant l'apoptose spontanée du neutrophile (donc, sans ajout d'agoniste et lorsque le taux d'apoptose dans le milieu réactionnel avoisine les 50 %). Également, cela suggère un mécanisme de dégradation spécifique à la moésine durant l'apoptose du neutrophile.

Cette étude montre également que la moésine et l'eitrine sont exprimées à la surface du neutrophile humain en apoptose. Ce résultat est intéressant, puisque le mécanisme impliqué dans ce phénomène pourrait expliquer comment les protéines du cytosquelette peuvent devenir accessibles au système immunitaire. Présentement, à part la nécrose tissulaire et la possibilité de mimétisme moléculaire, la présence d'auto-anticorps dirigés contre les protéines du cytosquelette chez les patients atteints de maladies auto-immunes s'explique difficilement (De Franco et *al*, 2007). En utilisant des protéines ERM recombinantes produites chez la bactérie *Escherichia coli*, l'équipe de Wagatuma et *al* ont montré, il y a presque 15 ans, qu'environ 35 % du sérum obtenu de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde réagissait avec au moins une de ces protéines (17 % avec l'eitrine, 15 % avec la radixine et 14 % avec la moésine) (Wagatuma et *al*, 1996), ce qui suggère que les protéines ERM sont des auto-antigènes dans cette pathologie. Toutefois, aucune autre étude n'a rapporté la présence d'auto-anticorps dirigés contre les protéines ERM chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde. Cela pourrait être expliqué

par le fait que dans l'étude originale, aucune corrélation n'a été rapportée entre la présence de ces auto-anticorps et les manifestations cliniques de la pathologie. Ceci est contraire aux études effectuées en ce qui a trait aux auto-anticorps citrullinés (Anti-citrullinated protein antibodies, ACPA), pour lesquels un lien clair a été établi entre leur présence dans le sérum des patients et la manifestation clinique de la pathologie de l'arthrite rhumatoïde (Puszczewicz et *al*, 2011).

Une autre étude a toutefois montré que des auto-anticorps spécifiques à la moésine étaient détectés dans le sérum d'environ 40 % des patients atteints d'anémie aplasique, un syndrome caractérisé par une diminution du nombre de leucocytes, érythrocytes et plaquettes chez ceux-ci (Takamatsu et *al*, 2007). Également, on a montré que ces auto-anticorps anti-moésine stimulaient la libération des cytokines TNF- α et l'IFN- γ par les PBMC (Takamatsu et *al*, 2009), donc une réponse immunitaire. Par ailleurs, une étude effectuée par l'IAAS (International Agranulocytosis and Plastic Anemia Study) a montré qu'une historique d'arthrite rhumatoïde était significativement associée au développement de l'anémie aplasique chez les patients (Takamatsu et *al*, 2007). Donc, ces deux pathologies partageraient un mécanisme qui mènerait à la formation d'auto-anticorps dirigés contre la moésine. Les auteurs de cette étude mentionnent également que la moésine a été détectée dans le surnageant de quatre lignées cellulaires cancéreuses (leucémie), ce qui indique que cette protéine, dans des conditions particulières, pourrait passer de l'intérieur à l'extérieur de la cellule et ainsi être détectée par le système immunitaire. Également, on a montré que la moésine pouvait se retrouver à la surface d'autres cellules chez des donneurs sains, tels les THP-1, les lymphocytes T, les cellules NK et les monocytes (Takamatsu et *al*, 2009).

Donc, les résultats de la présente étude indiquant que la moésine peut se retrouver à la surface du neutrophile en apoptose constitueraient un point de départ intéressant pour mieux comprendre le mécanisme des pathologies dans lesquels il y a apparition d'auto-anticorps (maladies inflammatoires et/ou auto-immunes). D'ailleurs, il est intéressant de noter qu'au cours de la présente étude, l'expression de la moésine à la surface du neutrophile durant la mort cellulaire programmée n'était détectable que lorsqu'il y avait

une très grande quantité de cellules en apoptose dans le milieu réactionnel (taux avoisinant les 100%), un état semblable à celui qu'on retrouve dans des pathologies inflammatoires chroniques et auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde, où une très grande quantité de neutrophiles sont présents dans le liquide synovial.

Dans le cadre d'études ultérieures, il serait intéressant d'investiguer la fonction possible qu'aurait l'expression de la moésine (ainsi que d'autres protéines du cytosquelette) à la surface du neutrophile en apoptose. Une hypothèse intéressante est qu'il pourrait s'agir d'un mécanisme de reconnaissance du neutrophile par le macrophage, donc d'un "eat-me" signal, à l'image du "flip-flop" des phosphatidylsérines, phénomène se produisant également durant l'apoptose (Fadok, 1998). Afin d'étudier ce phénomène *in vitro*, on ajouterait des anticorps neutralisants anti-moésine à un milieu dans lequel des neutrophiles en apoptose seraient mis en présence de macrophages, pour ensuite déterminer si le taux de phagocytose diminue par rapport au milieu sans anticorps neutralisant.

Également, étant donné la présence d'anticorps dirigés contre les peptides du soi ayant subi la citrullination (ACPA) chez les patients souffrant d'arthrite rhumatoïde (Isaacs, 2010), il serait intéressant d'aller vérifier s'il y a présence de protéines citrullinées à la surface du neutrophile en apoptose. Les neutrophiles étant les cellules les plus abondantes dans le liquide synovial des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde (Cascio et al, 2010), il serait possible que l'exposition massive de protéines citrullinées du soi à leur surface stimule le système immunitaire à produire des auto-anticorps, et ainsi contribuer au développement de la pathologie.

Références

- AKGUL, C., D.A. Moulding et S.W. Edwards. 2001. "Molecular control of neutrophil apoptosis". FEBS Letters, vol. 487, p.318-22.
- BINET, F., H. Cavalli, E. Moisan et D. Girard. 2006. "Arsenic trioxide (AT) is a novel human neutrophil pro-apoptotic agent: effects of catalase on AT-induced apoptosis, degradation of cytoskeletal proteins and de novo protein synthesis". British journal of haematology, vol. 132, p. 349-58.
- BINET, F. F. Antoine et D. Girard. 2009. "Interaction between arsenic trioxide and human primary cells: emphasis on human cells of myeloid origin". Inflammation & allergy drug targets, vol. 8, p. 21-7.
- BINET, F., S. Chiasson et D. Girard. 2010. "Evidence that endoplasmic reticulum (ER) stress and caspase-4 activation occur in human neutrophils". Biochemical and biophysical research communications, vol. 391, p. 18-23.
- BORREGAARD, N. et J.B. Cowland. 1997. "Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leucocyte". Blood, vol. 89, p. 3503-21.
- BRAUN-MOSCOVICI, Y., D. Markovits, O. Zinder, D. Schapira, A. Rozin, M. Ehrnburg, L. Dain, E. Hoffer, A. Menahemnahir et A. Balbir-Gurma. 2006. "Anti-Cyclic Citrullinated Protein Antibodies as a Predictor of Response to Anti-Tumor Necrosis Factor- α , Therapy in Patients with Rheumatoid Arthritis". The Journal of Rheumatology, vol. 33, p. 497-50.
- CASCÃO, R., H.S. Rosario, M.M. Souto-Carneiro et J.E. Fonseca. 2010. "Neutrophils in rheumatoid arthritis : More than simple final effectors". Autoimmunity Reviews, vol. 9, p. 531-5.
- CHANG, L. et R.D. Goldman. 2004. "Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk". Nature reviews. Molecular cell biology, vol. 5, p. 601-13.
- CHECINSKA, A., G. Giaccone, J.A. Rodriguez, F.A. Kruyt et C.R. Jimenez. 2009. "Comparative proteomics analysis of caspase-9-protein complexes in untreated and cytochrome c/dATP stimulated lysates of NSCLC cells". Journal of proteomics, vol. 72, p. 575-85.
- DE FRANCO, A.L., R. M. Locksley, M. Robertson. 2007. Immunité : La réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires. Bruxelles : Éditions De Boeck Université, 350p.
- EDWARDS, S.W. 1994. Biochemistry and Physiology of the Neutrophil. Cambridge : University Press, 319p.

ESPINOSA, J.L., H. Takamatsu, X. Lu, Z. Qi et S. Nakao. 2009. "Anti-moesin antibodies derived from patients with aplastic anemia stimulate monocytic cells to secrete TNF-alpha through an ERK1/2-dependent pathway". International Immunology, vol.21, p.913-23.

FADOK, A., D.L. Bratton, S. Courtney Frash, M.L. Warner et P.M. Henson. 1998. "The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes". Cell death and differentiation, vol. 5, p. 551-562.

FEHON, R.G., A.I. McClatchey et A. Bretscher. 2010. "Organizing the cell cortex : the role of ERM proteins". Nature reviews. Molecular cell biology, vol. 11, p. 276-287.

FOXMAN, E.F., E.J. Kunkel et E.C. Butcher. 1999. "Integrating conflicting chemotactic signals. The role of memory in leucocyte navigation". Journal of Cell Biology, vol. 147, p.577-88.

GIRARD, D. 2007. Phenotypic and Functional Changes of Neutrophils Activated by Recently Identified Modulators. Research Signpost, 134p.

HAMPTON, M.B., A.J. Kettle et C.C. Winterbourn. 1998. "Inside the neutrophil phagosome : oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing". Blood, vol. 92, p.3007-17.

HASLETT, C., J.S. Savill, M.K. Whyte, M. Stern, I. Dransfield et L.C. Meagher. 1994. "Granulocyte apoptosis and the control of inflammation". Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, vol. 345, p. 327-33.

HITCHON, C.A. et H.S. El-Gabalawy. 2004. "Oxidation in rheumatoid arthritis". Arthritis Research and Therapy, vol. 6, p.265-78.

HÉBERT, M., S. Potin, M. Sebbagh, J. Bertoglio, J. Bréard et J. Hamelin. 2008. "Rho-ROCK-dependent ezrin-radixin-moesin phosphorylation regulates Fas-mediated apoptosis in Jurkat cells". The Journal of Immunology, vol. 181, p. 5963-73.

HONGBO, R.L. et F. Loison. 2008. "Constitutive neutrophil apoptosis : mechanisms and regulation". American journal of hematology, vol. 83, p. 288-95.

HUSSEIN, M.A., M. Saleh, . Ravandi, J. Mason, R.M. Rifkin et R. Ellison. 2004. "Phase 2 study of arsenic trioxide in patients with relapsed or refractory multiple myeloma". British Journal of Haematology, vol. 125, p. 470-6.

IKING-KONERT, C., B. Ostendorf, O. Sander, M. Jost, C. Wagner, L. Joosten, M. Schneider et G.M Hansc. 2005." Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: evidence for activation by T cell". Annals of the Rheumatic Diseases, vol. 64, p. 1436-42.

IOANNIS, PN., J.S. Dimitrios, I. Papassideri, M. Robert-Nicoud et L.H. Margaritis. 2002."Dynamics of apoptosis in the ovarian follicle cells during the late stages of *Drosophila* oogenesis". Cell and Tissue Research, vol. 307, p. 401-09.

ISAACS, JD. 2010. "The changing face of rheumatoid arthritis: sustained remission for all?". Nature Reviews Immunology, vol 10, p. 605-11.

IVETIC, A. et A.J. Ridley. 2004. " Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes". Immunology, vol. 112, p. 165-76.

JING, G., J.J. Wang et S.X. Zhang. 2011. "ER Stress and Apoptosis : A New Mechanism for Retinal Cell Death". Experimental Diabetes Research, vol. 2012, p. 1-11.

KLEBANOFF, S.J. 2005. "Myeloperoxidase : friend and foe ". Journal of Leukocyte Biology, vol. 77, p. 598-625.

KLEIN, J.B., A. Buridi, P.Y Coxon, M.J. Rane, T. Manning, R. Kettritz, K.R. McLeish. 2001."Role of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol-3 kinase in chemoattractant and LPS delay of constitutive neutrophil apoptosis". Cellular signaling, vol. 13, p. 335-43.

KOBAYASHI, S.D., J.M. Voyich, A.R. Whitney, F.R. DeLeo. 2005."Spontaneous neutrophil apoptosis and regulation of cell survival by granulocyte macrophage-colony stimulating factor". Journal of Leukocyte Biology, vol.78, p.1408-18.

KONDO, T., K. Takeuchi, Y. Doi, S. Yonemura, S. Nagata et S. Tsukita. 1997. "ERM (ezrin/radixin/moesin)-based molecular mechanism of microvillar breakdown at an early stage of apoptosis". The journal of cell biology, vol. 139, p. 749-58.

KOTHAKOTA, S., T. Azuma et C. Reinhard.1997. "Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis". Science, vol. 278, p. 294-98.

LACY, P. 2006. "Mechanisms of Degranulation in Neutrophils". Allergy, Asthma & Clinical Immunology, vol. 2, p. 98-108.

- LEKSTROM-HIMES, J.A., S. E. Dorman, P. Kopar, S.M. Holland et J.I. Gallin. 1999. "Neutrophil-specific Granule Deficiency Results from a Novel Mutation with Loss of Function of the Transcription Factor CCAAT/Enhancer Binding Protein ϵ ". The Journal of Experimental Medicine, vol. 189, p.1847-1852.
- LAVASTRE, V. et D. Girard. 2002. "Tributyltin induces human neutrophil apoptosis and selective degradation of cytoskeletal proteins by caspases". Journal of Toxicology and Environmental Health, vol. 65, p.1013-24.
- LAVASTRE, V., M. Pelletier, R. Saller, K. Hostanska et D. Girard. 2002. "Mechanisms involved in spontaneous and *Viscum album* agglutinin-I-induced human neutrophil apoptosis: *Viscum album* agglutinin-I accelerates the loss of antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of cytoskeletal paxillin and vimentin proteins via caspases". The Journal of Immunology, vol. 168, p.1419-27.
- LAVASTRE, V., C.J. Roberge, M. Pelletier, M. Gauthier et D. Girard. 2002. "Toxaphene, but not beryllium, induces human neutrophil chemotaxis and apoptosis via reactive oxygen species (ROS): involvement of caspases and ROS in the degradation of cytoskeletal proteins". Clinical Immunology, vol. 104, p.40-48.
- LAVASTRE, V., S. Chiasson, H. Cavalli et D. Girard. 2005. "*Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins in human leukemia PLB-985 and X-CGD cells via caspases: lamin B1 is a novel target of VAA-I". Leukemia research, vol. 29, p. 1443-53.
- LAVASTRE, V., F. Binet, E. Moisan, S. Chiasson et D. Girard. 2007. "*Viscum album* agglutinin-I induces degradation of cytoskeletal proteins in leukaemia PLB-985 cells differentiated toward neutrophils: cleavage of non-muscle myosin heavy chain-IIA by caspases". British Journal of Haematology, vol. 138, p.545-54.
- MAK, T.W., M.E. Saunders. 2008. Primer to the immune response. Burlington : Elsevier, Inc., 436p.
- MARSDEN, V.S. et A. Strasser. 2003. "Control of apoptosis in the immune system : Bcl-2, BH3-only proteins and more". Annual review of immunology, vol. 21, p. 71-105.
- MILLER, W.H. Jr, H.M. Schipper, J.S. Lee, J. Singer et S. Waxman. 2002. "Mechanisms of action of arsenic trioxide". Cancer Research, vol. 62, p. 3893-903.
- MINAKAMI, R., Y. Maehara, S. Kamakura, O. Kumano, K. Miyano et H. Sumimoto. 2010. "Membrane phospholipid metabolism during phagocytosis in human neutrophils". Genes to Cells, vol. 15, p. 409-24.
- MOISAN, E. et D. Girard. 2006. "Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis". Journal of Leukocyte Biology, vol. 79, p.489-98.

- MOULDING, D.A., C. Akgul , M. Derouet , M.R. White et S.W. Edwards . 2001." BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis". Journal of Leukocyte Biology, vol.70, p.783-92.
- NEISCH, A.L. et R.G. Fehon. 2011. "Ezrin, Radixin and Moesin : key regulators of membrane-cortex interaction and signaling". Current opinion in Cell Biology, vol. 23, p. 377-82.
- PESTONJAMASP, K., M.R. Amieva, C.P. Strassel, W.M. Nauseef, H. Furthmayr et E.J Luna. 1995." Moesin, ezrin and p205 are actin-binding proteins associated with neutrophil plasma membranes". Molecular Biology of the Cell, vol.6, p.247-59.
- PILLINGER, M.H. et S.B. Abramson. 1995. "The neutrophil in rheumatoid arthritis". Rheumatoid diseases clinics of North America, vol. 21, p. 691-714.
- PONGRACZ, J., P. Webb , K. Wang , E. Deacon , O.J. Lunn et J.M. Lord. 1999. "Spontaneous neutrophil apoptosis involves caspase 3-mediated activation of protein kinase C-delta". Journal of Biological Chemistry, vol 274, p. 37329-34.
- PRUIJIN, GJ., A. Wigk et WJ. Van Venrooi. 2010. "The use of citrullinated peptides and proteins for the diagnosis of rheumatoid arthritis". Arthritis Research and Therapy, vol. 12 p. 203.
- PUSZCZEWICZ, M. et C. Iwaszkiewicz. 2011."Role of anti-citrullinated protein antibodies in diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis". Archives of medical science, vol. 7, 189-94.
- RASHEED, Z. 2008. "Hydroxyl radical damaged immunoglobulin G in patients with rheumatoid arthritis: biochemical and immunological studies". Clinical Biochemistry, vol 41, p. 663-9.
- REMEDIOS, C.G., D. Chhabra, M. Kekic, I.V. Dedova, M. Tsubakihara, D.A. Berry et N.J. Nosworthy. 2003. "Actin binding proteins : regulation of cytoskeletal microfilaments". Physiological Reviews, vol. 83, p. 433-73.
- ROSS, M.H. et P. Wojciech. 2006. Histology : A text and Atlas with correlated cell and molecular biology. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 906p.
- SAVOIE, A., V. Levastre, M. Pelletier, T. Haito, K. Hostanska et D. Girard. 2000. "Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I: modulation of de novo protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis". Journal of leukocyte biology, vol. 68, p. 845-53.
- SERHAN, C.N., P.A. Ward et D.W. Gilroy. 2010. Fundamentals of Inflammation. Cambridge : University Press, 488p.

SCHEEL-TOELLNER, D., K. Wang et L.K. Assi. 2004. "Clustering of death receptors in lipid rafts initiates neutrophil spontaneous apoptosis". Biochemical Society Transactions, vol. 32, p.679-81.

SCHEEL-TOELLNER, D. , K. Wang et P.R. Webb. 2004. "Early events in spontaneous neutrophil apoptosis". Biochemical Society Transactions, vol.32, p.461-64.

SHCHERBINA, A., A. Bretscher, D.M. Kenney, E. Remold-O'Donnell. 1999. "Moesin, the major ERM protein of lymphocytes and platelets, differs from ezrin in its insensitivity to calpain". FEBS Letters, vol. 443, p.31-36.

SMOLEN, J.S. et G. Steiner. 2003. "Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis". Nature Reviews Drug Discovery, vol. 2, p. 473-88.

SNIR, O. W., M. Widhe, M. Hermansson, M., C. Von Spee, J. Lindberg, S. Hensen, K. Lundberg, A. Engstrom, P.J. Venables, R.E. Toes, R. Holmdhal, L. Klareskog et V. Malmstrom. 2010. "Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients". Arthritis and Rheumatism, vol. 62, p. 44-52.

TAKAMATSU, H., X. Feng, T. Chuhjo, X. Lu, C. Sugimori, K. Okawa, M. Yamamoto, S. Iseki et S. Nakao. 2007. "Specific antibodies to moesin, a membrane-cytoskeleton linker protein, are frequently detected in patients with acquired aplastic anemia". Blood, vol. 109, p. 2514-20.

TAKAMATSU, H., J.L. Espinoza, X. Lu, Z. Qi, K. Okawa et S. Nakao. 2009. "Anti-moesin antibodies in the serum of patients with aplastic anemia stimulate peripheral blood mononuclear cells to secrete TNF-alpha and IFN-gamma". Journal of Immunology, vol. 182, p. 703-10.

TSUKITA, S. et S. Yonemura. 1999. "Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p.34507-10.

URZAINQUI, A., J.M. Serrador, F. Viedema, M. Yanez-Mo, A. Rodriguez, A.L. Kobi, J.L. Alonzo-Lebrero, A. Luque, M. Deckert, J. Vazquez et F. Sanchez-Madrid. 2002. "ITAM-based interaction of ERM proteins with Syk mediates signaling by the leukocyte adhesion receptor PSGL-1". Immunity, vol. 17, p. 401-12.

VAN STEENDAM, K., K. Tilleman, M. De Ceuleneer, F. De Keyzer, D. Elewaut et D. Deforce. 2010. "Citrullinated vimentin as an important antigen in immune complexes from synovial fluid of rheumatoid arthritis patients with antibodies against citrullinated proteins". Arthritis Research and Therapy, vol. 12, p. 132.

WAGATUMA, M., M. Kimura, R. Suzuki, F. Takeuchi, K. Matstuta et H. Watanabe. 1996. " Ezrin, radixin and moesin are possible auto-immune antigens in rheumatoid arthritis". Molecular Immunology, vol. 15, p. 1171-76.

WARREN, L., R.E. Harrison et S.G. Grinstein. 2003. "Phagocytosis by neutrophils". Microbes and Infection, vol. 5, p. 1299-1306.

WITKO-SARSAT, V. P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre et L. Halbwachs-Mecarelli. 2000." Neutrophils : molécules, fonctions and pathophysiological aspects". Laboratory Investigation, vol. 80, p.617-53.

YOSHINAGA-OHARA, N., A. Takahashi, T. Uchiyama et M. Sasada. 2002. "Spatiotemporal regulation of moesin phosphorylation and rear release by Rho and serine/threonine phosphatase during neutrophil migration". Experimental cell research, vol. 278, p. 112-22.

ZARBOCK, A. et K. Ley. 2008. "Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium". The American journal of pathology, vol. 172, p. 1-7.

